

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **018723**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2013.10.30

(21) Номер заявки
200901495

(22) Дата подачи заявки
2008.06.04

(51) Int. Cl. **C07K 16/00** (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(54) **ПОЛИПЕПТИДЫ, ВАРИАБЕЛЬНЫЕ ДОМЕНЫ АНТИТЕЛ И АНТАГОНИСТЫ**

(31) **60/933,632; 0724331.4**

(32) **2007.06.06; 2007.12.13**

(33) **US; GB**

(43) **2010.10.29**

(86) **PCT/GB2008/050405**

(87) **WO 2008/149148 2008.12.11**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДОМАНТИС ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
**Йесперс Лорен, Пупека Малгорзата,
Томлинсон Айан, Эневер Кэролин
(GB)**

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Борисова Е.Н. (RU)

(56) **WO-A-2007049017
WO-A-2004058820**

HARMSSEN M.M. ET AL.: "Selection and optimization of proteolytically stable llama single-domain antibody fragments for oral immunotherapy". APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY SEP 2006, vol. 72, no. 3, September 2006 (2006-09), pages 544-551, XP002510773, ISSN: 0175-7598, abstract

(57) Изобретение относится к полипептидам и единичным переменным доменам (dAb) антител против TNFR1, устойчивым к деградации протеазой, а также к содержащим их антагонистам. Полипептиды, dAb и антагонисты полезны в качестве терапевтических и/или профилактических средств, которые вероятно сталкиваются с протеазами при введении пациенту, например для внутрилегочного введения, перорального введения, доставки в легкое и доставки в ЖК тракт пациента, а также для лечения воспалительного заболевания, такого как артрит или COPD (хроническое обструктивное заболевание легких).

B1

018723

018723

B1

Изобретение относится к протеазоустойчивым полипептидам, иммуноглобулиновым единичным варибельным доменам (антитела) и содержащим их антагонистам фактора некроза опухоли 1 (TNFR1, p55, CD120a, P60, член суперсемейства рецепторов TNF 1A, TNFRSF1 A). Изобретение дополнительно относится к применению, препаратам, композициям и устройствам, содержащим такие лиганды против TNFR1.

Предшествующий уровень техники

Полипептиды и пептиды становятся все более важными агентами в различных приложениях, включая промышленные приложения и применение в качестве медицинских, терапевтических и диагностических агентов. Однако при некоторых физиологических состояниях, таких как воспалительные состояния (например, COPD (хроническое обструктивное заболевание легких)) и рак, количество протеаз, присутствующих в ткани, органе или животном (например, в легком, в опухоли или рядом с опухолью), может увеличиваться. Это увеличение протеаз может приводить в результате к усиленной деградации и инактивации эндогенных белков и терапевтических пептидов, полипептидов и белков, вводимых для лечения заболевания. Соответственно, некоторые агенты, обладающие потенциалом применения *in vivo* (например, применение в лечении, диагностике или профилактике заболевания), обладают лишь ограниченной эффективностью, поскольку они быстро деградируют и инактивируются протеазами.

Протеазоустойчивые полипептиды обладают некоторыми преимуществами. Например, протеазоустойчивые полипептиды остаются активными *in vivo* дольше, чем агенты, чувствительные к протеазам, и соответственно остаются функциональными в течение периода времени, достаточного для обеспечения биологических эффектов. Существует потребность в улучшенных способах селекции полипептидов, устойчивых к деградации протеазами, а также обладающих желаемой биологической активностью.

TNFR1.

TNFR1 представляет собой трансмембранный рецептор, содержащий внеклеточную область, связывающуюся с лигандом, и внутриклеточный домен, лишенный собственной активностью передачи сигнала, но который может ассоциироваться с молекулами, передающими сигнал. Комплекс TNFR1 со связанным TNF содержит три цепи TNFR1 и три цепи TNF (Banner et al., Cell, 73(3) 431-445 (1993)). Лиганд TNF представлен в виде тримера, связанного с тремя цепями TNFR1 (Id.). Три цепи TNFR1 сконцентрированы близко друг к другу в комплексе рецептор-лиганд, и это близкое расположение является предпосылкой для опосредованной TNFR1 передачи сигнала. Фактически мультивалентные агенты, которые связываются с TNFR1, такие как антитела против TNFR1, могут вызывать кластеризацию TNFR1 и передачу сигнала в отсутствие TNF и обычно используются в качестве агонистов TNFR1 (см., например, Belka et al., EMBO, 14(6): 1156-1165 (1995); Mandik-Nayak et al., J. Immunol, 167:1920-1928 (2001)). Соответственно, мультивалентные агенты, которые связываются с TNFR1, как правило, представляют собой неэффективные антагонисты TNFR1, даже если они блокируют связывание TNF α с TNFR1.

Внеклеточная область TNFR1 содержит аминоконцевой сегмент, состоящий из тринадцати аминокислот (аминокислоты 1-13 в SEQ ID NO:603 (человек); аминокислоты 1-13 в SEQ ID NO:604 (мышь)), домен 1 (аминокислоты 14-53 в SEQ ID NO:603 (человек); аминокислоты 14-53 в SEQ ID NO:604 (мышь)), домен 2 (аминокислоты 54-97 в SEQ ID NO:603 (человек); аминокислоты 54-97 в SEQ ID NO:604 (мышь)), домен 3 (аминокислоты 98-138 в SEQ ID NO:603 (человек); аминокислоты 98-138 в SEQ ID NO:604 (мышь)) и домен 4 (аминокислоты 139-167 в SEQ ID NO:603 (человек); аминокислоты 139-167 в SEQ ID NO:604 (мышь)), за которым следует лежащая ближе к мембране область (аминокислоты 168-182 в SEQ ID NO:603 (человек); аминокислоты 168-183 SEQ ID NO:604 (мышь)) (см. Banner et al., Cell 73(3) 431-445 (1993), и Loetscher et al., Cell 61(2) 351-359 (1990)). Домены 2 и 3 формируют контакт со связанным лигандом (TNF β , TNF α) (Banner et al., Cell, 73(3) 431-445 (1993)). Внеклеточная область TNFR1 также содержит область, названную как домен сборки предшественника лиганда или PLAD домен (аминокислоты 1-53 в SEQ ID NO:603 (человек); аминокислоты 1-53 в SEQ ID NO:604 (мышь)) (патент США, WO 01/58953; Deng et al., Nature Medicine, doi: 10.1038/nml304 (2005)).

TNFR1 выбрасывается с поверхности клеток *in vivo* при помощи способа, который включает протеолиз TNFR1 в домене 4 или в находящейся ближе к мембране области (аминокислоты 168-182 в SEQ ID NO:603; аминокислоты 168-183 в SEQ ID NO:604), с образованием растворимой формы TNFR1. Растворимый TNFR1 сохраняет способность связываться с TNF α и, таким образом, действует в качестве эндогенного ингибитора активности TNF α .

Краткое изложение сущности изобретения

В одном из аспектов в изобретении предложен полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 93% идентична аминокислотной последовательности DOM1h-131-206 (представленной на фиг. 3). В одном из воплощений процент идентичности составляет по меньшей мере 94, 95, 96, 97, 98 или 99%. В одном из воплощений полипептид представляет собой DOM1h-131-206. В изобретении дополнительно предложен (по существу) чистый мономер DOM1h-131-206. В одном из воплощений DOM1h-131-206 представляет собой по меньшей мере на 98, 99, 99,5% чистый или на 100% чистый мономер.

В одном из аспектов в изобретении предложен полипептид, кодируемый аминокислотной последо-

вательностью, которая по меньшей мере на 80% идентична нуклеотидной последовательности DOM1h-131-206 (представленной на фиг. 19). В одном из воплощений процент идентичности составляет по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%.

В одном из аспектов в изобретении предложен полипептид, кодируемый нуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере на 57% идентична нуклеотидной последовательности DOM1h-131-206 (представленной на фиг. 19), и где полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 93% идентична аминокислотной последовательности DOM1h-131-206 (представленной на фиг. 3). В одном из воплощений процент идентичности нуклеотидной последовательности составляет по меньшей мере 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%. В одном из воплощений процент идентичности аминокислотной последовательности составляет по меньшей мере 94, 95, 96, 97, 98, или 99, или 100%. Например, нуклеотидная последовательность может представлять собой кодон-оптимизированный вариант нуклеотидной последовательности DOM1h-131-206 (представленной на фиг. 19). Оптимизация кодонов последовательности известна в области техники. В одном из воплощений нуклеотидная последовательность оптимизирована для экспрессии в бактериальной клетке-хозяине (например, *E.coli* или *Pseudomonas*, например *P. fluorescens*), клетке-хозяине млекопитающего (например, CHO) или дрожжевой клетке-хозяине (например, *Picchia* или *Saccharomyces*, например *P. pastoris* или *S. cerevisiae*).

В одном из аспектов в изобретении предложен слитый белок, содержащий полипептид по изобретению.

В одном из аспектов в изобретении предложен иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен против рецептора TNF α 1 типа (TNFR1; p55), содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 93% идентична аминокислотной последовательности DOM1h-131-206 (представленной на фиг. 3). В одном из воплощений процент идентичности составляет по меньшей мере 94, 95, 96, 97, 98 или 99%.

В одном из аспектов в изобретении предложен протеазоустойчивый иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен против рецептора TNF α 1 типа (TNFR1; p55), содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности DOM1h-131-206. В одном из воплощений этих аспектов процент идентичности составляет по меньшей мере 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%.

В одном из воплощений иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен содержит аспарагиновую кислоту в положении 53, где нумерация соответствует нумерации по Кабату (Kabat) ("Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Department of Health and Human Services 1991).

В одном из воплощений иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен содержит гистидин в положении 91, где нумерация соответствует нумерации по Кабату.

В одном из аспектов в изобретении предложен иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен против рецептора TNF α 1 типа (TNFR1; p55), содержащий аминокислотную последовательность, которая идентична аминокислотной последовательности DOM1h-131-206.

В одном из аспектов в изобретении предложен иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен против рецептора TNF α 1 типа (TNFR1; p55), кодируемый нуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере на 80% идентична нуклеотидной последовательности DOM1h-131-206 (представленной на фиг. 19). В одном из воплощений процент идентичности составляет по меньшей мере 70, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%.

В одном из аспектов в изобретении предложен иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен против рецептора TNF α 1 типа (TNFR1; p55), кодируемый нуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере на 57% идентична нуклеотидной последовательности DOM1h-131-206 (представленной на фиг. 19), и где вариабельный домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 93% идентична аминокислотной последовательности DOM1h-131-206 (представленной на фиг. 3). В одном из воплощений процент идентичности нуклеотидной последовательности составляет по меньшей мере 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%. В одном из воплощений процент идентичности аминокислотной последовательности составляет по меньшей мере 94, 95, 96, 97, 98, или 99%, или 100%. Например, нуклеотидная последовательность может представлять собой кодон-оптимизированный вариант нуклеотидной последовательности DOM1h-131-206 (представленной на фиг. 19). Оптимизация кодонов последовательности известна в области техники. В одном из воплощений нуклеотидная последовательность оптимизирована для экспрессии в бактериальной клетке-хозяине (например, *E.coli* или *Pseudomonas*, например *P. fluorescens*), клетке-хозяине млекопитающего (например, CHO) или дрожжевой клетке-хозяине (например, *Picchia* или *Saccharomyces*, например *P. pastoris* или *S. cerevisiae*).

В одном из аспектов в изобретении предложен иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен против рецептора TNF α 1 типа (TNFR1; p55), кодируемый последовательностью, которая идентична нуклеотидной последовательности DOM1h-131-206 (представленной на фиг. 19).

В одном из аспектов в изобретении предложен антагонист рецептора TNF α 1 типа (TNFR1; p55),

мере на 50% идентична последовательности CDR2 из DOM1h-131-206, и последовательность CDR3, которая по меньшей мере на 50% идентична последовательности CDR3 из DOM1h-131-206. В одном из воплощений идентичность последовательности CDR одной или обеих, или каждой CDR составляет по меньшей мере соответственно 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99%. Антагонист может быть протеазоустойчивым, например устойчивым к одной или более чем одной из описанных здесь протеаз, например при описанном здесь наборе условий.

В одном из аспектов в изобретении предложен антагонист рецептора TNF α 1 типа (TNFR1; p55), содержащий единичный варибельный домен иммуноглобулина, содержащий последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 (например, CDR1, CDR2, CDR3, CDR1 и 2, CDR1 и 3, CDR2 и 3 или CDR1, 2 и 3) из DOM1h-131-206 (представленной на фиг. 3). Антагонист может быть протеазоустойчивым, например устойчивым к одной или более чем одной из описанных здесь протеаз, например при описанном здесь наборе условий.

В одном из аспектов в изобретении предложен антагонист рецептора TNF α 1 типа (TNFR1; p55), который конкурирует с DOM1h-131-511-206 за связывание с TNFR1. Таким образом, антагонист может связываться с тем же самым эпитопом, что и DOM1h-131-206, или перекрывающимся эпитопом. В одном из воплощений антагонист содержит иммуноглобулиновый единичный варибельный домен, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 93% идентична аминокислотной последовательности DOM1h-131-206 (представленной на фиг. 3). В одном из воплощений процент идентичности составляет по меньшей мере 94, 95, 96, 97, 98 или 99%. Антагонист может быть протеазоустойчивым, например устойчивым к одной или более чем одной из описанных здесь протеаз, например при описанном здесь наборе условий. В одном из воплощений антагонист представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, такой как моновалентный антигенсвязывающий фрагмент (например, scFv, Fab, Fab', dAb), обладающий специфичностью связывания в отношении TNFR1. Другие примеры антагонистов представляют собой описанные здесь лиганды, которые связываются с TNFR1. Лиганды могут содержать иммуноглобулиновый единичный варибельный домен или однодоменное антитело (dAb), обладающее специфичностью связывания в отношении TNFR1, или области, определяющие комплементарность, такого dAb в подходящем формате. В некоторых воплощениях лиганд представляет собой мономер dAb, который состоит по существу из или состоит из иммуноглобулинового единичного варибельного домена или dAb, обладающего специфичностью связывания в отношении TNFR1. В других воплощениях лиганд представляет собой полипептид, который содержит dAb (или CDR из dAb) в подходящем формате, таком как формат антитела.

Один из антагонистов TNFR1 по изобретению не ингибирует связывание TNF α с TNFR1, но ингибирует передачу сигнала, опосредованную через TNFR1. Например, антагонист TNFR1 может ингибировать индуцированную TNF α кластеризацию TNFR1, предшествующую передаче сигнала через TNFR1. Такие антагонисты обладают несколькими преимуществами. Например, в присутствии такого антагониста TNF α может связываться с TNFR1, экспрессирующимся на поверхности клеток, и удаляться из клеточного окружения, но опосредованная TNFR1 передача сигнала не будет активироваться. Таким образом, будет ингибироваться индуцированная TNFR1 сигналом продукция дополнительного TNF α и других медиаторов воспаления. Аналогично, антагонисты TNFR1, связывающиеся с TNFR1 и ингибирующие передачу сигнала, опосредованную через TNFR1, но не ингибирующие связывание TNF α с TNFR1, не будут ингибировать связывание с TNF α и ингибирующую активность эндогенно продуцируемого растворимого TNFR1. Соответственно, введение такого антагониста млекопитающему, нуждающемуся в таком введении, может дополнить эндогенные регуляторные пути, которые ингибируют активность TNF α и активность TNFR1 *in vivo*. Изобретение также относится к лигандам, которые (1) связываются с TNFR1 (например, в домене 1), (2) оказывают антагонистическое действие в отношении активации опосредованной TNFR1 передачи сигнала и (3) не ингибируют связывание TNF α с TNFR1. Такой лиганд связывается с растворимым TNFR1, но не предотвращает связывание растворимого рецептора с TNF α , и, таким образом, введение такого антагониста млекопитающему, нуждающемуся в таком введении, может дополнить эндогенные регуляторные пути, которые ингибируют активность TNF α *in vivo* путем увеличения периода полувыведения растворимого рецептора из сыворотки крови. Эти преимущества особенно актуальны для лигандов, которые форматированы таким образом, что обладают большим гидродинамическим размером, например путем присоединения группы PEG (полиэтиленгликоль), альбумина сыворотки крови, трансферрина, рецептора трансферрина или, по меньшей мере, его трансферринсвязывающего фрагмента, области Fc антитела, или путем конъюгации с доменом антитела. Например, агент (например, полипептид, варибельный домен или антагонист), который 1) связывается с TNFR1 (например, в домене 1), (2) оказывает антагонистическое действие в отношении активации опосредованной TNFR1 передачи сигнала, и (3) не ингибирует связывание TNF α с TNFR1, такой как мономер dAb, может быть форматирован в виде более крупного антигенсвязывающего фрагмента антитела или в виде антитела (например, форматирован как Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, IgG, scFv). Гидродинамический размер лиганда и его период полувыведения из сыворотки крови также может быть увеличен путем конъюгации или связывания агента, связывающего TNFR1 (антагонист; варибельный домен) со связывающим доме-

ном (например, антителом или фрагментом антитела), связывающим антиген или эпитоп, который увеличивает период полувыведения *in vivo*, как здесь описано (см. приложение 1 в WO 2006038027, включенной здесь путем ссылки). Например, связывающийся с TNFR1 агент (например, полипептид) может быть сконъюгирован или связан с антителом против альбумина сыворотки крови или его фрагментом или с антителом или фрагментом антитела против неонатального Fc рецептора, например dAb, Fab, Fab' или scFv против SA или против неонатального Fc рецептора, или с аффителом против SA или аффителом против неонатального Fc рецептора.

Примеры подходящего альбумина, фрагментов альбумина или вариантов альбумина для применения в TNFR1-связывающем лиганде по изобретению описаны в WO 2005/077042A2 и WO 2006038027, которые включены здесь путем ссылки.

В других воплощениях по изобретению, описанных в этом описании, вместо применения "dAb" в антагонисте или лиганде по изобретению предполагается, что специалист в данной области техники может использовать домен, который содержит CDR из dAb, который связывает TNFR1 (например, CDR, привитые на подходящий белковый остов или скелет, например аффитело, SpA остов, домен рецептора LDL (липопротеинов низкой плотности) класса A или домен EGF (фактор роста эпителия)), или может представлять собой белковый домен, содержащий сайт связывания с TNFR1, например когда домен выбран из аффитела, домена SpA, домена LDL рецептора класса A или домена EGF. Полное описание следует рассматривать таким образом, что оно раскрывает антагонисты, лиганды и способы использования таких доменов вместо dAb.

Полипептиды, единичные вариабельные домены иммуноглобулина и антагонисты по изобретению могут быть устойчивыми к одной или более чем одной из следующих протеаз: сериновая протеаза, цистеиновая протеаза, аспаратпротеазы, тиоловые протеазы, матриксная металлопротеиназа, карбоксипептидаза (например, карбоксипептидаза А, карбоксипептидаза В), трипсин, химотрипсин, пепсин, папаин, эластаза, лейкозим, панкреатин, тромбин, плазмин, катепсины (например, катепсин G), протеиназа (например, протеиназа 1, протеиназа 2, протеиназа 3), термоллизин, химозин, энтеропептидаза, каспаза (например, каспаза 1, каспаза 2, каспаза 4, каспаза 5, каспаза 9, каспаза 12, каспаза 13), кальпаин, фикаин, клострипаин, актинидаин, бромелаин и сепараза. В конкретных воплощениях протеаза представляет собой трипсин, эластазу или лейкозим. Протеаза также может обеспечиваться биологическим экстрактом, биологическим гомогенатом или биологическим препаратом. В одном из воплощений протеаза представляет собой протеазу, обнаруженную в мокроте, слизи (например, желудочной слизи, носовой слизи, бронхиальной слизи), бронхоальвеолярном смыве, легочном гомогенате, легочном экстракте, экстракте поджелудочной железы, желудочной жидкости, слюне или слезах. В одном из воплощений протеаза представляет собой протеазу, обнаруженную в глазу и/или слезах. В одном из воплощений протеаза представляет собой небактериальную протеазу. В одном воплощении протеаза представляет собой протеазу животного, например протеазу млекопитающего, например человека. В одном воплощении протеаза представляет собой протеазу ЖК (желудочно-кишечного) тракта или протеазу легочной ткани, например протеазу ЖК тракта или протеазу легочной ткани, обнаруженную у людей. Такая приведенная здесь протеаза также может быть использована в описанных здесь способах, включающих воздействие протеазой на репертуар библиотеки.

В одном из аспектов в изобретении предложен протеазоустойчивый иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен, содержащий сайт связывания рецептора TNF α 1 типа (TNFR1; p55), где вариабельный домен устойчив к протеазе, например трипсину, при инкубировании с (1) концентрацией (с) протеазы по меньшей мере 10 мкг/мл при 37°C в течение промежутка времени (t) по меньшей мере 1 ч; или (2) концентрацией (с') протеазы по меньшей мере 40 мкг/мл при 30°C в течение промежутка времени (t) по меньшей мере 1 ч, где вариабельный домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности DOM1h-131-206 (представленной на фиг. 3). В одном из воплощений отношение (на основе моль/моль) протеазы, например трипсина, к вариабельному домену составляет 8000 к 80000 протеаза:вариабельный домен, например когда С составляет 10 мкг/мл, тогда отношение составляет 800 к 80000 протеаза:вариабельный домен; или когда С или С' составляет 100 мкг/мл, тогда отношение составляет 8000 к 80000 протеаза:вариабельный домен. В одном из воплощений отношение (на основе масса/масса, например на основе микрограмм/микрограмм) протеазы (например, трипсина) к вариабельному домену составляет 16000 к 160000 протеаза:вариабельный домен, например когда С составляет 10 мкг/мл, тогда отношение составляет 1600 к 160000 протеаза:вариабельный домен; или когда С или С' составляет 100 мкг/мл, тогда отношение составляет 16000 к 160000 протеаза:вариабельный домен. В одном из воплощений концентрация протеазы (с или с') составляет по меньшей мере 100 или 1000 мкг/мл. Здесь сделана ссылка на описание условий, подходящих для протеолитической активности протеазы для применения при работе с репертуарами или библиотеками пептидов или полипептидов (например, параметры мас./мас.). Эти условия могут быть использованы для определения устойчивости к протеазе конкретного иммуноглобулинового единичного вариабельного домена. В одном из воплощений время (t) составляет приблизительно 1, 3 или 24 ч или в течение ночи (например, приблизительно 12-16 ч). В одном из воплощений вариабельный домен устойчив в условиях (1) концентрация протеазы (с) составляет или приблизительно составляет 10

или 100 мкг/мл, время (t) составляет 1 ч. В одном из воплощений вариабельный домен устойчив в условиях (2) концентрация протеазы (c') составляет или приблизительно составляет 40 мкг/мл, время (t) составляет или приблизительно составляет 3 ч. В одном из воплощений протеаза выбрана из трипсина, эластазы, лейкозима и панкреатина. В одном из воплощений протеаза представляет собой трипсин. В одном из воплощений протеаза представляет собой протеазу, обнаруженную в мокроте, слизи (например, желудочной слизи, носовой слизи, бронхиальной слизи), бронхоальвеолярном лаваже, гомогенате легких, экстракте легких, экстракте поджелудочной железы, желудочной жидкости, слюне или слезах. В одном из воплощений протеаза представляет собой протеазу, обнаруженную в глазу и/или слезах. В одном из воплощений протеаза представляет собой небактериальную протеазу. В этом воплощении протеаза представляет собой протеазу животного, например протеазу млекопитающего, например человека. В этом воплощении протеаза представляет собой протеазу ЖК тракта или протеазу легочной ткани, например протеазу ЖК тракта или протеазу легочной ткани, обнаруженные у людей. Такая приведенная здесь протеаза также может быть использована в описанных здесь способах, включающих воздействие протеазой на репертуар библиотеки.

В одном из воплощений вариабельный домен устойчив к трипсину и/или по меньшей мере одной другой протеазе, выбранной из эластазы, лейкозима и панкреатина. Например, устойчивость представляет собой устойчивость к трипсину и эластазе; трипсину и лейкозиму; трипсину и панкреатину; трипсину, эластазе и лейкозиму; трипсину, эластазе и панкреатину; трипсину, эластазе, панкреатину и лейкозиму или трипсину, панкреатину и лейкозиму.

В одном из воплощений вариабельный домен представлен на бактериофаге при инкубации в условиях (1) или (2), например в фаговой библиотеке, имеющей размер от 10^6 до 10^{13} , например от 10^8 до 10^{12} репликативных единиц (инфекционных вирионов).

В одном из воплощений вариабельный домен специфически связывается с TNFR1 после инкубации в условиях (1) или (2), например при оценке с использованием ViaCore™ или ELISA (твердофазного иммуноферментного анализа), например фагового ELISA или моноклонального фагового ELISA.

В одном из воплощений вариабельные домены по изобретению специфически связываются с белком А или белком L. В одном из воплощений специфическое связывание с белком А или L происходит после инкубации в условиях (1) или (2).

В одном из воплощений вариабельные домены по изобретению могут иметь величину OD₄₅₀ в ELISA, например фаговом ELISA или моноклональном фаговом ELISA, по меньшей мере 0,404, например после инкубации в условиях (1) или (2).

В одном из воплощений вариабельные домены по изобретению демонстрируют (по существу) единственную полосу при электрофорезе в геле, например после инкубации в условиях (1) или (2).

В некоторых воплощениях в изобретении предложен антагонист TNFR1, который представляет собой биспецифический лиганд, содержащий первое dAb по изобретению, связывающее TNFR1, и второе dAb, которое обладает той же самой или отличающейся от первого dAb специфичностью связывания. Второе dAb может связываться с мишенью, выбранной из следующего: ApoE (аполипопротеин E), ApoSAA (Apo-сывороточный амилоид A-1), BDNF (нейротрофический фактор головного мозга), кардиотрофин-1, SEA (карциноэмбриональный антиген), CD40 (кластер дифференцировки 40), лиганд CD40, CD56, CD38, CD138, EGF (эпидермальный фактор роста), рецептор EGF, ENA-78 (эпителиальный нейтрофил-активирующий пептид-78), эотаксин, эотаксин-2, экзодус-2 (exodus-2), FAP α (белок активации фибробластов α), кислый FGF (фактор роста фибробластов), основной FGF, фактор роста фибробластов-10, лиганд FLT3 (Fms-подобной тирозинкиназы-3), фракталкин (CX3C), GDNF (глиальный нейротрофический фактор), G-CSF (колониестимулирующий фактор гранулоцитов), GM-CSF (колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов), GF- β 1 (фактор роста β 1), человеческий сывороточный альбумин, инсулин, IFN- γ (интерферон- γ), IGF-I (инсулиноподобный фактор роста I), IGF-II, IL-1 α (интерлейкин-1 α), IL-1 β , рецептор IL-1, рецептор IL-1 типа 1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (72 а.к.), IL-8 (77 а.к.), IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 (IGIF (интерферон- γ -индуцирующий фактор)), ингибин α , ингибин β , IP-10 (интерферон-индуцибельный белок 10), фактор роста кератиноцитов-2 (KGF-2), KGF, лептин, LIF (лейкоз-ингибирующий фактор), лимфотактин, вещество, ингибирующее мюллеровы протоки, фактор, ингибирующий колониобразование моноцитов, белок-аттрактант моноцитов, M-CSF (колониестимулирующий фактор макрофагов), MDC (макрофагальный хемокин) (67 а.к.), MDC (69 а.к.), MCP-1 (моноцитарный хемотаксический фактор-1) (MCAF (моноцитарный хемотаксический и активирующий фактор)), MCP-2, MCP-3, MCP-4, MDC (67 а.к.), MDC (69 а.к.), MIG (монокин, индуцируемый IFN- γ), MIP-1 α (макрофагальный белок воспаления 1 α), MIP-1 β , MIP-3 α , MIP-3 β , MIP-4, фактор-1, ингибирующий миелоидные предшественники (MPlF-1), NAP-2 (нейтрофил-активирующий белок-2), нейртурин, фактор роста нервов (NGF), β -NGF, NT-3 (нейротрофин-3), NT-4, онкостатин M, PDGF-AA (тромбоцитарный фактор роста-AA), PDGF-AB, PDGF-BB, PF-4 (тромбоцитарный фактор 4), RANTES (цитокин, экспрессируемый и секретируемый нормальными Т-клетками при активации), SDF1 α (фактор-1 α стромальных клеток), SDF1 β , SCF, SCGF (фактор роста стволовых клеток), фактор стволовых клеток (SCF), TARC (хемокин, регулируемый тимусом и при активации), TGF- α

(трансформирующий фактор роста α), TGF- β , TGF- β 2, TGF- β 3, фактор некроза опухолей (TNF), TNF- α , TNF- β , рецептор I TNF, рецептор II TNF, TNIL-1, TPO (тромбопоэтин), VEGF (фактор роста сосудистого эндотелия), VEGF A, VEGF B, VEGF C, VEGF D, рецептор 1 VEGF, рецептор 2 VEGF, рецептор 3 VEGF, GCP-2 (гранулоцитарный хемотаксический фактор-2), GRO/MGSA (регулирующий рост онкоген/фактор, стимулирующий рост меланомы), GRO- β , GRO- γ , HCC1 (гемофильтратный CC-хемокин 1), 1-309, HER 1, HER 2, HER 3, HER 4, сывороточный альбумин, vWF (фактор (фон) Виллебранда), амилоидные белки (например, альфа-амилоид), MMP12 (матриксная металлопротеаза 12), PDK1 (P13K (фосфатидилинозит-3-киназа)-зависимая киназа 1), IgE (иммуноглобулин E), IL-13Ra1, IL-13Ra2, IL-15, IL-15R, IL-16, IL-17R, IL-17, IL-18, IL-18R, IL-23, IL-23R, IL-25, CD2, CD4, CD11a, CD23, CD25, CD27, CD28, CD30, CD40, CD40L, CD56, CD138, ALK5 (активинный рецептор-подобная киназа 5), EGFR (рецептор эпидермального фактора роста), FcER1 (высокоаффинный рецептор для IgE), TGF β , CCL2 (хемокиновый лиганд-2 с CC-мотивом), CCL18, CEA, CR8 (цитокин-отвечающие (CR) гены), CTGF (фактор роста соединительной ткани), CXCL12 (хемокиновый лиганд-12 с CXС-мотивом) (SDF-1), химазу, FGF, фурин, эндотелин-1, эотаксины (например, эотаксин, эотаксин-2, эотаксин-3), GM-CSF, ICAM-1 (фактор межклеточной адгезии 1), ICOS (индуцибельный T-клеточный костимулятор), IgE, IFN α , 1-309, интегрин, L-селектин, MIF (фактор, ингибирующий миграцию макрофагов), MIP4, MDC, MCP-1, MMP, эластазу нейтрофилов, остеопонтин, OX-40, PARC (легочный хемокин, регулируемый активацией), PD-1 (рецептор апоптоза 1), RANTES, SCF, SDF-1, siglec8 (связывающий сиаловую кислоту иммуноглобулиноподобный лектин 8), TARC, TGF β , тромбин, Tim-1 (семейство Ig и муциновых доменов, член 1), TNF, TRANCE (индуцирующий TNF-ассоциированную активацию цитокин), триптаза, VEGF, VLA-4 (очень поздний антиген-4), VCAM (молекула адгезии сосудистых клеток), α 4 β 7, CCR2 (хемокиновый рецептор-2 с CC-мотивом), CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR8, alphavbeta6, alphavbeta8, cMET, CD8, vWF, амилоидные белки (например, альфа-амилоид), MMP12, PDK1 и IgE.

В одном из примеров обладающий двойной специфичностью лиганд содержит первое dAb, связывающееся с первым эпитопом на TNFR1, и второе dAb, связывающееся с эпитопом на другой мишени. В еще одном примере второе dAb связывается с эпитопом на альбумине сыворотки крови.

В других воплощениях лиганд представляет собой мультиспецифический лиганд, который содержит первый эпитопсвязывающий домен, обладающий специфичностью связывания в отношении TNFR1, и по меньшей мере один другой эпитопсвязывающий домен, обладающий специфичностью связывания, отличающейся от первого эпитопсвязывающего домена. Например, первый эпитопсвязывающий домен может представлять собой dAb, связывающее TNFR1, или может представлять собой домен, который содержит CDR из dAb, которое связывает TNFR1 (например, CDR, привитые на подходящем белковом остове или скелете, например аффитело, остов SpA, домен LDL рецептора класса A или домен EGF), или может представлять собой домен, связывающий TNFR1, где домен выбран из аффитела, домена SpA, домена LDL рецептора класса A или домена EGF.

В некоторых воплощениях полипептид, антагонист, лиганд или мономер dAb против TNFR1 характеризуется одним или более чем одним из следующего: 1) диссоциирует из человеческого TNFR1 с константой диссоциации (K_d) от 50 нМ до 20 пМ и константой скорости K_{off} от $5 \times 10^{-1} \text{ c}^{-1}$ до $1 \times 10^{-7} \text{ c}^{-1}$, как определено при помощи поверхностного плазмонного резонанса; 2) ингибирует связывание фактора некроза опухоли альфа (TNF α) с TNFR1 с IC_{50} (средней ингибирующей концентрацией) от 500 нМ до 50 пМ; 3) нейтрализует человеческий TNFR1 в стандартном анализе на клетках L929 с ND_{50} (средней нейтрализующей дозой) от 500 нМ до 50 пМ; 4) оказывает антагонистическое действие в отношении активности TNFR1 в стандартном клеточном анализе с ND_{50} не более 100 нМ, и в концентрации не более 10 мкМ dAb оказывает агонистическое действие в отношении активности TNFR1 не более 5% в анализе; 5) ингибирует летальность в модели септического шока у мышей, вызванного LPS (липополисахарид)/D-галактозамином; 6) устойчив к агрегации; 7) секретируется в количестве, составляющем по меньшей мере приблизительно 0,5 мг/л при экспрессии в *E.coli* или в видах *Pichia* (например, *P. pastoris*); 8) подвергается обратимому рефолдингу; 9) обладает эффективностью в модели хронического воспалительного заболевания, выбранного из группы, состоящей из модели индуцированного коллагеном артрита у мышей, модели Δ ARE артрита у мышей, модели Δ ARE воспалительного заболевания кишечника у мышей, модели воспалительного заболевания кишечника, индуцированного натрия декстрансульфатом, модели вызванного табачным дымом хронического обструктивного заболевания легких у мышей и подходящих моделей у приматов (например, модели индуцированного коллагеном артрита у приматов); и/или 10) обладает эффективностью в лечении, подавлении или профилактике хронического воспалительного заболевания. Ссылка на WO 2006038027 в отношении подробной информации относительно анализов и тестов, и параметров, применяемых для условий (1)-(10), и она включена здесь путем ссылки.

В конкретных воплощениях полипептид, антагонист, лиганд или мономер dAb диссоциирует из человеческого TNFR1 с константой диссоциации (K_d) от 50 нМ до 20 пМ и константой скорости K_{off} от 5×10^{-1} до $1 \times 10^{-7} \text{ c}^{-1}$, как определено при помощи поверхностного плазмонного резонанса; ингибирует связывание фактора некроза опухоли альфа (TNF α) с TNFR1 с IC_{50} от 500 нМ до 50 пМ и нейтрализует человеческий TNFR1 в стандартном анализе на клетках L929 с ND_{50} от 500 нМ до 50 пМ. В других кон-

кретных воплощениях полипептид, антагонист, лиганд или мономер dAb диссоциирует из человеческого TNFR1 с константой диссоциации (K_d) от 50 нМ до 20 пМ и константой скорости K_{off} от 5×10^{-1} до $1 \times 10^{-7} \text{ с}^{-1}$; ингибирует связывание фактора некроза опухоли альфа (TNF α) с TNFR1 с IC_{50} от 500 нМ до 50 пМ и обладает эффективностью в модели хронического воспалительного заболевания, выбранного из группы, состоящей из модели индуцированного коллагеном артрита у мышей, Δ ARE модели артрита у мышей, Δ ARE модели воспалительного заболевания кишечника у мышей, модели воспалительного заболевания кишечника, индуцированного натрия декстрансульфатом, модели вызванного табачным дымом хронического обструктивного заболевания легких у мышей и подходящих моделей у приматов (например, модели индуцированного коллагеном артрита у приматов). В других конкретных воплощениях полипептид, антагонист, лиганд или мономер dAb диссоциирует из человеческого TNFR1 с константой диссоциации (K_d) от 50 нМ до 20 пМ и константой скорости K_{off} от 5×10^{-1} до $1 \times 10^{-7} \text{ с}^{-1}$, как определено при помощи поверхностного плазмонного резонанса; нейтрализует человеческий TNFR1 в стандартном анализе на клетках L929 с ND_{50} от 500 нМ до 50 пМ и оказывает антагонистическое действие в отношении активности TNFR1 в стандартном клеточном анализе с ND_{50} не более 100 нМ, и в концентрации не более 10 мкМ dAb оказывает агонистическое действие в отношении активности TNFR1 не более 5% в анализе.

Протеазоустойчивые полипептиды, иммуноглобулиновые единичные переменные домены и антагонисты по изобретению обладают полезностью в терапии, профилактике и диагностике заболевания или состояний у млекопитающих, например людей. В частности, они обладают полезностью в качестве основы лекарств, которые вероятно сталкиваются с протеазами при введении пациенту, такому как человек. Например, при введении в ЖК тракт (например, при пероральном, сублингвальном, ректальном введении), в этом случае полипептиды, единичные переменные домены иммуноглобулина и антагонисты могут быть подвергнуты воздействию протеазы в одном или более чем одном из следующего: верхний отдел ЖК тракта, нижний отдел ЖК тракта, рот, желудок, тонкий кишечник и толстая кишка. Таким образом, в одном из воплощений предложен протеазоустойчивый полипептид, единичный переменный домен иммуноглобулина или антагонист, вводимый перорально, сублингвально или ректально в ЖК тракт пациента для лечения и/или профилактики заболевания или состояния у пациента. Например, пероральное введение пациенту (например, пациенту человеку) для лечения и/или профилактики опосредованного TNF α состояния или заболевания, такого как артрит (например, ревматоидный артрит), IBD, псориаз или болезнь Крона. В еще одном примере полипептид, переменный домен или антагонист вероятно сталкивается с протеазой при введении (например, путем ингаляции или интраназально) в легочную ткань (например, легкое или дыхательные пути). Таким образом, в одном из воплощений предложено введение пациенту (например, человеку) протеазоустойчивого полипептида, единичного переменного домена иммуноглобулина или антагониста путем ингаляции или интраназально в легочную ткань пациента для лечения и/или профилактики заболевания или состояния у пациента. Такое состояние может представлять собой астму (например, аллергическую астму), COPD (хроническое обструктивное заболевание легких), грипп или любое другое легочное заболевание или состояние, раскрытое в WO 2006038027, включенной здесь путем ссылки. В еще одном примере полипептид, переменный домен или антагонист вероятно сталкивается с протеазой при введении (например, при помощи внутриглазной инъекции или в виде глазных капель) в глаз пациента. Таким образом, в одном из воплощений предложено глазное введение пациенту (например, человеку) протеазоустойчивого полипептида, единичного переменного домена иммуноглобулина или антагониста для лечения у пациента и/или профилактики заболевания или состояния (например, заболевания или состояния глаз). Введение может представлять собой местное введение в глаз, в форме глазных капель или путем инъекции в глаз, например в стекловидное тело глаза.

Антагонисты, полипептиды и иммуноглобулиновые единичные переменные домены по изобретению могут продемонстрировать улучшенные или относительно высокие температуры плавления (T_m), обеспечивая улучшенную стабильность. Высокоаффинное связывание с мишенью может также или альтернативно представлять собой свойство антагонистов, полипептидов и переменных доменов. Одно или более чем одно из этих свойств, комбинированное с устойчивостью к протеазе, делает антагонисты, переменные домены и полипептиды пригодными для применения в качестве лекарственных средств у млекопитающих, таких как люди, где, вероятно, сталкиваются с протеазами, например для введения в ЖК тракт или легочную ткань.

Таким образом, в одном из аспектов в изобретении предложен антагонист TNFR1 для пероральной доставки. В одном из аспектов в изобретении предложен антагонист TNFR1 для доставки в ЖК тракт пациента. В одном из аспектов в изобретении предложено применение антагониста TNFR1 в изготовлении лекарственного средства для пероральной доставки. В одном из аспектов в изобретении предложено применение антагониста TNFR1 в изготовлении лекарственного средства для доставки в ЖК тракт пациента. В одном из воплощений переменный домен устойчив к трипсину и/или по меньшей мере одной другой протеазе, выбранной из эластазы, лейкозима и панкреатина. Например, устойчивость представляет собой устойчивость к трипсину и эластазе; трипсину и лейкозиму; трипсину и панкреатину; трипсину,

эластазе и лейкозиму; трипсину, эластазе и панкреатину; трипсину, эластазе, панкреатину и лейкозиму; или трипсину, панкреатину и лейкозиму.

В одном из аспектов в изобретении предложен антагонист TNFR1 для легочной доставки. В одном из аспектов в изобретении предложен антагонист TNFR1 для доставки в легкое пациента. В одном из аспектов в изобретении предложено применение антагониста TNFR1 в изготовлении лекарственного средства для легочной доставки. В одном из аспектов в изобретении предложено применение антагониста TNFR1 в изготовлении лекарственного средства для доставки в легкое пациента. В одном из воплощений вариабельный домен устойчив к лейкозиму.

В одном из аспектов в изобретении предложен способ пероральной доставки или доставки лекарственного средства в ЖК тракт пациента или в легкое или легочную ткань пациента, который включает введение пациенту фармацевтически эффективного количества антагониста TNFR1 по изобретению.

В одном из аспектов в изобретении предложен антагонист TNFR1 по изобретению для лечения и/или профилактики воспалительного состояния. В одном из аспектов в изобретении предложено применение антагониста TNFR1 в изготовлении лекарственного средства для лечения и/или профилактики воспалительного состояния. В одном из воплощений состояние выбрано из группы, состоящей из артрита, рассеянного склероза, воспалительного заболевания кишечника и хронического обструктивного заболевания легких. Например, указанный артрит представляет собой ревматоидный артрит или юношеский ревматоидный артрит. Например, указанное воспалительное заболевание кишечника выбрано из группы, состоящей из болезни Крона и неспецифического язвенного колита. Например, указанное хроническое обструктивное заболевание легких выбрано из группы, состоящей из хронического бронхита, хронического обструктивного бронхита и эмфиземы. Например, указанная пневмония представляет собой бактериальную пневмонию. Например, указанная бактериальная пневмония представляет собой стафилококковую пневмонию.

В одном из аспектов в изобретении предложен антагонист TNFR1 для лечения и/или профилактики респираторного заболевания. В одном из аспектов в изобретении предложено применение антагониста TNFR1 в изготовлении лекарственного средства для лечения и/или профилактики респираторного заболевания. Например, указанное респираторное заболевание выбрано из группы, состоящей из воспаления легких, хронического обструктивного заболевания легких, астмы, пневмонии, гиперчувствительного пневмонита, легочного инфильтрата с эозинофилией, легочного заболевания вследствие факторов окружающей среды, пневмонии, бронхоэктаза, муковисцидоза, интерстициального легочного заболевания, первичной легочной гипертензии, легочной тромбоэмболии, расстройств плевры, расстройств средостения, расстройств диафрагмы, гиповентиляции, гипервентиляции, приступов апноэ во сне, острого респираторного дистресс-синдрома, мезотелиомы, саркомы, отторжения трансплантата, заболевания трансплантат против хозяина, рака легкого, аллергического ринита, аллергии, асбестоза, аспергилломы, аспергиллоза, бронхоэктаза, хронического бронхита, эмфиземы, эозинофильной пневмонии, идиопатического легочного фиброза, инвазивного пневмококкового заболевания, гриппа, нетуберкулезных микобактерий, плеврального выпота, пневмококкиоза, пневмоцидоза, пневмонии, легочного актиномикоза, легочного альвеолярного протеиноза, легочной формы сибирской язвы, отека легких, легочной эмболии, воспаления легких, легочного гистиоцитоза X, легочной гипертензии, легочного нокардиоза, легочного туберкулеза, легочного венозно-окклюзионного заболевания, ревматоидного легочного заболевания, саркоидоза и гранулематоза Вегенера. Например, заболевание представляет собой хроническое обструктивное заболевание легких (COPD). Например, заболевание представляет собой астму.

Антагонист по изобретению, содержащий агент, который ингибирует TNFR1 (например, когда агент выбран из группы, состоящей из фрагментов антитела (например, Fab фрагмент, Fab' фрагмент, Fv фрагмент (например, scFv, связанный дисульфидными связями Fv), F(ab')₂ фрагмент, dAb), лигандов и мономеров и мультимеров (например, гомо- или гетеродимеров) dAb, может быть введен локально в легочную ткань (например, легкое) субъекта с использованием любого подходящего способа. Например, агент может быть введен локально в легочную ткань путем ингаляции или интраназального введения. Для ингаляции или интраназального введения антагонист TNFR1 может быть введен с использованием распылителя, ингалятора, пульверизатора, аэрозоля, атомайзера, сухого порошкового ингалятора, ингалятора отмеренной дозы, распылителя отмеренной дозы, атомайзера отмеренной дозы, пульверизатора отмеренной дозы или другого подходящего ингалятора или устройства для интраназальной доставки. Таким образом, в одном из воплощений изобретения предложено устройство для легочной доставки, содержащее антагонист TNFR1. В одном из воплощений устройство представляет собой ингалятор или устройство для интраназальной доставки.

В одном из аспектов в изобретении предложена композиция для перорального введения, содержащая антагонист TNFR1. Композиция может представлять собой таблетку, пилюлю, капсулу, жидкость или сироп.

В одном из воплощений в изобретении предложена легочная композиция для доставки в легкое, которая содержит антагонист, полипептид или вариабельный домен по изобретению с частицами, размер которых составляет меньше 5 мкм, например меньше 4,5, 4, 3,5 или 3 мкм (например, в буфере Бриттона-Робинсона, например при pH 6,5-8,0, например при pH 7-7,5, например при pH 7 или 7,5).

В одном из воплощений предложены препараты и композиции по изобретению при pH от 6,5 до 8,0, например от 7 до 7,5, например 7, например 7,5.

Вариабельные домены в соответствии с любым из аспектов изобретения могут иметь T_m по меньшей мере 50°C, или по меньшей мере 55°C, или по меньшей мере 60°C, или по меньшей мере 65°C, или по меньшей мере 70°C. Антагонист, применение, способ, устройство или композиция по изобретению может содержать такой вариабельный домен.

В одном из аспектов изобретения полипептиды, вариабельные домены, антагонисты, композиции или препараты по изобретению, по существу, стабильны после инкубации (в концентрации полипептида или вариабельного домена 1 мг/мл) при 37-50°C в течение 14 суток в буфере Бриттона-Робинсона. В одном из воплощений по меньшей мере 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% полипептида, антагониста или вариабельного домена остаются неагрегированными после такой инкубации при 37°C. В одном из воплощений по меньшей мере 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% полипептида или вариабельного домена остаются мономерными после такой инкубации при 37°C. В одном из воплощений по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% полипептида, антагониста или вариабельного домена остаются неагрегированными после такой инкубации при 50°C. В одном из воплощений по меньшей мере 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% полипептида или вариабельного домена остаются мономерными после такой инкубации при 50°C. В одном из воплощений после любой из таких инкубаций не обнаружена агрегация полипептидов, вариабельных доменов, антагонистов. В одном из воплощений pI полипептида или вариабельного домена остается не измененной или по существу неизменной после инкубации при 37°C при концентрации полипептида или вариабельного домена 1 мг/мл в буфере Бриттона-Робинсона.

В одном из аспектов изобретения полипептиды, вариабельные домены, антагонисты, композиции или препараты по изобретению, по существу, стабильны после инкубации (при концентрации полипептида или вариабельного домена 100 мг/мл) при 4°C в течение 7 суток в буфере Бриттона-Робинсона при pH 7-7,5 (например, при pH 7 или 7,5). В одном из воплощений по меньшей мере 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 97,5, 98, 98,5, 99 или 99,5% полипептида, антагониста или вариабельного домена остаются неагрегированными после такой инкубации.

В одном из воплощений по меньшей мере 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 97,5, 98, 98,5, 99 или 99,5% полипептида или вариабельного домена остаются мономерными после такой инкубации. В одном из воплощений после любой из таких инкубаций не обнаружена агрегация полипептидов, вариабельных доменов, антагонистов.

В одном из аспектов изобретения полипептиды, вариабельные домены, антагонисты, композиции или препараты по изобретению, по существу, стабильны после распыления (при концентрации полипептида или вариабельного домена 40 мг/мл), например, при комнатной температуре, 20 или 37°C, в течение 1 ч, например в струйном распылителе, например Pari LC+ sup. В одном из воплощений по меньшей мере 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 97,5, 98, 98,5, 99 или 99,5% полипептида, антагониста или вариабельного домена остаются неагрегированными после такого распыления. В одном из воплощений по меньшей мере 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 97,5, 98, 98,5, 99 или 99,5% полипептида или вариабельного домена остаются мономерными после такого распыления. В одном из воплощений после любого из таких распылений не обнаружена агрегация полипептидов, вариабельных доменов, антагонистов.

Вариабельные домены по любому из аспектов изобретения могут нейтрализовать стимулированное TNF α высвобождение IL-8 в анализе на клетках MRC-5 с ND₅₀ от 2 нМ до 50 пМ. Антагонист, применение, способ, устройство или препарат по изобретению может содержать такой вариабельный домен.

В одном из аспектов в изобретении предложена выделенная или рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, содержащий иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен по любому из аспектов изобретения, или кодирующая полипептид, антагонист или вариабельный домен по любому из аспектов изобретения. В одном из аспектов в изобретении предложен вектор, содержащий эту нуклеиновую кислоту. В одном из аспектов в изобретении предложена клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту или вектор. В одном из аспектов в изобретении предложен способ продуцирования полипептида, содержащего иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен, который включает поддержание клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии указанной нуклеиновой кислоты или вектора, посредством чего продуцируется полипептид, содержащий иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен. Способ может дополнительно включать выделение полипептида, вариабельного домена или антагониста и возможно продуцирование варианта, например мутантного варианта, обладающего улучшенной аффинностью и/или ND₅₀ по сравнению с выделенным полипептидом, вариабельным доменом или антагонистом. В области техники известны способы улучшения аффинности связывания иммуноглобулинового единичного вариабельного домена, например способы созревания аффинности.

В одном из аспектов в изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая иммуноглобулиновый единичный вариабельный домен, полипептид или антагонист по любому из аспектов

изобретения, и фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель.

В одном из воплощений иммуноглобулиновый единичный варибельный домен или антагонист по любому из аспектов изобретения содержит константный домен антитела, например Fc антитела, возможно, где N-конец Fc связан (возможно непосредственно связан) с C-концом варибельного домена.

Полипептид или варибельный домен по изобретению может быть выделенным и/или рекомбинантным.

Здесь описан способ селекции протеазоустойчивого пептида или полипептида. Способ включает получение репертуара пептидов или полипептидов, объединение репертуара и протеазы в условиях, подходящих для протеазной активности, и выделение пептида или полипептида, обладающего желаемой биологической активностью (например, специфическим связыванием с TNFR1), посредством чего выбирают протеазоустойчивый пептид или полипептид.

Репертуар и протеазу, как правило, инкубируют в течение периода времени, составляющего по меньшей мере приблизительно 30 мин. В способе может быть использована любая желаемая протеаза, такая как одна или более чем одна из следующих: сериновая протеаза, цистеиновая протеаза, аспартат-протеазы, тиоловые протеазы, матриксная металлопротеиназа, карбоксипептидаза (например, карбоксипептидаза А, карбоксипептидаза В), трипсин, химоотрипсин, пепсин, папаин, эластаза, лейкозим, панкреатин, тромбин, плазмин, катепсины (например, катепсин G), протеиназа (например, протеиназа 1, протеиназа 2, протеиназа 3), термолизин, химозин, энтеропептидаза, каспаза (например, каспаза 1, каспаза 2, каспаза 4, каспаза 5, каспаза 9, каспаза 12, каспаза 13), калпаин, фикаин, клострипаин, актинидаин, бромелаин и сепараза. В конкретных воплощениях протеаза представляет собой трипсин, эластазу или лейкозим. Протеаза также может также содержаться в биологическом экстракте, биологическом гомогенате или биологическом препарате. Если желательно, способ дополнительно включает добавление ингибитора протеазы к комбинации репертуара и протеазы после завершения инкубирования.

В некоторых воплощениях пептид или полипептид, обладающий желаемой биологической активностью, выделяют на основе связывающей активности. Например, пептид или полипептид может быть выделен на основе связывания общего лиганда, такого как белок А, белок G или белок L. Связывающая активность может также представлять собой специфическое связывание с целевым лигандом. Примеры целевых лигандов включают AroE, Aro-SAA, BDNF, кардиотрофин-1, CEA, CD40, лиганд CD40, CD56, CD38, CD138, EGF, EGF рецептор, ENA-78, эотаксин, эотаксин-2, Exodus-2, FAP α , кислый FGF, основной FGF, фактор роста фибробластов-10, лиганд FLT3, фракталкин (CX3C), GDNF, G-CSF, GM-CSF, GF- β 1, человеческий альбумин сыворотки крови, инсулин, IFN- γ , IGF-I, IGF-II, IL-1 α , IL-1 β , рецептор IL-1, рецептор IL-1 тип 1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (72 а.к.), IL-8 (77 а.к.), IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 (IGKF), ингибин α , ингибин β , IP-10, фактор роста кератиноцитов-2 (KGF-2), KGF, лептин, LIF, лимфотацин, ингибирующее вещество Mullerian, моноцитарный колониеингибирующий фактор, белок-аттрактант моноцитов, M-CSF, MDC (67 а.к.), MDC (69 а.к.), MCP-1 (MCAF), MCP-2, MCP-3, MCP-4, MDC (67 а.к.), MDC (69 а.к.), MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α , MIP-3 β , MIP-4, миелоидный предшественник ингибирующего фактора-1 (MPlF-1), NAP-2, неуртурин, фактор роста нервов, β -NGF, NT-3, NT-4, онкостатин М, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PF-4, RANTES, SDF1 α , SDF1 β , SCF, SCGF, фактор стволовых клеток (SCF), TARC, TGF- α , TGF- β , TGF- β 2, TGF- β 3, фактор некроза опухоли (TNF), TNF- α , TNF- β , TNF рецептор I, TNF рецептор II, TNIL-1, TPO, VEGF, VEGF A, VEGF B, VEGF C, VEGF D, VEGF рецептор 1, VEGF рецептор 2, VEGF рецептор 3, GCP-2, GRO/MGSA, GRO- β , GRO- γ , HCC1, 1-309, HER 1, HER 2, HER 3, HER 4, альбумин сыворотки крови, vWF, амилоидные белки (например, амилоид альфа), MMP12, PDK1, IgE, IL-13R α 1, IL-13Ra2, IL-15, IL-15R, IL-16, IL-17R, IL-17, IL-18, IL-18R, IL-23, IL-23R, IL-25, CD2, CD4, CD11a, CD23, CD25, CD27, CD28, CD30, CD40, CD40L, CD56, CD138, ALK5, EGFR, FcER1, TGF β , CCL2, CCL18, CEA, CR8, CTGF, CXCL12 (SDF-1), химаза, FGF, фурин, эндотелин-1, эотаксины (например, эотаксин, эотаксин-2, эотаксин-3), GM-CSF, ICAM-1, ICOS, IgE, IFN α , I-309, интегрин, L-селектин, MIF, MIP4, MDC, MCP-1, MMP, эластазу нейтрофилов, остеопонтин, OX-40, PARC, PD-1, RANTES, SCF, SDF-1, siglec8, TARC, TGF β , тромбин, Tim-1, TNF, TRANCE, триптазу, VEGF, VLA-4, VCAM, α 4 β 7, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR8, alphavbeta6, alphavbeta8, cMET, CD8, vWF, амилоидные белки (например, амилоид альфа), MMP12, PDK1 и IgE.

В конкретных воплощениях пептид или полипептид выделяют путем пэннинга.

В некоторых воплощениях репертуар включает дисплейную систему. Например, дисплейная система может представлять собой бактериофаговый дисплей, рибосомальный дисплей, эмульсионную компартментализацию и дисплей, дрожжевой дисплей, пуромициновый дисплей, бактериальный дисплей, плазмидный дисплей или ковалентный дисплей. Дисплейные системы связывают кодирующую функцию нуклеиновой кислоты и функциональные характеристики пептида или полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой. В конкретных воплощениях система дисплея включает реплицируемые генетические комплексы.

В некоторых воплощениях система дисплея включает бактериофаговый дисплей. Например, бактериофаг может представлять собой fd, M13, лямбда, MS2 или T7. В конкретных воплощениях система бактериофагового дисплея является мультивалентной. В некоторых воплощениях пептид или полипеп-

тид экспонируется в виде слитого белка рIII.

В других воплощениях способ дополнительно включает амплификацию нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид или полипептид, обладающий желаемой биологической активностью. В конкретных воплощениях нуклеиновая кислота амплифицируется путем амплификации фага, роста клеток или полимеразной цепной реакции.

В некоторых воплощениях репертуар представляет собой репертуар иммуноглобулиновых единичных переменных доменов. В конкретных воплощениях иммуноглобулиновый единичный переменный домен представляет собой переменный домен тяжелой цепи. В конкретных воплощениях переменный домен тяжелой цепи представляет собой переменный домен тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина. В других воплощениях иммуноглобулиновый единичный переменный домен представляет собой переменный домен легкой цепи. В конкретных воплощениях переменный домен легкой цепи представляет собой переменный домен легкой цепи человеческого иммуноглобулина.

В еще одном аспекте предложен способ селекции пептида или полипептида, связывающего целевой лиганд (например, TNFR1) с высокой аффинностью, из репертуара пептидов или полипептидов. Способ включает получение репертуара пептидов или полипептидов, объединение этого репертуара и протеазы в условиях, подходящих для протеазной активности, и выделение пептида или полипептида, связывающих целевой лиганд.

Репертуар и протеазу, как правило, инкубируют в течение периода, составляющего по меньшей мере приблизительно 30 мин. В способе может быть использована любая желаемая протеаза, такая как одна или более чем одна из следующих: сериновая протеаза, цистеиновая протеаза, аспартатпротеазы, тиоловые протеазы, матриксная металлопротеиназа, карбоксипептидаза (например, карбоксипептидаза А, карбоксипептидаза В), трипсин, химотрипсин, пепсин, папаин, эластаза, лейкозим, панкреатин, тромбин, плазмин, катепсины (например, катепсин G), протеиназа (например, протеиназа 1, протеиназа 2, протеиназа 3), термолизин, химозин, энтеропептидаза, каспаза (например, каспаза 1, каспаза 2, каспаза 4, каспаза 5, каспаза 9, каспаза 12, каспаза 13), калпаин, фикаин, клострипаин, актинодаин, бромелаин и сепараза. В конкретных воплощениях протеаза представляет собой трипсин, эластазу или лейкозим. Протеаза может также содержаться в биологическом экстракте, биологическом гомогенате или биологическом препарате. Если желательно, способ дополнительно включает добавление ингибитора протеазы к комбинации репертуара и протеазы после завершения инкубации.

Пептид или полипептид может быть выделен на основе связывания любого желаемого целевого лиганда, такого как раскрытые здесь целевые лиганды (например, TNFR1). В конкретных воплощениях пептид или полипептид выделяют путем пэннинга.

В некоторых воплощениях репертуар содержит дисплейную систему. Например, система дисплея может представлять собой бактериофаговый дисплей, рибосомальный дисплей, эмульсионную компартиментализацию и дисплей, дрожжевой дисплей, пуромидиновый дисплей, бактериальный дисплей, плазмидный дисплей или ковалентный дисплей. Дисплейные системы связывают кодирующую функцию нуклеиновой кислоты и функциональные характеристики пептида или полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой. В конкретных воплощениях дисплейная система содержит реплицируемые генетические комплексы.

В некоторых воплощениях дисплейная система содержит бактериофаговый дисплей. Например, бактериофаг может представлять собой fd, M13, лямбда, MS2 или T7. В конкретных воплощениях система бактериофагового дисплея является мультивалентной. В некоторых воплощениях пептид или полипептид экспонируется в виде слитого белка рIII.

В других воплощениях способ дополнительно включает амплификацию нуклеиновой кислоты, кодирующей пептид или полипептид, которые обладают желаемой биологической активностью. В конкретных воплощениях нуклеиновая кислота амплифицируется посредством фаговой амплификации, роста клеток или полимеразной цепной реакции.

В некоторых воплощениях репертуар представляет собой репертуар иммуноглобулиновых единичных переменных доменов. В конкретных воплощениях иммуноглобулиновый единичный переменный домен представляет собой переменный домен тяжелой цепи. В конкретных воплощениях переменный домен тяжелой цепи представляет собой переменный домен тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина. В других воплощениях иммуноглобулиновый единичный переменный домен представляет собой переменный домен легкой цепи. В конкретных воплощениях переменный домен легкой цепи представляет собой переменный домен легкой цепи человеческого иммуноглобулина.

В еще одном аспекте здесь описан способ продуцирования репертуара протеазоустойчивых пептидов или полипептидов. Способ включает получение репертуара пептидов или полипептидов, объединение репертуара пептидов или полипептидов и протеазы в условиях, подходящих для активности протеазы, и выделение множества пептидов или полипептидов, обладающих желаемой биологической активностью, посредством чего продуцируется репертуар протеазоустойчивых пептидов или полипептидов.

В некоторых воплощениях репертуар и протеазу инкубируют в течение периода времени по меньшей мере приблизительно 30 мин. Например, протеаза, используемая в способе, может представлять собой одну или более чем одну из следующих: сериновая протеаза, цистеиновая протеаза, аспартатпротеа-

зы, тиоловые протеазы, матриксная металлопротеиназа, карбоксипептидаза (например, карбоксипептидаза А, карбоксипептидаза В), трипсин, химотрипсин, пепсин, папаин, эластаза, лейкозим, панкреатин, тромбин, плазмин, катепсины (например, катепсин G), протеиназа (например, протеиназа 1, протеиназа 2, протеиназа 3), термолизин, химозин, энтеропептидаза, каспаза (например, каспаза 1, каспаза 2, каспаза 4, каспаза 5, каспаза 9, каспаза 12, каспаза 13), калпаин, фикаин, клострипаин, актинидаин, бромелаин и сепараза. В конкретных воплощениях протеаза представляет собой трипсин, эластазу или лейкозим. Протеаза может также быть представлена в биологическом экстракте, биологическом гомогенате или биологическом препарате. Если желательно, то способ дополнительно включает добавление ингибитора протеазы к комбинации репертуара и протеазы после завершения инкубации.

В некоторых воплощениях множество пептидов или полипептидов, обладающих желаемой биологической активностью, выделяют на основе связывающей активности. Например, множество пептидов или полипептидов может быть выделено на основе связывания типичного лиганда, такого как белок А, белок G или белок L. Связывающая активность может также представлять собой специфическое связывание с лигандом-мишенью, таким как описанный здесь лиганд. В конкретных воплощениях множество пептидов или полипептидов, обладающих желаемой биологической активностью, выделяют путем пэннинга.

В некоторых воплощениях репертуар содержит дисплейную систему.

Например, дисплейная система может представлять собой бактериофаговый дисплей, рибосомальный дисплей, эмульсионную компартментализацию и дисплей, дрожжевой дисплей, пуромидиновый дисплей, бактериальный дисплей, плазмидный дисплей или ковалентный дисплей. В конкретных воплощениях система дисплея связывает кодирующую функцию нуклеиновой кислоты и функциональные характеристики пептида или полипептида, кодируемого нуклеиновой кислотой. В конкретных воплощениях дисплейная система содержит реплицируемые генетические комплексы.

В некоторых воплощениях дисплейная система содержит бактериофаговый дисплей. Например, бактериофаг может представлять собой fd, M13, лямбда, MS2 или T7. В конкретных воплощениях система бактериофагового дисплея является многовалентной. В некоторых воплощениях пептид или полипептид экспонируется в виде слитого белка рIII.

В других воплощениях способ дополнительно включает амплификацию нуклеиновых кислот, кодирующих множество пептидов или полипептидов, обладающих желаемой биологической активностью. В конкретных воплощениях нуклеиновые кислоты амплифицируются путем фаговой амплификации, роста клеток или полимеразной цепной реакции.

В некоторых воплощениях репертуар представляет собой репертуар иммуноглобулиновых единичных переменных доменов. В конкретных воплощениях иммуноглобулиновый единичный переменный домен представляет собой переменный домен тяжелой цепи. В конкретных воплощениях переменный домен тяжелой цепи представляет собой переменный домен тяжелой цепи человеческого иммуноглобулина. В других воплощениях иммуноглобулиновый единичный переменный домен представляет собой переменный домен легкой цепи. В конкретных воплощениях переменный домен легкой цепи представляет собой переменный домен легкой цепи человеческого иммуноглобулина.

В еще одном аспекте здесь описан способ селекции из репертуара протеазоустойчивого полипептида, содержащего иммуноглобулиновый единичный переменный домен (dAb), который связывает целевой лиганд (например, TNFR1). В одном из воплощений способ включает получение системы фагового дисплея, содержащей репертуар полипептидов, содержащих иммуноглобулиновый единичный переменный домен, объединение системы фагового дисплея и протеазы, выбранной из группы, состоящей из эластазы, лейкозима и трипсина, в условиях, подходящих для протеазной активности, и выделение фага, экспонирующего полипептид, содержащий иммуноглобулиновый единичный переменный домен, который связывает целевой лиганд.

В некоторых воплощениях протеазу используют в концентрации 100 мкг/мл, и объединенные систему фагового дисплея и протеазу инкубируют приблизительно при 37°C в течение ночи.

В некоторых воплощениях фаг, экспонирующий полипептид, содержащий иммуноглобулиновый единичный переменный домен, который связывает целевой лиганд, выделяют путем связывания с указанной мишенью. В других воплощениях фаг, который экспонирует полипептид, содержащий иммуноглобулиновый единичный переменный домен, который связывает целевой лиганд, выделяют путем пэннинга.

Также описан выделенный протеазоустойчивый пептид или полипептид, селективируемый или селективированный при помощи описанных здесь способов. В конкретном воплощении предложен выделенный протеазоустойчивый (например, к трипсину, эластазе, лейкозиму) иммуноглобулиновый единичный переменный домен (например, переменный домен тяжелой цепи человеческого антитела, переменный домен легкой цепи человеческого антитела), селективируемый или селективированный при помощи описанных здесь способов.

Далее здесь описаны выделенная или рекомбинантная нуклеиновая кислота, которая кодирует протеазоустойчивый пептид или полипептид (например, устойчивый к трипсину, эластазе, или лейкозиму иммуноглобулиновый единичный переменный домен), селективируемый или селективированный при по-

мощи описанных здесь способов, и вектора (например, экспрессирующие вектора) и клетки-хозяева, содержащие эти нуклеиновые кислоты.

Здесь далее описан способ получения протеазоустойчивого пептида или полипептида (например, устойчивого к трипсину, эластазе или лейкозиму иммуноглобулинового единичного переменного домена), селективируемого или селектированного при помощи описанных здесь способов, включающий поддержание клетки-хозяина, которая содержит рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую протеазоустойчивый пептид или полипептид, в условиях, подходящих для экспрессии, посредством чего продуцируется протеазоустойчивый пептид или полипептид.

Здесь дополнительно описан протеазоустойчивый пептид или полипептид (например, устойчивый к трипсину, эластазе или лейкозиму иммуноглобулиновый единичный переменный домен), селективируемый или селектированный при помощи описанных здесь способов, для применения в медицине (например, для терапии или диагностики). Здесь дополнительно описано применение протеазоустойчивого пептида или полипептида (например, устойчивого к трипсину, эластазе или лейкозиму иммуноглобулинового единичного переменного домена), селективируемого или селектированного при помощи описанных здесь способов, для изготовления лекарственного средства для лечения заболевания. Здесь дополнительно описан способ лечения заболевания, включающий введение нуждающемуся в этом субъекту эффективного количества протеазоустойчивого пептида или полипептида (например, устойчивого к трипсину, эластазе или лейкозиму иммуноглобулинового единичного переменного домена), селективируемого или селектированного при помощи описанных здесь способов.

Здесь дополнительно описан диагностический набор для определения того, присутствует ли в образце TNFR1 или насколько много TNFR1 присутствует в образце, содержащий полипептид, иммуноглобулиновый переменный домен (dAb) или антагонист по изобретению и инструкции по применению (например, для определения присутствия и/или количества TNFR1 в образце). В некоторых воплощениях набор дополнительно содержит один или более чем один вспомогательный реагент, такой как подходящий буфер или подходящий детектирующий реагент (например, детектируемое меченое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывает полипептид или dAb по изобретению или группировку, ассоциированную или конъюгированную с ним).

Изобретение также относится к устройству, содержащему твердую поверхность, на которой иммобилизован полипептид, антагонист или dAb по изобретению, таким образом, что иммобилизованный полипептид или dAb связывается с TNFR1. Могут быть использованы любые подходящие твердые поверхности, на которых может быть иммобилизовано антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, например стекло, пластики, углеводороды (например, агарозные шарики). Если желательно, подложка может содержать или может быть модифицирована таким образом, чтобы содержать желаемые функциональные группы для облегчения иммобилизации. Устройство и/или подложка могут обладать любой подходящей формой, например формой листа, прута, ленты, пластины, слайда, шарика, гранулы, диска, геля, трубки, сферы, чипа, пластины или чашки и т.п. В некоторых воплощениях устройство представляет собой тест-полоску.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1 представляет собой иллюстрацию сайта множественного клонирования pDOM13 (также известного как pDOM33), который использовали для получения фаг-дисплейного репертуара.

На фиг. 2 показаны несколько гелей Novex 10-20% Tricine с образцами dAb, отобранными в разные моменты времени, которые инкубировали с трипсином в концентрации 40 мкг/мл при 30°C. Образцы отбирали непосредственно перед добавлением трипсина и затем через 1, 3 и 24 ч после добавления трипсина. Белки окрашивали с помощью 1× SureBlue. Гели иллюстрируют, что и DOM15-10, и DOM15-26-501, оба, подвергались значительному перевариванию в течение первых 3 ч инкубации с трипсином. Переваривание DOM15-26, DOM4-130-54 и DOM1h-131-511 становилось заметным только через 24 ч инкубации с трипсином.

Фиг. 3 представляет собой иллюстрацию аминокислотных последовательностей DOM1h-131-511 и 24 селектированных вариантов. Аминокислоты в селектированных клонах, которые отличаются от родительской последовательности, указаны (идентичные аминокислоты обозначены точками). Петли, соответствующие CDR1 (гиперпеременная область 1), CDR2 и CDR3, обведены рамками.

Фиг. 4 представляет собой иллюстрацию аминокислотных последовательностей DOM4-130-54 и 27 селектированных вариантов. Аминокислоты в селектированных клонах, которые отличаются от родительской последовательности, указаны (идентичные аминокислоты обозначены точками). Петли, соответствующие CDR1, CDR2 и CDR3, обведены рамками.

Фиг. 5 представляет собой иллюстрацию аминокислотной последовательности DOM15-26-555 и 21 селектированного варианта. Аминокислоты в селектированных клонах, которые отличаются от родительской последовательности, указаны (идентичные аминокислоты обозначены точками). Петли, соответствующие CDR1, CDR2 и CDR3, обведены рамками.

Фиг. 6 представляет собой иллюстрацию аминокислотной последовательности DOM15-10 и 16 селектированных вариантов. Аминокислоты в селектированных клонах, которые отличаются от родительской последовательности, указаны (идентичные аминокислоты обозначены точками). Петли, соответ-

вующие CDR1, CDR2 и CDR3, обведены рамками.

Фиг. 7A-7D представляют собой кривые ВІАсоге, показывающие связывание родительского dAb, DOM1h-131-511 (фиг. 7A), и трех вариантов dAb, DOM1h-131-203 (фиг. 7B), DOM1h-131-204 (фиг. 7C) и DOM1h-131-206 (фиг. 7D), с иммобилизованным TNFR1 после инкубации с различными концентрациями трипсина (варьирующими от 0 до 100 мкг/мл) в течение ночи при 37°C. Результаты демонстрируют, что все три варианта более устойчивы, чем родительское антитело, к протеолизу при высоких концентрациях трипсина (100 мкг/мл).

Фиг. 8A-8C представляют собой кривые ВІАсоге, показывающие связывание dAb DOM1h-131-511 (фиг. 8A), DOM1h-131-202 (фиг. 8B) и DOM1h-131-206 (фиг. 8C) с иммобилизованным TNFR1 после инкубации с эластазой и лейкозимом в течение ночи. Эти dAb продемонстрировали повышенную устойчивость к протеолизу по сравнению с родительским антителом против эластазы и лейкозима.

На фиг. 9 показаны два геля 4-12% Novex Bis-Tris с образцами dAb DOM1h-131-511, DOM1h-131-203, DOM1h-131-204, DOM1h-131-206, DOM1h-131-54, DOM1h-131-201 и DOM1h-131-202 перед инкубацией с трипсином, и образцами после инкубации с 100 мкг/мл трипсина в течение 1, 3 и 24 ч.

Фиг. 10A-10C представляют собой кривые ВІАсоге, показывающие связывание DOM4-130-54 (фиг. 10A), DOM4-130-201 (фиг. 10B) и DOM4-130-202 (фиг. 10C) с иммобилизованным слитым белком IL-1R1 после инкубации с различными концентрациями трипсина (варьирующими от 0 до 100 мкг/мл) в течение ночи при 37°C. Результаты демонстрируют, что оба варианта более устойчивы, чем родительское антитело, к протеолизу при высоких концентрациях трипсина.

Фиг. 11A-11C представляют собой кривые ВІАсоге, показывающие связывание DOM4-130-54 (фиг. 11A), DOM4-130-201 (фиг. 11B) и DOM4-130-202 (фиг. 11C) с иммобилизованным слитым белком IL-1R1 после инкубации с эластазой и лейкозимом в течение ночи. Эти dAb продемонстрировали повышенную устойчивость к протеолизу по сравнению с родительским антителом против обеих тестируемых протеаз.

Фиг. 12 представляет собой иллюстрацию аминокислотной последовательности DOM15-26-555 и 6 вариантов. Аминокислоты, которые отличаются от родительской последовательности, в селективированных клогах указаны (идентичные аминокислоты обозначены точками).

Фиг. 13A и 13B представляют собой кривые ВІАсоге, показывающие связывание родительского dAb, DOM15-26-555 (фиг. 13A), и наиболее протеазоустойчивого варианта, DOM15-26-593 (фиг. 13B), с иммобилизованным VEGF. Родительское антитело и вариант сравнивали на ВІАсоге в отношении связывания с hVEGF (VEGF человека) при концентрации dAb 100 нМ после инкубации с трипсином в концентрации 200 мкг/мл. Реакцию осуществляли в течение 3 ч или 24 ч при 37°C. Результаты демонстрируют, что вариант более устойчив, чем родительское антитело, к протеолизу после 24-часовой обработки трипсином.

Фиг. 14 представляет собой график, показывающий влияние обработки трипсином на связывание вариантов DOM15-26-555 с hVEGF. Результаты ясно демонстрируют, что все варианты более устойчивы, чем родительское антитело (DOM15-26-555), к протеолизу после 24-часовой обработки трипсином.

На фиг. 15 показаны два геля Novex 10-20% Tricine, на которые наносили по 15 мкг обработанных и необработанных образцов DOM15-26-555 или DOM15-26-593. Образцы отбирали непосредственно перед добавлением трипсина и затем через 1, 3 и 24 ч после добавления трипсина. Белки окрашивали с помощью 1× SureBlue. Гели иллюстрируют, что профиль устойчивости к трипсину для DOM15-26-593 отличается от профиля, продемонстрированного ВІАсоге экспериментом.

Фиг. 16 представляет собой иллюстрацию аминокислотной последовательности DOM15-10 и варианта, DOM15-10-11. Аминокислоты, которые в этом варианте отличаются от родительской последовательности, указаны (идентичные аминокислоты обозначены точками).

Фиг. 17A и 17B представляют собой кривые ВІАсоге, показывающие связывание родительского антитела DOM15-10 (фиг. 17A), и варианта, DOM15-10-11 (фиг. 17B), с иммобилизованным VEGF. Родительское антитело и вариант сравнивали на ВІАсоге в отношении связывания с hVEGF при концентрации dAb 100 нМ после инкубации с трипсином в концентрации 200 мкг/мл. Реакцию осуществляли в течение 1, 3 и 24 ч при 37°C. Результаты демонстрируют, что вариант более устойчив, чем родительское антитело, к протеолизу после 24-часовой обработки трипсином.

На фиг. 18 показаны два геля Novex 10-20% Tricine, на которые наносили по 15 мкг образцов DOM15-10 и DOM15-10-11. Образцы отбирали непосредственно перед добавлением трипсина и затем через 1, 3 и 24 ч после добавления трипсина. Белки окрашивали с помощью SureBlue (1×). Результаты демонстрируют, что связывающая активность, обнаруженная в ВІАсоге исследовании, непосредственно отражает целостность белка.

Фиг. 19A-19L иллюстрируют нуклеотидные последовательности нескольких нуклеиновых кислот, кодирующих dAb, которые представляют собой варианты DOM1h-131-511 или DOM4-130-54. Нуклеотидные последовательности кодируют аминокислотные последовательности, представленные соответственно на фиг. 3 и 4.

Фиг. 20A-20E иллюстрируют нуклеотидные последовательности нескольких нуклеиновых кислот, кодирующих dAb, которые представляют собой варианты DOM15-26-555 или DOM15-10. Нуклеотидные

последовательности кодируют аминокислотные последовательности, представленные соответственно на фиг. 5 и 6.

На фиг. 21 показана карта вектора pDOM38.

На фиг. 22 показан гель (Labchip) с белками DOM10-53-474 и DOM15-26-593, обработанными трипсином при соотношении dAb:трипсин 25:1 при 30°C в различные моменты времени. Стрелки указывают на полноразмерный белок.

На фиг. 23 представлены кривые гель-фильтрации (SEC), демонстрирующие высокий уровень чистоты, полученный для каждого образца после очистки посредством ММС-хроматографии, затем анионного обмена. УФ контролировали при 225 нм и через колонку пропускали 1× PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор) с 10% этанола (об./об.). Процентное содержание мономера рассчитывали посредством интегрирования площади пика с учетом фона.

На фиг. 24 представлены данные по стабильности к протеазам для DOM1h-131-511, DOM1h-131-202 и DOM1h-131-206.

На фиг. 25 представлены результаты SEC, которые иллюстрируют данные по стабильности DOM1h-131-202, DOM1h-131-206 и DOM1h-131-511 в течение 14 суток в буфере Бриттона-Робинсона при 37 и 50°C. Концентрация белка для всех dAb составляла 1 мг/мл. SEC использовали для определения того, произошли ли какие-либо изменения в белке во время теплового стресса и в количестве мономера, остающегося в растворе, по сравнению с образцом на момент времени 0 (T₀).

На фиг. 26 A-I показаны SEC кривые, демонстрирующие влияние теплового стресса (37 и 50°C) на DOM1h-131-511 (A-C), -202 (D-F) и -206 (G-I). Также показан процент мономера, остающегося в растворе, относительно T=0 в заданный момент времени.

На фиг. 27 показан IEF (изоэлектрофокусирование) анализ DOM1h-131-202, DOM1h-131-206 и DOM1h-131-511 на 24, 48 ч и 7-е и 14-е сутки теплового стресса. Образцы инкубировали либо при 37, либо при 50°C в буфере Бриттона-Робинсона.

Фиг. 28: RBA (receptor binding assay, анализ связывания с рецептором) с TNFR-1, демонстрирующий влияние 14-суточной инкубации DOM1h-131-202, DOM1h-131-206 и DOM1h-131-511 при 50°C. Концентрацию белка считали равной 1 мг/мл. Также показано отрицательное контрольное dAb (имитация (dummy) VH), которое не связывалось с антигеном.

На фиг. 29 проиллюстрированы эффекты хранения A: DOM1h-131-202, B: DOM1h-131-206 и C: DOM1h-131-511 в концентрации примерно 100 мг/мл в течение 7 суток в буфере Бриттона-Робинсона при 4°C. УФ контролировали при 280 нм.

На фиг. 30 показаны данные тестирования DOM1h-131-202, DOM1h-131-206 и DOM1h-131-511 с использованием небулайзеров Pari E-flow и LC+. Концентрация белка в каждом случае составляла 5 мг/мл в буфере Бриттона-Робинсона.

На фиг. 31 проиллюстрированы относительные процентные изменения концентраций мономера в процессе распыления DOM1h-131-202, DOM1h-131-206 и DOM1h-131-511 в буфере Бриттона-Робинсона при 5 мг/мл.

На фиг. 32 показаны SEC кривые для DOM1h-131-206 и DOM1h-131-511 в буфере Бриттона-Робинсона после распыления из Pari LC+.

На фиг. 33 показаны SEC кривые для DOM1h-131-206 в процессе распыления в течение 1 ч при 40 мг/мл в PBS. Белки, находящиеся как в колпачке небулайзера, так и в аэрозоле, обладают высокой устойчивостью к эффектам сдвига и теплового стресса, которым может подвергаться dAb при распылении.

На фиг. 34 показаны кривые скорости седиментации для каждого из трех основных белков (DOM1h-131-206, DOM1h-131-511 и DOM1h-131-202). Бимодальный пик, наблюдаемый для образца с более низкой концентрацией, DOM1h-131-206, в этом случае представляет собой артефакт вследствие утечки образца из ячейки.

На фиг. 35 показано влияние буфера и устройства на размер капли при распылении GSK1995056A (DOM1h-131-511).

Фиг. 36: стабильность GSK1995056A (DOM1h-131-511) после распыления в различных устройствах, оцениваемая по образованию димеров, как измерено с использованием SEC.

На фиг. 37 показаны данные тестирования GSK1922567A (202), GSK1995057A (206) и GSK1995056A (511) с использованием небулайзеров Pari E-flow и LC+. А) тестирование в буфере Бриттона-Робинсона, В) тестирование в ПЭГ1000/сахарозном буфере.

На фиг. 38 изображена кривая зависимости от дозы TNF- α , полученная в анализе связывания с рецептором TNFR1 человека. Каждый образец тестировали в четырех повторах.

На фиг. 39 показано ингибирование посредством GSK1922567A (DOM1h-131-202), GSK1995057A (DOM1h-131-206) и GSK1995056A (DOM1h-131-511) в анализе связывания с рецептором TNFR1 человека. Каждый образец тестировали в четырех повторах.

На фиг. 40 проиллюстрирована эффективность dAb DOM15-26 и DOM15-26-593 в RBA с VEGF.

На фиг. 41 показаны фармакокинетические данные для DMS1529 (DOM15-26-593) и DMS1545 (DOM15-26-501) после однократного в/в (внутривенного) введения болюсной дозы крысам в концентра-

ции 5 мг/мг.

На фиг. 42a показан SEC-MALLS (гель-хроматография/многоугловое лазерное светорассеяние) анализ слитой конструкции DMS1529F-C (слитой конструкции DOM15-26-593 Fc), подтверждающий мономерные свойства. Показаны две разные партии, которые демонстрируют похожие свойства в отношении показателя преломления (т.е. концентрации; пунктирные линии) и светорассеяния (сплошные линии). Линия, отмеченная стрелкой, показывает расчет молекулярной массы.

На фиг. 42b показан AUC (аналитическое ультрацентрифугирование) анализ слитой конструкции DMS1529 Fc (слитой конструкции DOM15-26-593 Fc), подтверждающий мономерные свойства. Одну партию вещества тестировали в трех разных концентрациях, приблизительно равных 0,2, 0,5 и 1,0 мг/мл в PBS-буфере. Анализ скорости седиментации подтвердил, что молекулярная масса составляет приблизительно 80 кДа.

На фиг. 43 показаны DSC (дифференциальная сканирующая калориметрия) кривые для DMS1529 (DOM15-26-593) и DOM15-26-501.

На фиг. 44 представлены данные ELISA (твердофазного иммуноферментного анализа) связывания с VEGF для DMS1529 (DOM15-26-593) до и после 10 циклов замораживания-оттаивания для двух разных партий вещества.

На фиг. 45 показан SEC-профиль устойчивости DOM15-26-593 до и после 10 циклов замораживания-оттаивания.

На фиг. 46 проиллюстрированы результаты ускоренного исследования стабильности для слитой конструкции DMS1529 (слитой конструкции DOM15-26-593 Fc); где связывание в ELISA демонстрирует активность через 7 суток инкубации при показанной температуре.

На фиг. 47A показана стабильность DMS1529 (DOM15-26-593) у яванского макака через 14 и 15 суток инкубации при 37°C.

На фиг. 47B показана стабильность DMS1529 (DOM15-26-593) в сыворотке человека через 14 и 15 суток инкубации при 37°C.

На фиг. 48 показана эффективность dAb DOM15-26 и DOM15-26-593 в виде Fc слияний (DMS1564 и 1529 соответственно) в RBA с VEGF.

На фиг. 49 проиллюстрировано ингибирование пролиферации клеток HUVEC (эндотелиальные клетки пупочной вены человека) слитой конструкцией DMS1529 (слитой конструкцией DOM15-26-593 Fc).

Фиг. 50: карта вектора pDom33.

На фиг. 51 изображены последовательности (аминокислотная и нуклеотидная) dAb, связывающихся с сывороточным альбумином.

Подробное описание изобретения

Изобретение раскрыто в данном описании со ссылкой на воплощения, что делает возможным составление ясного и четкого описания. Предполагается и должно быть очевидным, что данные воплощения можно различным образом комбинировать или разделять без отклонения от сущности изобретения.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют такое же значение, что и обычно понимаемое специалистом в данной области техники (например, в клеточной культуре, молекулярной генетике, химии нуклеиновых кислот, способах гибридизации и биохимии). Для молекулярных, генетических и биохимических способов используются стандартные способы (в общем см. Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed. (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. и Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology* (1999), 4th Ed, John Wiley & Sons, Inc., включенные здесь путем ссылки) и химические способы.

Используемый здесь "антагонист рецептора фактора некроза опухоли 1 (TNFR1)" или "антагонист TNFR1" и т.п. относится к агенту (например, молекуле, соединению), который связывается с TNFR1 и может ингибировать функцию (одну или более чем одну) TNFR1. Например, антагонист TNFR1 может ингибировать связывание TNF α с TNFR1 и/или ингибировать передачу сигнала, опосредованную через TNFR1. Соответственно, опосредованные TNFR1 процессы и клеточные ответы (например, индуцированная TNF α клеточная гибель в стандартном анализе цитотоксичности на клетках L929) могут ингибироваться антагонистом TNFR1.

Как использовано в данном изобретении, "пептид" относится к аминокислотам в количестве от примерно двух до примерно 50, которые соединены вместе посредством пептидных связей.

Как использовано в данном изобретении, "полипептид" относится к по меньшей мере примерно 50 аминокислотам, которые соединены вместе пептидными связями. В большинстве случаев полипептиды имеют третичную структуру и сворачиваются в функциональные домены.

Как использовано в данном изобретении, пептид или полипептид (например, однодоменное антитело (dAb)), который является "устойчивым к расщеплению протеазой", по существу, не расщепляется протеазой при инкубации с данной протеазой в условиях, подходящих для протеазной активности. Полипептид (например, dAb), по существу, не расщепляется, когда не более чем примерно 25%, не более чем примерно 20%, не более чем примерно 15%, не более чем примерно 14%, не более чем примерно 13%, не

более чем примерно 12%, не более чем примерно 11%, не более чем примерно 10%, не более чем примерно 9%, не более чем примерно 8%, не более чем примерно 7%, не более чем примерно 6%, не более чем примерно 5%, не более чем примерно 4%, не более чем примерно 3%, не более чем примерно 2%, не более чем примерно 1% белка расщепляется протеазой, или по существу никакое количество белка не расщепляется протеазой при инкубации с протеазой в течение примерно 1 ч при температуре, подходящей для протеазной активности. Например, при 37 или 50°C. Расщепление белка можно оценивать с использованием любого подходящего способа, например с использованием SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия) или функционального анализа (например, связывания с лигандом), как описано в данном патенте.

Как использовано в данном изобретении, "дисплейная система" относится к системе, в которой "коллекция" полипептидов или пептидов доступна для селекции на основании желаемой характеристики, такой как физическая, химическая или функциональная характеристика. Дисплейная система может представлять собой подходящий репертуар полипептидов или пептидов (например, в растворе, иммобилизованном на подходящей подложке). Дисплейная система также может представлять собой систему, которая использует клеточную экспрессирующую систему (например, экспрессию библиотеки нуклеиновых кислот, например, в трансформированных, инфицированных, трансфицированных или транскрибированных клетках и экспонирование кодируемых полипептидов на поверхности этих клеток) или бесклеточную экспрессирующую систему (например, эмульсионную компартментализацию и дисплей). Предпочтительные дисплейные системы связывают кодирующую функцию нуклеиновой кислоты и физические, химические и/или функциональные характеристики полипептида или пептида, кодируемого данной нуклеиновой кислотой. Если применяют такую дисплейную систему, то можно осуществлять селекцию полипептидов или пептидов, имеющих желаемую физическую, химическую и/или функциональную характеристику, и можно легко выделить или извлечь нуклеиновую кислоту, кодирующую селектированный полипептид или пептид. В данной области техники известен ряд дисплейных систем, которые связывают кодирующую функцию нуклеиновой кислоты и физические, химические и/или функциональные характеристики полипептида или пептида, например бактериофаговый дисплей (фаговый дисплей, например фагмидный дисплей), рибосомный дисплей, эмульсионная компартментализация и дисплей, дрожжевой дисплей, пурамициновый дисплей, бактериальный дисплей или плазмидный дисплей, ковалентный дисплей и т.п. (см., например, EP 0436597 (Dyax), патент США № 6172197 (McCafferty et al.), патент США № 6489103 (Griffiths et al.)).

Как использовано в данном изобретении, "репертуар" относится к коллекции полипептидов или пептидов, которые характеризуются вариабельностью аминокислотной последовательности. Индивидуальные члены репертуара могут иметь общие признаки, такие как общие структурные признаки (например, общую коровую структуру) и/или общие функциональные признаки (например, способность связываться с общим лигандом (например, типичным лигандом или целевым лигандом, TNFR1)).

Как использовано в данном изобретении, термин "функциональный" описывает полипептид или пептид, имеющий такую биологическую активность, как специфическая связывающая активность. Например, термин "функциональный полипептид" включает в себя антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с целевым антигеном посредством своего антигенсвязывающего сайта.

Как использовано в данном изобретении, "типичный лиганд" относится к лиганду, который связывается со значительной частью функциональных членов (например, по существу всеми функциональными членами) заданного репертуара. Типичный лиганд (например, общий типичный лиганд) может связываться со многими членами заданного репертуара, даже несмотря на то, что эти члены могут не обладать специфичностью связывания в отношении общего целевого лиганда. В общем случае присутствие функционального сайта связывания с типичным лигандом на полипептиде (на что указывает способность связываться с типичным лигандом) указывает на то, что полипептид надлежащим образом свернут и функционален. Подходящие примеры типичных лигандов включают суперантигены, антитела, которые связываются с эпитопом, экспрессируемым на значительной части функциональных членов репертуара, и т.п.

"Суперантиген" представляет собой термин данной области техники, который относится к типичным лигандам, взаимодействующим с членами иммуноглобулинового суперсемейства в сайте, отличающемся от сайтов связывания с целевым лигандом, расположенных на этих белках. Примерами суперантигенов являются стафилококковые энтеротоксины, которые взаимодействуют с T-клеточными рецепторами. Суперантигены, связывающиеся с антителами, включают белок G, который связывается с константной областью IgG (Bjorck and Kronvall, J. Immunol., 133: 969 (1984)); белок A, который связывается с константной областью IgG и V_H-доменами (Forsgren and Sjoquist, J. Immunol., 97: 822 (1966)); и белок L, который связывается с V_L-доменами (Bjorck, J. Immunol., 140: 1194 (1988)).

Как использовано в данном изобретении, "целевой лиганд" относится к лиганду, который специфически или селективно связывается полипептидом или пептидом. Например, если полипептид представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, то целевой лиганд может представлять собой любой желаемый антиген или эпитоп. Связывание с целевым антигеном зависит от функциональности данного полипептида или пептида.

Как оно использовано здесь, антитело относится к IgG, IgM, IgA, IgD или IgE или фрагменту (такому как Fab, F(ab')₂, Fv, связанный дисульфидными связями Fv, scFv, мультиспецифическое антитело в закрытой конформации, связанный дисульфидными связями scFv, диатело), происходящему из любого вида, в природе продуцирующего антитело, или созданному при помощи технологии рекомбинантной ДНК; выделенное из сыворотки крови, В-клеток, гибридом, трансфектом, дрожжей или бактерий.

Как использовано в данном изобретении, "формат антитела" относится к любой подходящей полипептидной структуре, в которую может быть инкорпорирован один или более переменных доменов антитела с тем, чтобы придать данной структуре специфичность связывания с антигеном. В данной области техники известен ряд подходящих форматов антител, таких как химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела, одноцепочечные антитела, биспецифические антитела, тяжелые цепи антител, легкие цепи антител, гомодимеры и гетеродимеры тяжелых цепей и/или легких цепей антител, антигенсвязывающие фрагменты любого из перечисленного выше (например, Fv-фрагмент (например, одноцепочечный Fv (scFv), связанный дисульфидной связью Fv), Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, P(ab')₂-фрагмент), единственный переменный домен антитела (например, dAb, V_H, V_{HH}, V_L) и модифицированные версии любого из перечисленного выше (например, модифицированные посредством ковалентного присоединения полиэтиленгликоля или другого подходящего полимера или гуманизированного V_{HH}).

Фраза "иммуноглобулиновый единственный переменный домен" относится к переменному домену антитела (V_H, V_{HH}, V_L), специфически связывающемуся с антигеном или эпитопом независимо от других V-областей или доменов. Иммуноглобулиновый единственный переменный домен может быть представлен в формате (например, гомо- или гетеромультимера) с другими переменными областями или переменными доменами, где другие области или домены не требуются для связывания антигена с единственным иммуноглобулиновым переменным доменом (т.е. когда иммуноглобулиновый единственный переменный домен связывается с антигеном независимо от дополнительных переменных доменов). "Однодоменное антитело" или "dAb" представляет собой то же, что и "иммуноглобулиновый единственный переменный домен", как этот термин используется в данном изобретении. Иммуноглобулиновый единственный переменный домен представляет собой то же самое, что и единственный иммуноглобулиновый переменный домен, как этот термин используется здесь. Иммуноглобулиновый единственный переменный домен в одном воплощении представляет собой переменный домен антитела человека, но также включает единичные переменные домены антител от других видов, как, например, V_{HH} dAb грызунов (например, как описано в WO 00/29004, содержание которой включено в данное описание во всей своей полноте посредством ссылки), усатых акул и верблюжьих V_{HH} dAb. Верблюжьих V_{HH} представляют собой полипептиды иммуноглобулинового единичного переменного домена, которые происходят из видов, включающих верблюда, ламу, альпаку, дромадера и гуанако, которые продуцируют антитела, состоящие из тяжелых цепей, по своей природе лишённые легких цепей.

"Домен" представляет собой свернутую белковую структуру, сохраняющую свою третичную структуру независимо от остальной части белка. В большинстве случаев домены ответственны за отдельные функциональные свойства белков и во многих случаях могут быть добавлены, удалены или перенесены в другие белки без потери функции оставшейся части белка и/или домена. Единичный переменный домен антитела представляет собой свернутый полипептидный домен, содержащий последовательности, характерные для переменных доменов антител. Следовательно, он включает полные переменные домены антител и модифицированные переменные домены, например в которых одна или более петель заменены на последовательности, не характерные для переменных доменов антител, или переменные домены антител, которые укорочены или содержат N- или C-концевые удлиняющие сегменты, а также свернутые фрагменты переменных доменов, которые сохраняют, по меньшей мере, связывающую активность и специфичность полноразмерного домена.

Термин "библиотека" относится к смеси гетерогенных полипептидов или нуклеиновых кислот. Библиотека состоит из членов, каждый из которых имеет единичную полипептидную или нуклеиновокислотную последовательность. До некоторой степени "библиотека" является синонимом "репертуару". Различия в последовательностях среди членов библиотеки ответственны за разнообразие, представленное в этой библиотеке. Библиотека может принимать форму простой смеси полипептидов или нуклеиновых кислот или может быть в форме микроорганизмов или клеток, например бактерий, вирусов, клеток животных и растений и т.п., трансформированных с использованием библиотеки нуклеиновых кислот. В одном воплощении каждый индивидуальный микроорганизм или клетка содержит только один член библиотеки или ограниченное их количество. В одном воплощении нуклеиновые кислоты инкорпорированы в экспрессирующие векторы для того, чтобы способствовать экспрессии полипептидов, кодируемых данными нуклеиновыми кислотами. Следовательно, в одном аспекте библиотека может принимать форму популяции организмов-хозяев, при этом каждый организм содержит одну или более копий экспрессирующего вектора, содержащего единственный член библиотеки в форме нуклеиновой кислоты, которая может быть экспрессирована с целью получения соответствующего ей полипептидного члена. Таким образом, популяция организмов-хозяев имеет возможность кодировать большой репертуар различающихся полипептидов.

"Универсальный каркас" представляет собой последовательность каркаса одиночного антитела, соответствующую областям антитела, консервативным в последовательности, как определено Kabat ("Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Department of Health and Human Services, 1991), или соответствующую репертуару или структуре иммуноглобулинов зародышевой линии человека, как определено в Chothia and Lesk (1987), *J. Mol. Biol.* 196: 910-917. В библиотеках и репертуарах могут использоваться одиночный каркас или набор таких каркасов, в отношении которых обнаружено, что они допускают получение производных по сути с любой специфичностью связывания посредством внесения изменений только в гипервариабельные участки.

Используемый здесь термин "доза" относится к количеству лиганда, вводимому субъекту одновременно (разовая доза), или в течение двух или более чем двух введений в течение определенного промежутка времени.

Например, доза может относиться к количеству лиганда (например, лиганда, содержащего иммуноглобулиновый единственный вариабельный домен, связывающий целевой антиген), вводимому субъекту в течение суток (24 ч) (суточная доза), двух суток, одной недели, двух недель, трех недель или одного или более чем одного месяца (например, путем разового введения, или путем двух или более чем двух введений). Интервал между дозами может представлять собой любое желаемое количество времени.

Фраза "период полувыведения" представляет собой период времени, в течение которого концентрация лиганда (например, dAb, полипептида или антагониста) в сыворотке крови уменьшается на 50% *in vivo*, например вследствие деградации лиганда и/или клиренса или разрушения лиганда при помощи природных механизмов. Лиганды по изобретению могут быть стабилизированы *in vivo*, и период их полувыведения увеличивается путем связывания с молекулами, которые устойчивы к деградации и/или клиренсу, или разрушению. Типично, такие молекулы представляют собой природные белки, которые сами обладают длительным периодом полувыведения *in vivo*. Период полувыведения лиганда увеличивается в том случае, если его функциональная активность сохраняется *in vivo* в течение более длительного периода, чем у похожего лиганда, который не специфичен в отношении молекулы, увеличивающей период полувыведения. Например, лиганд, специфический в отношении HAS (человеческого сывороточного альбумина), и молекулу-мишень сравнивают с тем же лигандом, у которого специфичность в отношении HSA отсутствует, то есть он не связывается с HAS, но связывается с другой молекулой. Например, он может связываться с третьей мишенью на клетке. Типично, период полувыведения увеличивается на 10, 20, 30, 40, 50 или более чем 50%. Возможны увеличения периода полувыведения в диапазоне 2x, 3x, 4x, 5x, 10x, 20x, 30x, 40x, 50x или более чем 50x. Альтернативно или дополнительно возможно увеличение периода полувыведения в диапазоне 30x, 40x, 50x, 60x, 70x, 80x, 90x, 100x, 150x.

Используемый здесь термин "гидродинамический размер" относится к кажущемуся размеру молекулы (например, белковой молекулы, лиганда) на основе диффузии молекулы через водный раствор. Диффузия или движение белка через раствор может быть обработано для выведения кажущегося размера белка, где размер приводится в виде "радиуса Стокса" или "гидродинамического радиуса" белковой частицы. "Гидродинамический размер" белка зависит от массы и формы (конформации) так, что два белка, обладающие одинаковой молекулярной массой, могут обладать отличающимися гидродинамическими размерами на основе общей конформации белка.

Использованный здесь термин "конкурирует" означает, что связывание первой мишени с ее штатным целевым связывающим доменом ингибируется в присутствии второго связывающего домена, специфического в отношении указанной когнатной мишени. Например, связывание может быть ингибировано стерически, например путем физического блокирования связывающего домена, или путем изменения структуры или окружения связывающего домена таким образом, что его аффинность или авидность в отношении мишени уменьшается (см. WO 2006038027 в отношении подробной информации относительно того, как осуществлять конкурентные ELISA и конкурентные эксперименты *ViaCore* для определения конкуренции между первым и вторым связывающими доменами).

Расчеты "гомологии" или "идентичности", или "близости" между двумя последовательностями (термины здесь используются взаимозаменяемо) осуществляют следующим образом. Последовательности выравнивают в целях оптимального сравнения (например, могут быть введены разрывы в одну или обе первую и вторую аминокислотную или нуклеиново-кислотную последовательности для оптимального выравнивания, а для сравнительных целей негомологичными последовательностями можно пренебречь). В одном воплощении длина референсной последовательности, выравненной для сравнительных целей, составляет по меньшей мере 30%, или по меньшей мере 40%, или по меньшей мере 50%, или по меньшей мере 60%, или по меньшей мере 70, 80, 90, 100% длины референсной последовательности. Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих аминокислотных положениях или нуклеотидных положениях. Если положение в первой последовательности занято тем же аминокислотным остатком или нуклеотидом, что и соответствующее положение во второй последовательности, тогда молекулы идентичны по этому положению (как использовано в данном описании, аминокислотная "гомология" или "гомология" нуклеиновой кислоты эквивалентна аминокислотной "идентичности" или "идентичности" нуклеиновой кислоты). Процент идентичности между двумя последовательностями

стями есть функция количества идентичных положений, общих для этих последовательностей, с учетом количества разрывов и длины каждого разрыва, которые необходимы для введения с целью оптимального выравнивания двух последовательностей. Выравнивания аминокислотной и нуклеотидной последовательности и их гомология, сходство или идентичность, как определено в данном описании, могут быть проведены и определены с использованием алгоритма для последовательностей BLAST 2 Sequences, используя параметры по умолчанию (Tatusova, T.A. et al., FEMS Microbiol. Lett, 174: 187-188 (1999)).

Способы селекции

Изобретение в одном из воплощений относится к полипептидам и dAb, селективируемым при помощи способа селекции протеазоустойчивых пептидов и полипептидов, обладающих желаемой биологической активностью. Два селективных критерия отбора используют в способе для обеспечения эффективного процесса селекции полипептидов, которые являются высокостабильными и устойчивыми к деградации протеазой и которые обладают желаемой биологической активностью. Как здесь описано, протеазоустойчивые пептиды и полипептиды, как правило, сохраняют биологическую активность. Наоборот, пептиды и полипептиды, чувствительные к протеазе, расщепляются или разрушаются протеазой в описанных здесь способах, и таким образом, утрачивают свою биологическую активность. Соответственно, протеазоустойчивые пептиды или полипептиды, как правило, отбирают на основании их биологической активности, такой как связывающая активность.

Описанные здесь способы обеспечивают несколько преимуществ. Например, как здесь раскрыто и примеры чего здесь приведены, переменные домены, антагонисты, пептиды или полипептиды, отобранные по их устойчивости к протеолитической деградации одной из протеаз (например, трипсином), также устойчивы к деградации другими протеазами (например, эластазой, лейкозимом). В одном из воплощений устойчивость к протеазе коррелирует с более высокой температурой плавления (T_m) пептида или полипептида. Более высокие температуры плавления представляют собой показатели более стабильных переменных доменов антагонистов, пептидов и полипептидов. Устойчивость к деградации протеазой также коррелирует в одном из воплощений с высокоаффинным связыванием с лигандами-мишенями. Таким образом, описанные здесь способы обеспечивают эффективный путь селекции, выделения и/или извлечения переменных доменов, антагонистов, пептидов, полипептидов, обладающих желаемой биологической активностью, и которые хорошо подходят для терапевтического и/или диагностического применения *in vivo*, поскольку они устойчивы к протеазе и стабильны. В одном из воплощений устойчивость к протеазе коррелирует с улучшенной РК (фармакокинетикой), например улучшением по сравнению с переменным доменом, антагонистом, пептидом или полипептидом, который не протеазоустойчивым. Улучшенная РК может представлять собой улучшенную AUC (площадь под кривой) и/или улучшенный период полувыведения. В одном из воплощений устойчивость к протеазе коррелирует с улучшенной стабильностью переменного домена, антагониста, пептида или полипептида к сдвигу и/или тепловому стрессу, и/или уменьшенной склонности к агрегации при распылении, например улучшение по сравнению с переменным доменом, антагонистом, пептидом или полипептидом, который не является протеазоустойчивым. В одном из воплощений устойчивость к протеазе коррелирует с улучшенной стабильностью при хранении, например улучшением по сравнению с переменным доменом, антагонистом, пептидом или полипептидом, который не является протеазоустойчивым. В одном из аспектов предложено одно, два, три, четыре или все преимущества, где преимущества представляют собой устойчивость к деградации протеазой, более высокую T_m и высокоаффинное связывание с целевым лигандом.

В одном из аспектов предложен способ селекции, выделения и/или извлечения из библиотеки или репертуара пептидов и полипептидов (например, дисплейной системы) пептида или полипептида, устойчивого к деградации протеазой (например, одной или более чем одной из протеаз). В одном из воплощений способ представляет собой способ селекции, выделения и/или извлечения из библиотеки или репертуара пептидов и полипептидов (например, дисплейной системы) полипептида, устойчивого к деградации протеазой (например, одной или более чем одной из протеаз). Как правило, способ включает получение библиотеки или репертуара пептидов или полипептидов, объединение этих библиотеки или репертуара с протеазой (например, трипсином, эластазой, лейкозимом, панкреатином, слюной) в условиях, подходящих для активности протеазы, и селекцию, выделение и/или извлечение пептида или полипептида, устойчивого к деградации протеазой и обладающего желаемой биологической активностью. Пептиды или полипептиды, деградирующие под действием протеазы, как правило, обладают уменьшенной биологической активностью или утрачивают свою биологическую активность вследствие активности протеазы. Соответственно, пептиды или полипептиды, устойчивые к деградации протеазой, могут быть селективированы, выделены и/или извлечены с использованием способа на основании их биологической активности, такой как связывающая активность (например, связывание с типичным лигандом, связывание со специфическим лигандом, связывание с субстратом), каталитическая активность или другая биологическая активность.

Библиотеку или репертуар пептидов или полипептидов объединяют с протеазой (например, одной или более чем одной протеазой) в условиях, подходящих для протеолитической активности протеазы. Условия, подходящие для протеолитической активности протеазы, и биологические препараты или смеси, обладающие протеолитической активностью, хорошо известны в области техники или могут быть

легко определены специалистом в данной области техники. Если желательно, то подходящие условия могут быть идентифицированы или оптимизированы, например путем оценки протеазной активности в диапазоне условий pH, концентраций протеазы, температур и/или путем варьирования времени, в течение которого дают возможность для взаимодействия библиотеки или репертуара и протеазы. Например, в некоторых воплощениях отношение (из расчета моль/моль) протеазы, например трипсина, к пептиду или полипептиду (например, вариабельному домену) составляет от 800 до 8000 (например, от 8000 до 80000) протеаза:пептид или полипептид, например когда используют 10 мкг/мл протеазы, тогда отношение составляет от 800 до 80000 протеаза:пептид или полипептид; или когда используют 100 мкг/мл протеазы, тогда отношение составляет от 8000 до 80000 протеаза:пептид или полипептид. В одном из воплощений отношение (из расчета масса/масса, например из расчета микрограмм/микрограмм) протеазы (например, трипсина) к пептиду или полипептиду (например, вариабельному домену) составляет от 1600 до 160000 (например, от 16000 до 160000) протеаза:пептид или полипептид, например когда используют 10 мкг/мл протеазы, тогда отношение составляет от 1600 до 160000 протеаза:пептид или полипептид; или когда используют 100 мкг/мл протеазы, тогда отношение составляет от 16000 до 160000 протеаза:пептид или полипептид. В одном из воплощений протеазу используют в концентрации, составляющей по меньшей мере 100 или 1000 мкг/мл, и отношение протеаза:пептид (из расчета моль/моль) протеазы, например трипсина, к пептиду или полипептиду (например, вариабельному домену) составляет от 8000 до 80000 протеаза:пептид или полипептид. В одном из воплощений протеазу используют в концентрации, составляющей по меньшей мере 10 мкг/мл, и отношение протеаза:пептид (из расчета моль/моль) протеазы, например трипсина, к пептиду или полипептиду (например, вариабельному домену) составляет от 800 до 80000 протеаза:пептид или полипептид. В одном из воплощений отношение (из расчета масса/масса, например из расчета микрограмм/микрограмм) протеазы (например, трипсина) к пептиду или полипептиду (например, вариабельному домену) составляет от 1600 до 160000 протеаза:пептид или полипептид, например когда С составляет 10 мкг/мл; или когда С или С' составляет 100 мкг/мл, тогда отношение составляет от 16000 до 160000 протеаза:пептид или полипептид. В одном из воплощений концентрация (с или с') составляет по меньшей мере 100 или 1000 мкг/мл протеазы. Для тестирования индивидуального или выделенного пептида или полипептида (например, иммуноглобулинового вариабельного домена), например уже выделенного из репертуара или библиотеки, протеаза может быть добавлена к раствору пептида или полипептида в подходящем буфере (например, PBS) с получением раствора пептид или полипептид/протеаза, такого как раствор, составляющий по меньшей мере приблизительно 0,01% (мас./мас.) протеаза/пептид или полипептид, от приблизительно 0,01% до приблизительно 5% (мас./мас.) протеаза/пептид или полипептид, от приблизительно 0,05% до приблизительно 5% (мас./мас.) протеаза/пептид или полипептид, от приблизительно 0,1% до приблизительно 5% (мас./мас.) протеаза/пептид или полипептид, от приблизительно 0,5% до приблизительно 5% (мас./мас.) протеаза/пептид или полипептид, от приблизительно 1% до приблизительно 5% (мас./мас.) протеаза/пептид или полипептид, по меньшей мере приблизительно 0,01% (мас./мас.) протеаза/пептид или полипептид, по меньшей мере приблизительно 0,02% (мас./мас.) протеаза/пептид или полипептид, по меньшей мере приблизительно 0,03% (мас./мас.) протеаза/пептид или полипептид, по меньшей мере приблизительно 0,04% (мас./мас.) протеаза/пептид или полипептид, по меньшей мере приблизительно 0,05% (мас./мас.) протеаза/пептид или полипептид, по меньшей мере приблизительно 0,06% (мас./мас.) протеаза/пептид или полипептид, по меньшей мере приблизительно 0,07% (мас./мас.) протеаза/пептид или полипептид, по меньшей мере приблизительно 0,08% (мас./мас.) протеаза/пептид или полипептид, по меньшей мере приблизительно 0,09% (мас./мас.) протеаза/пептид или полипептид, по меньшей мере приблизительно 0,1% (мас./мас.) протеаза/пептид или полипептид, по меньшей мере приблизительно 0,2% (мас./мас.) протеаза/пептид или полипептид, по меньшей мере приблизительно 0,3% (мас./мас.) протеаза/пептид или полипептид, по меньшей мере приблизительно 0,4% (мас./мас.) протеаза/пептид или полипептид, по меньшей мере приблизительно 0,5% (мас./мас.) протеаза/пептид или полипептид, по меньшей мере приблизительно 0,6% (мас./мас.) протеаза/пептид или полипептид, по меньшей мере приблизительно 0,7% (мас./мас.) протеаза/пептид или полипептид, по меньшей мере приблизительно 0,8% (мас./мас.) протеаза/пептид или полипептид, по меньшей мере приблизительно 0,9% (мас./мас.) протеаза/пептид или полипептид, по меньшей мере приблизительно 1% (мас./мас.) протеаза/пептид или полипептид, по меньшей мере приблизительно 2% (мас./мас.) протеаза/пептид или полипептид, по меньшей мере приблизительно 3% (мас./мас.) протеаза/пептид или полипептид, по меньшей мере приблизительно 4% (мас./мас.) протеаза/пептид или полипептид, или приблизительно 5% (мас./мас.) протеаза/пептид или полипептид. Смесь может быть инкубирована при подходящей для протеазной активности температуре (например, комнатной температуре, приблизительно 37°C), и образцы могут быть отобраны с временными интервалами (например, через 1, 2, 3 ч и т.д.). Образцы могут быть проанализированы в отношении деградации белка с использованием любого подходящего способа, такого как анализ путем SDS-PAGE или связывание лиганда, и результаты могут быть использованы для оценки динамики деградации по времени.

В описанных здесь способах может быть использована любая желаемая протеаза или протеазы. Например, может быть использована одна протеаза, любая желаемая комбинация различных протеаз, или любой биологический препарат, биологический экстракт, или биологический гомогенат, который обла-

дает протеолитической активностью. Не обязательно, чтобы была известна идентичность используемой протеазы или протеаз. Подходящие примеры протеаз, которые могут быть использованы самостоятельно или в любой желаемой комбинации, включают сериновую протеазу, цистеиновую протеазу, аспаргат-протеазы, тиоловые протеазы, матриксную металлопротеиназу, карбоксипептидазу (например, карбоксипептидазу А, карбоксипептидазу В), трипсин, химотрипсин, пепсин, папаин, эластазу, лейкозим, панкреатин, тромбин, плазмин, катепсины (например, катепсин G), протеиназу (например, протеиназу 1, протеиназу 2, протеиназу 3), термолизин, химозин, энтеропротеиназу, каспазу (например, каспазу 1, каспазу 2, каспазу 4, каспазу 5, каспазу 9, каспазу 12, каспазу 13), калпаин, фикаин, кластрипаин, актинидин, бромелаин, сепаразу и т.п. Подходящие биологические экстракты, гомогенаты и препараты, обладающие протеолитической активностью, включают слюну, слизь (например, желудочную слизь, носовую слизь, бронхиальную слизь), бронхоальвеолярный лаваж, легочный гомогенат, легочный экстракт, экстракт поджелудочной железы, желудочную жидкость, слюну, слезы и т.п. Протеазу используют в количестве, подходящем для осуществления протеолитической деградации. Например, как здесь описано, протеаза может быть использована в концентрации от приблизительно 0,01 до приблизительно 5% (мас./мас., протеаза/пептид или полипептид). Когда протеазу объединяют с дисплейной системой, которая включает репертуар пептидов или полипептидов (например, система фагового дисплея), протеаза может быть использована в концентрации от приблизительно 10 мкг/мл до приблизительно 3 мг/мл, приблизительно 10 мкг/мл, приблизительно 20 мкг/мл, приблизительно 30 мкг/мл, приблизительно 40 мкг/мл, приблизительно 50 мкг/мл, приблизительно 60 мкг/мл, приблизительно 70 мкг/мл, приблизительно 80 мкг/мл, приблизительно 90 мкг/мл, приблизительно 100 мкг/мл, приблизительно 200 мкг/мл, приблизительно 300 мкг/мл, приблизительно 400 мкг/мл, приблизительно 500 мкг/мл, приблизительно 600 мкг/мл, приблизительно 700 мкг/мл, приблизительно 800 мкг/мл, приблизительно 900 мкг/мл, приблизительно 1000 мкг/мл, приблизительно 1,5 мг/мл, приблизительно 2 мг/мл, приблизительно 2,5 мг/мл или приблизительно 3 мг/мл.

Протеазу инкубируют с коллекцией пептидов или полипептидов (библиотека или репертуар) при температуре, подходящей для активности протеазы. Например, протеазу и коллекцию пептидов или полипептидов можно инкубировать при температуре от приблизительно 20 до приблизительно 40°C (например, при комнатной температуре, приблизительно 20, приблизительно 21, приблизительно 22, приблизительно 23, приблизительно 24, приблизительно 25, приблизительно 26, приблизительно 27, приблизительно 28, приблизительно 29, приблизительно 30, приблизительно 31, приблизительно 32, приблизительно 33, приблизительно 34, приблизительно 35, приблизительно 36, приблизительно 37, приблизительно 38, приблизительно 39, приблизительно 40°C). Протеазу и коллекцию пептидов или полипептидов инкубируют вместе в течение периода времени, достаточного для осуществления протеолитической деградации. Например, коллекцию пептидов или полипептидов можно инкубировать вместе с протеазой в течение от приблизительно 30 мин до приблизительно 24 ч или приблизительно 48 ч. В некоторых примерах коллекцию пептидов или полипептидов инкубируют вместе с протеазой в течение ночи или в течение по меньшей мере приблизительно 30 мин, приблизительно 1 ч, приблизительно 1,5, приблизительно 2, приблизительно 3, приблизительно 4, приблизительно 5, приблизительно 6, приблизительно 7, приблизительно 8, приблизительно 9, приблизительно 10, приблизительно 11, приблизительно 12, приблизительно 13, приблизительно 14, приблизительно 15, приблизительно 16, приблизительно 17, приблизительно 18, приблизительно 19, приблизительно 20, приблизительно 21, приблизительно 22, приблизительно 23, приблизительно 24, приблизительно 48 ч или больше.

В большинстве случаев желательно, по меньшей мере, на ранних раундах селекции (например, когда используют дисплейную систему), чтобы результатом действия протеазы было уменьшение количества клонов, имеющих желаемую биологическую активность, которая составляет, по меньшей мере, величину одного порядка в сравнении с активностью, полученной в раундах селекции, не включающих инкубацию с протеазой. В конкретных примерах количество протеазы и условия, использованные в таких способах, достаточны для уменьшения количества выделенных клонов по меньшей мере примерно на один логарифм (коэффициент 10), по меньшей мере примерно на 2 логарифма (коэффициент 100), по меньшей мере примерно 3 логарифма (коэффициент 1000) или по меньшей мере примерно 4 логарифма (коэффициент 10000). Подходящие количества протеазы и условия инкубации, которые будут приводить к желаемому уменьшению количества извлеченных клонов, могут быть легко определены с использованием традиционных методов и/или руководства, приведенного в данном изобретении.

Протеаза и коллекция пептидов или полипептидов могут быть объединены и инкубированы с использованием любого подходящего способа (например, *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*). Например, протеаза и коллекция пептидов или полипептидов могут быть объединены в подходящем контейнере и выдержаны в условиях неподвижности, качания, встряхивания, вихревого вращения или т.п., при температуре, подходящей для протеазной активности. Если желательно, протеаза и коллекция пептидов или полипептидов могут быть объединены в системе *in vivo* или *ex vivo*, путем введения коллекции полипептидов (например, библиотеки фагового дисплея или репертуара) в подходящего животного (например, мышь) и после прохождения промежутка времени, достаточного для протеазной активности, извлечения коллекции пептидов или полипептидов. В другом примере орган или ткань подвергают перфузии

коллекцией полипептидов (например, библиотекой фагового дисплея или репертуаром) и после прохождения промежутка времени, достаточного для протеазной активности, извлекают коллекцию полипептидов.

После инкубации протеазоустойчивый пептид или полипептид может быть селективирован на основании желаемой биологической активности, такой как связывающая активность. Если желательно, протеазный ингибитор может быть добавлен перед селекцией. Может быть использован любой подходящий протеазный ингибитор (или комбинация двух или более протеазных ингибиторов), который, по существу, не будет препятствовать такому способу селекции. Примеры подходящих протеазных ингибиторов включают α 1-анти-трипсин, α 2-макроглобулин, амастатин, антипаин, антитромбин III, апротинин, гидрохлорид 4-(2-аминоэтил)бензолсульфонил-фторида (AEBSF), (4-амидино-фенил)метансульфонилфторид (APMSF), бестатин, бензамидин, химостатин, 3,4-дихлоризокумарин, диизопропилфторфосфат (DIFP), E-64, этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA), эластатинал, лейпептин, N-этилмалеимид, фенилметилсульфонилфторид (PMSF), пепстатин, 1,10-фенантролин, фосфорамидон, ингибиторы сериновых протеаз, N-тозил-L-лизин-хлорметилкетон (TLCK), Na-тозил-Phe-хлорметилкетон (TPCK) и т.п. В дополнение к этому в продаже имеется много препаратов, которые содержат ингибиторы нескольких классов протеаз (например, Roche Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets™ (полный коктейль протеазных ингибиторов в таблетках от Roche) (Roche Diagnostics Corporation; Indianapolis, IN, USA), который ингибирует химотрипсин, термолизин, папаин, проназу, экстракт поджелудочной железы и трипсин).

Селекция протеазоустойчивого пептида или полипептида может быть проведена с использованием желаемого способа селекции по биологической активности, который позволяет отличить пептиды и полипептиды, имеющие желаемую биологическую активность, от пептидов и полипептидов, не имеющих желаемой биологической активности, и провести их селекцию. В большинстве случаев пептиды или полипептиды, подвергнутые перевариванию или расщеплению протеазой, теряют свою биологическую активность, тогда как протеазоустойчивые пептиды или полипептиды сохраняют свою функциональность. Таким образом, для селекции протеазоустойчивых пептидов или полипептидов можно использовать подходящие анализы биологической активности. Например, обычная функция связывания (например, связывание с типичным лигандом, связывание со специфическим лигандом или связывание с субстратом) может быть оценена с использованием подходящего анализа связывания (например, ELISA, пэннинга). Например, полипептиды, которые связываются с целевым лигандом или типичным лигандом, таким как белок А, белок L или антитело, могут быть селективированы, выделены и/или извлечены посредством пэннинга или с использованием подходящей аффинной матрицы. Пэннинг может быть осуществлен путем добавления раствора лиганда (например, типичного лиганда, целевого лиганда) в подходящий сосуд (например, пробирку, чашку Петри) и оставления лиганда для осаждения на стенках или прикрепления к стенкам сосуда. Избыток лиганда можно отмыть, в сосуд можно добавить полипептиды (например, библиотеку фагового дисплея) и сосуд поддерживать в условиях, подходящих для связывания полипептидов с иммобилизованным лигандом. Несвязанный полипептид можно отмыть, а связанные полипептиды можно извлечь с использованием любого подходящего способа, такого как, например, соскабливание или уменьшение pH.

Если используют систему фагового дисплея, то связывание может быть протестировано в фаговом ELISA. Фаговый ELISA может быть проведен в соответствии с любой подходящей методикой. В одном из примеров популяции фага, продуцируемые в каждом раунде селекции, могут быть подвергнуты скринингу в отношении связывания в ELISA с выбранным целевым лигандом или типичным лигандом с целью идентификации фага, экспонирующего протеазоустойчивые пептиды или полипептиды. Если желательно, растворимые пептиды и полипептиды могут быть протестированы в отношении связывания с целевым лигандом или типичным лигандом, например, посредством ELISA с использованием реагентов, например, против С- или N-концевой метки (см., например, Winter et al. (1994), *Ann. Rev. Immunology* 12, 433-55 и приведенные там ссылки). Вариабельность селективированного фага также может быть оценена посредством гель-электрофореза продуктов ПЦР (полимеразной цепной реакции) (Marks et al. 1991, выше; Nissim et al. 1994, выше), путем введения зонда (Tomlinson et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 227, 776) или посредством секвенирования векторной ДНК.

Дополнительно к специфичности в отношении TNFR1 антагонист или полипептид (например, обладающий двойной специфичностью лиганд), содержащий протеазоустойчивый полипептид против TNFR1 (например, единичный вариабельный домен антитела), может обладать специфичностью связывания в отношении типичного лиганда или любого желаемого целевого лиганда, такого как человеческие или животные белки, включая цитокины, факторы роста, цитокиновые рецепторы, рецепторы факторов роста, ферменты (например, протеазы), кофакторы ферментов, ДНК-связывающие белки, липиды и углеводороды.

В некоторых воплощениях протеазоустойчивый пептид или полипептид (например, dAb) или антагонист связывается с TNFR1 в легочной ткани. В одном из воплощений антагонист или полипептид также связывается с дополнительной мишенью в легочной ткани.

Если в способах, описанных в данном изобретении, используют дисплейную систему (например, дисплейную систему, в которой связаны кодирующая функция нуклеиновой кислоты и функциональные характеристики пептида или полипептида, кодируемого данной нуклеиновой кислотой), то часто бывает предпочтительно амплифицировать или увеличить количество копий нуклеиновых кислот, которые кодируют выбранные пептиды или полипептиды. Благодаря этому имеют эффективный способ получения достаточных количеств нуклеиновых кислот и/или пептидов или полипептидов для дополнительных раундов селекции с использованием способов, описанных в данном изобретении, или других подходящих способов либо для получения дополнительных репертуаров (например, репертуаров с "созреванием" аффинности). Таким образом, в некоторых воплощениях способ по изобретению включает применение дисплейной системы (например, в которой связаны кодирующая функция нуклеиновой кислоты и функциональные характеристики пептида или полипептида, кодируемого данной нуклеиновой кислотой, такой системы, как фаговый дисплей) и также включает амплификацию или увеличение количества копий нуклеиновой кислоты, которая кодирует селективный пептид или полипептид. Нуклеиновые кислоты могут быть амплифицированы с использованием любых подходящих способов, например, посредством амплификации фагов, роста клеток или полимеразной цепной реакции.

Способы, описанные в данном изобретении, могут быть использованы в качестве части программы по выделению протеазоустойчивых пептидов или полипептидов, например dAb, которая может включать в себя, если желательно, другие подходящие способы селекции. В этих ситуациях способы, описанные в данном изобретении, могут быть применены в любом желаемом месте данной программы, например, до или после использования других способов селекции. Кроме того, способы, описанные в данном изобретении, могут быть использованы для проведения двух или более раундов селекции, как описано и приведено в качестве примера в данном патенте.

В одном из примеров изобретение относится к способу селекции пептида или полипептида, который устойчив к расщеплению эластазой, включающему получение библиотеки или репертуара пептидов или полипептидов, объединение библиотеки или репертуара с эластазой (или биологическим препаратом, экстрактом или гомогенатом, содержащим эластазу) в условиях, подходящих для протеолитического расщепления эластазой, и селекцию, выделение и/или извлечение пептида или полипептида, который устойчив к расщеплению эластазой и обладает TNFR1 связывающей активностью.

В конкретных воплощениях предложен способ селекции иммуноглобулинового единичного переменного домена (dAb), который устойчив к расщеплению эластазой и связывается с TNFR1. В этих воплощениях библиотеку или репертуар, содержащие dAb, получают и объединяют с эластазой (или биологическим препаратом, экстрактом или гомогенатом, содержащим эластазу) в условиях, подходящих для протеолитического расщепления эластазой. Отбирают эластаза-устойчивые dAb, которые связываются с TNFR1. Например, эластаза-устойчивое dAb, по существу, не расщепляется, когда его инкубируют при 37°C в 0,04%-ном (мас./мас.) растворе эластазы в течение по меньшей мере примерно 2 ч. В одном воплощении эластаза-устойчивое dAb, по существу, не расщепляется, когда его инкубируют при 37°C в 0,04%-ном (мас./мас.) растворе эластазы в течение по меньшей мере примерно 12 ч. В другом воплощении эластаза-устойчивое dAb, по существу, не расщепляется, когда его инкубируют при 37°C в 0,04%-ном (мас./мас.) растворе эластазы в течение по меньшей мере примерно 24 ч, по меньшей мере примерно 36 ч или по меньшей мере примерно 48 ч.

В воплощении предложен способ отбора единичного переменного домена иммуноглобулина (dAb), резистентного к деградации эластазой и связывающегося с TNFR1. Этот способ включает обеспечение системы фагового дисплея, содержащей репертуар полипептидов, которые содержат единичный переменный домен иммуноглобулина, комбинирование системы фагового дисплея с эластазой (приблизительно 100 мкг/мл) и инкубацию смеси при приблизительно 37°C, например, в течение ночи (например, приблизительно 12-16 ч), и затем отбор фага, которые представляет dAb, специфически связывающееся с TNFR1.

В одном из примеров изобретение относится к способу селекции пептида или полипептида (например, dAb), который устойчив к расщеплению лейкоцином, включающему получение библиотеки или репертуара пептидов или полипептидов, объединение библиотеки или репертуара с лейкоцином (или биологическим препаратом, экстрактом или гомогенатом, содержащим лейкоцин) в условиях, подходящих для протеолитического расщепления лейкоцином, и селекцию, выделение и/или извлечение пептида или полипептида, который устойчив к расщеплению лейкоцином и обладает специфической TNFR1 связывающей активностью.

В конкретных воплощениях предложен способ селекции иммуноглобулинового единичного переменного домена (dAb), который устойчив к расщеплению лейкоцином и связывается с TNFR1. В этих воплощениях библиотеку или репертуар, содержащие dAb, получают и объединяют с лейкоцином (или биологическим препаратом, экстрактом или гомогенатом, содержащим лейкоцин) в условиях, подходящих для протеолитического расщепления лейкоцином. Отбирают устойчивые к лейкоцину dAb, которые специфически связываются с TNFR1. Например, устойчивое к лейкоцину dAb, по существу, не расщепляется, когда его инкубируют при 37°C в 0,04%-ном (мас./мас.) растворе лейкоцима в течение по меньшей мере примерно 2 ч. В одном воплощении устойчивое к лейкоцину dAb, по существу, не расщепляет-

ся, когда его инкубируют при 37°C в 0,04%-ном (мас./мас.) растворе лейкозима в течение по меньшей мере примерно 12 ч. В одном воплощении устойчивое к лейкозиму dAb, по существу, не расщепляется, когда его инкубируют при 37°C в 0,04%-ном (мас./мас.) растворе лейкозима в течение по меньшей мере примерно 24 ч, по меньшей мере примерно 36 ч или по меньшей мере примерно 48 ч.

В одном воплощении изобретение относится к способу селекции иммуноглобулинового единичного переменного домена (dAb), который устойчив к расщеплению лейкозимом и специфически связывается с TNFR1. Способ включает получение системы фагового дисплея, содержащей репертуар полипептидов, которые содержат иммуноглобулиновый единичный переменный домен, объединение данной системы фагового дисплея с лейкозимом (примерно 100 мкг/мл) и инкубирование этой смеси при примерно 37°C, например, в течение ночи (например, примерно 12-16 ч) и затем селекцию фага, экспонирующего dAb, которое специфически связывается с TNFR1.

В другом примере предложен способ селекции пептида или полипептида (например, dAb), который устойчив к расщеплению трипсином, включающему получение библиотеки или репертуара пептидов или полипептидов, объединение библиотеки или репертуара с трипсином в условиях, подходящих для протеолитического расщепления трипсином, и селекцию, выделение и/или извлечение пептида или полипептида, который устойчив к расщеплению трипсином и специфически связывается с TNFR1.

В конкретных воплощениях изобретение относится к способу селекции иммуноглобулинового единичного переменного домена (dAb), который устойчив к расщеплению трипсином и специфически связывается с TNFR1. В этих воплощениях библиотеку или репертуар, содержащие dAb, получают и объединяют с трипсином (или биологическим препаратом, экстрактом или гомогенатом, содержащим трипсин) в условиях, подходящих для протеолитического расщепления трипсином. Отбирают трипсин-устойчивые dAb, которые связываются с TNFR1. Например, устойчивое к трипсину dAb, по существу, не расщепляется, когда его инкубируют при 37°C в 0,04%-ном (мас./мас.) растворе трипсина в течение по меньшей мере примерно 2 ч. В одном воплощении устойчивое к трипсину dAb, по существу, не расщепляется, когда его инкубируют при 37°C в 0,04%-ном (мас./мас.) растворе трипсина в течение по меньшей мере примерно 3 ч. В одном воплощении устойчивое к трипсину dAb, по существу, не расщепляется, когда его инкубируют при 37°C в 0,04%-ном (мас./мас.) растворе трипсина в течение по меньшей мере примерно 4 ч, по меньшей мере примерно 5 ч, по меньшей мере примерно 6 ч, по меньшей мере примерно 7 ч, по меньшей мере примерно 8 ч, по меньшей мере примерно 9 ч, по меньшей мере примерно 10 ч, по меньшей мере примерно 11 ч или по меньшей мере примерно 12 ч.

В типичном воплощении предложен способ селекции иммуноглобулинового единичного переменного домена (dAb), который устойчив к расщеплению трипсином и специфически связывается с TNFR1. Способ включает получение системы фагового дисплея, содержащей репертуар полипептидов, которые содержат иммуноглобулиновый единичный переменный домен, объединение данной системы фагового дисплея с трипсином (100 мкг/мл) и инкубирование этой смеси при примерно 37°C, например, в течение ночи (например, примерно 12-16 ч), и затем селекцию фага, экспонирующего dAb, которое специфически связывается с TNFR1.

В другом аспекте предложен способ получения репертуара протеазоустойчивых пептидов или полипептидов (dAb). Способ включает получение репертуара пептидов или полипептидов; объединение репертуара пептидов или полипептидов и протеазы в условиях, подходящих для протеазной активности; и извлечение множества пептидов или полипептидов, которые специфически связываются с TNFR1, посредством чего получают репертуар протеазоустойчивых пептидов или полипептидов. Протеазы, дисплейные системы, условия для протеазной активности и способы селекции пептидов или полипептидов, которые подходят для применения в данном способе, описаны в данном изобретении с учетом других способов по изобретению.

В некоторых воплощениях используют дисплейную систему (например, дисплейную систему, в которой связаны кодирующая функция нуклеиновой кислоты и функциональные характеристики пептида или полипептида, кодируемого данной нуклеиновой кислотой), которая содержит репертуар пептидов или полипептидов, и способ также включает амплификацию или увеличение количества копий нуклеиновых кислот, кодирующих это множество селектированных пептидов или полипептидов. Нуклеиновые кислоты могут быть амплифицированы с использованием любого подходящего способа, например, посредством амплификации фагов, роста клеток или полимеразной цепной реакции.

В конкретном воплощении предложен способ получения репертуара протеазоустойчивых полипептидов, содержащих анти-TNFR1 dAb. Способ включает получение репертуара полипептидов, содержащих dAb; объединение репертуара пептидов или полипептидов и протеазы (например, трипсина, эластазы, лейкозима) в условиях, подходящих для протеазной активности; и извлечение множества полипептидов, содержащих dAb, обладающих специфичностью связывания с TNFR1. Способ может быть использован для получения "наивного" репертуара или репертуара, который "смещен" в сторону желаемой специфичности связывания, такого как репертуар с созреванием аффинности, основанный на родительском dAb, обладающем специфичностью связывания с TNFR1.

Системы полипептидного дисплея

В одном воплощении репертуар или библиотека пептидов или полипептидов, предложенные для применения в способах по изобретению, содержат подходящую дисплейную систему. Дисплейная система предпочтительно препятствует расщеплению протеазой (например, единичной протеазой или комбинацией протеаз и любым биологическим экстрактом, гомогенатом или препаратом, содержащим протеолитическую активность (например, мокроты, слизи (например, желудочной слизи, носовой слизи, бронхиальной слизи), бронхоальвеолярного лаважа, гомогената легких, экстракта легких, экстракта поджелудочной железы, желудочной жидкости, слюны, слез и т.п.)). Дисплейная система и связь между этой дисплейной системой и экспонируемым полипептидом в одном воплощении, по меньшей мере, настолько же устойчивы к протеазе, насколько устойчивы наиболее стабильные пептиды или полипептиды репертуара. Это дает возможность легко выделить и/или амплифицировать нуклеиновую кислоту, кодирующую селективированный экспонируемый полипептид.

В одном из примеров протеазоустойчивый пептид или полипептид (например, dAb) может быть селективирован, выделен и/или извлечен из репертуара пептидов или полипептидов, находящегося в растворе или ковалентно или нековалентно присоединенного к подходящей поверхности, такой как пластик или стекло (например, титрационному микропланшету, полипептидному массиву, такому как микромассив). Например, можно использовать расположение пептидов на поверхности способом, посредством которого каждый индивидуальный член библиотеки (например, уникальная пептидная последовательность) располагается в отдельном, предварительно определенном местоположении в этом массиве. Идентичность каждого члена библиотеки в таком массиве можно определить по его пространственному расположению в данном массиве. Те положения в массиве, где происходят взаимодействия связывания между, например, целевым лигандом и реакционноспособными членами библиотеки, могут быть определены, благодаря этому идентифицируют последовательности реакционноспособных членов на основе пространственного расположения (см., например, патент США № 5143854, WO 90/15070 и WO 92/10092).

В одном воплощении в данных способах используют дисплейную систему, в которой связаны кодирующая функция нуклеиновой кислоты и физические, химические и/или функциональные характеристики полипептида, кодируемого данной нуклеиновой кислотой. Такая дисплейная система может содержать множество способных реплицироваться генетических комплексов, таких как бактериофаг или клетки (бактерии). В одном воплощении дисплейная система содержит такую библиотеку, как бактериофаговая дисплейная библиотека.

Описан ряд подходящих бактериофаговых дисплейных систем (например, моновалентные дисплейные и поливалентные дисплейные системы) (см., например, Griffiths и др., патент США № 6555313 B1 (включенный в данное описание посредством ссылки); Johnson и др., патент США № 5733743 (включенный в данное описание посредством ссылки); McCafferty и др., патент США № 5969108 (включенный в данное описание посредством ссылки); Mulligan-Kehoe, патент США № 5702892 (включенный в данное описание посредством ссылки); Winter, G. et al., *Annu. Rev. Immunol.* 12: 433-455 (1994); Soumillon, P. et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 47(2-3): 175-189 (1994); Castagnoli, L. et al., *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, 4(2): 121-133 (2001)). Пептиды или полипептиды, экспонируемые в бактериофаговой дисплейной системе, могут экспонироваться, например, на любом подходящем бактериофаге, таком как нитчатый фаг (например, fd, M13, F1), литический фаг (например, T4, T7, лямбда) или РНК-содержащий фаг (например, MS2).

В большинстве случаев получена или предложена библиотека фага, экспонирующего репертуар пептидов или полипептидов в виде белков, слитых с подходящим белком оболочки фага (например, с рIII-белком fd). Слитый белок может экспонировать пептиды или полипептиды на конце белка оболочки фага, или, если будет желательно, во внутреннем положении. Например, экспонируемый пептид или полипептид может быть аминоконцевым относительно домена 1 в рIII (домен 1 в рIII также обозначают как N1). Экспонируемый полипептид может быть непосредственно слит с рIII (например, с N-концом домена 1 в рIII) или слит с рIII с использованием линкера. Если желательно, такая слитая конструкция может дополнительно содержать метку (например, эпитоп тус, His-метку). Библиотеки, содержащие репертуар пептидов или полипептидов, которые экспонируются в виде белков, слитых с белком оболочки фага, могут быть получены с использованием любых подходящих способов, таких как введение библиотеки фаговых векторов или фагмидных векторов, кодирующих экспонируемые пептиды или полипептиды, в подходящих бактерий-хозяев и культивирование полученных бактерий с целью продуцирования фага (например, с использованием подходящего хелперного фага или комплементирующей плазмиды, если желательно). Библиотека фага может быть извлечена из культуры с использованием любого подходящего метода, такого как осаждение и центрифугирование.

Дисплейная система может содержать репертуар пептидов или полипептидов, который содержит любое желаемое количество разнообразных вариантов. Например, репертуар может содержать пептиды или полипептиды, которые имеют аминокислотные последовательности, соответствующие полипептидам природного происхождения, экспрессируемым организмом, группой организмов (например, репертуар последовательностей V_{HH} dAb, выделенных из верблюжьих), желаемой тканью или желаемым типом клеток, или может содержать пептиды или полипептиды, которые имеют случайные или рандомизи-

рованные аминокислотные последовательности. Если желательно, полипептиды могут иметь общее ядро или общий остов. Полипептиды в таком репертуаре или такой библиотеке могут содержать определенные области случайной или рандомизированной аминокислотной последовательности и области общей аминокислотной последовательности. В некоторых воплощениях все или по существу все полипептиды в репертуаре являются полипептидами желаемого типа, такими как желаемый фермент (например, полимераза) или желаемый антигенсвязывающий фрагмент антитела (например, V_H человека или V_L человека). В некоторых воплощениях полипептидная дисплейная система содержит репертуар полипептидов, где каждый полипептид представляет собой переменный домен антитела. Например, каждый полипептид в репертуаре может содержать V_H , V_L или Fv (например, одноцепочечный Fv).

Вариабельность аминокислотной последовательности может быть внесена в любую желаемую область пептида или полипептида либо остова с использованием любого подходящего способа. Например, вариабельность аминокислотной последовательности может быть внесена в целевую область, такую как определяющий комплементарность участок вариабельного домена антитела или гидрофобный домен, посредством получения библиотеки нуклеиновых кислот, кодирующих разнообразные полипептиды, с использованием любых подходящих методов мутагенеза (например, ПЦР пониженной точности, олигонуклеотид-опосредованного или сайт-специфического мутагенеза, диверсификации с использованием кодонов NNK) или любого другого подходящего метода. Если желательно, область полипептида, в которую должно быть внесено разнообразие, может быть выбрана случайным образом.

Размер полипептидов, которые входят в состав репертуара, во многом является предметом выбора, и единообразный размер полипептида не обязателен. В одном воплощении полипептиды в репертуаре имеют, по меньшей мере, третичную структуру (образовывали по меньшей мере один домен).

Селекция/выделение/извлечение

Протеазоустойчивый пептид или полипептид (например, популяция протеазоустойчивых полипептидов) может быть селективирован, выделен и/или извлечен из репертуара или библиотеки (например, в дисплейной системе) с использованием любого подходящего способа. Предпочтительно протеазоустойчивый полипептид селективируют или выделяют на основании селективируемой характеристики (например, физической характеристики, химической характеристики, функциональной характеристики). Подходящие селективируемые функциональные характеристики включают биологические активности пептидов или полипептидов в репертуаре, например, связывание с типичным лигандом (например, суперантигеном), связывание с целевым лигандом (например, антигеном, эпитопом, субстратом), связывание с антителом (например, через эпитоп, экспрессируемый на пептиде или полипептиде) и каталитическую активность (см., например, Tomlinson et al., WO 99/20749; WO 01/57065; WO 99/58655). В одном из воплощений селекция основана на специфическом связывании с TNFR1. В еще одном воплощении селекция основана на выбранной функциональной характеристике с получением второго репертуара, в котором члены устойчивы к протеазе, а затем путем селекции члена из второго репертуара, специфически связывающегося с TNFR1.

В некоторых воплощениях протеазоустойчивый пептид или полипептид отбирают и/или селективируют из библиотеки или репертуара пептидов или полипептидов, в которой по существу все протеазоустойчивые пептиды или полипептиды обладают общим селективируемым свойством. Например, протеазоустойчивый пептид или полипептид может быть выбран из библиотеки или репертуара, в которых по существу все протеазоустойчивые пептиды или полипептиды связываются с общим родовым лигандом, связываются с общим целевым лигандом, связываются (или связаны) с общим антителом, или обладают общей каталитической активностью. Этот тип селекции в особенности полезен для получения репертуара протеазоустойчивых пептидов или полипептидов, основанного на родительском пептиде или полипептиде, обладающем желаемой биологической активностью, например, когда осуществляют созревание аффинности иммуноглобулинового единичного переменного домена.

Селекция на основании связывания с общим родовым лигандом может дать начало коллекции или популяции пептидов или полипептидов, содержащей все или по существу все из протеазоустойчивых пептидов или полипептидов, представляющих собой компоненты исходной библиотеки или репертуара. Например, пептиды или полипептиды, связывающие целевую лиганд или общий лиганд, такой как белок А, белок L или антитело, могут быть селективированы, выделены и/или извлечены посредством пэннинга или с использованием подходящей матрицы аффинности. Пэннинг может быть осуществлен путем добавления раствора лиганда (например, общего лиганда, целевого лиганда) в подходящий сосуд (например, пробирку, чашку Петри) и предоставления лиганду возможности осесть или образовывать слой на стенках сосуда. Избыток лиганда может быть отмыт, и пептиды или полипептиды (например, репертуар, который инкубируют с протеазой) могут быть добавлены в сосуд, и сосуд поддерживают в условиях, подходящих для связывания пептидов или полипептидов с иммобилизованным лигандом. Несвязавшиеся пептиды или полипептиды могут быть отмыты, а связанные пептиды или полипептиды могут быть выделены с использованием любого подходящего способа, такого как, например, соскребание или уменьшение pH.

Подходящие аффинные матрицы для лиганда, как правило, содержат твердый носитель или шарики (например, агарозу), к которым лиганд прикреплен ковалентно или нековалентно. Аффинная матрица

может быть объединена с пептидами или полипептидами (например, репертуаром, который инкубировали с протеазой) с использованием способа в партии, колоночного способа или любого другого подходящего способа в условиях, подходящих для связывания пептидов или полипептидов с лигандом на матрице. Пептиды или полипептиды, которые не связываются с аффинной матрицей, могут быть отмыты, а связавшиеся пептиды или полипептиды могут быть элюированы и выделены с использованием любого подходящего способа, такого как элюция буфером с меньшим значением pH, мягким денатурирующим агентом (например, мочевиной), или пептидом, который конкурирует за связывание с лигандом. В одном из примеров биотинилированный целевой лиганд объединяют с репертуаром в условиях, подходящих для связывания пептидов или полипептидов в репертуаре с целевым лигандом (TNFR1). Связанные пептиды или полипептиды выделяют с использованием иммобилизованного авидина или стрептавидина (например, на шариках).

В некоторых воплощениях общий лиганд представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Антитела или антигенсвязывающие фрагменты, связывающиеся со структурными особенностями пептидов или полипептидов, которые являются, по существу, консервативными в пептидах или полипептидах библиотеки или репертуара, особенно полезны в качестве общих лигандов. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, подходящие для применения в качестве лигандов для выделения, селекции и/или извлечения протеазоустойчивых пептидов или полипептидов, могут быть моноклональными или поликлональными и могут быть получены с использованием любого подходящего способа.

Библиотеки/репертуары

В других аспектах предложены репертуары протеазоустойчивых пептидов и полипептидов для библиотек, кодирующих протеазоустойчивые пептиды и полипептиды, и способы продуцирования таких библиотек и репертуаров.

Библиотеки, которые кодируют и/или содержат протеазоустойчивые пептиды и полипептиды, могут быть изготовлены или получены с использованием любого подходящего способа. Библиотека может быть разработана для кодирования протеазоустойчивых пептидов или полипептидов на основе интересующего пептида или полипептида (например, пептида или полипептида против TNFR1, выбранного из библиотеки), или может быть выбрана из другой библиотеки с использованием описанных здесь способов. Например, библиотека, обогащенная протеазоустойчивыми полипептидами, может быть изготовлена с использованием подходящей системы дисплея полипептидов.

В одном из примеров библиотеку фагового дисплея, содержащую репертуар экспонированных полипептидов, содержащих иммуноглобулиновые единичные переменные домены (например, V_H, V_K, V_L), объединяют с протеазой в условиях, подходящих для протеазной активности, как здесь описано. Протеазоустойчивые полипептиды выделяют на основе желаемой биологической активности, такой как связывающая активность (например, связывание общего лиганда, связывание целевого лиганда), тем самым с получением библиотеки фагового дисплея, обогащенной протеазоустойчивыми полипептидами. В одном из воплощений выделение основано на связывании общего лиганда с получением обогащенной библиотеки, а затем селекции анти-TNRF1 члена этой библиотеки на основе специфического связывания с TNFR1.

В еще одном примере библиотеку фагового дисплея, содержащую репертуар экспонированных полипептидов, содержащих иммуноглобулиновые единичные переменные домены (например, V_H, V_K, V_L), сначала отбирают для идентификации членов репертуара, которые обладают специфичностью связывания в отношении желаемого целевого антигена (TNFR1). Коллекцию полипептидов, обладающих желаемой специфичностью связывания, выделяют, и коллекцию объединяют с протеазой в условиях, подходящих для протеолитической активности, как здесь описано. Коллекцию протеазоустойчивых полипептидов, которые обладают желаемой специфичностью связывания с мишенью, выделяют с получением библиотеки, обогащенной протеазоустойчивыми и высокоаффинными полипептидами. Как здесь описано в одном воплощении, устойчивость к протеазе в этом способе селекции коррелирует с высокой аффинностью связывания.

Библиотеки, кодирующие репертуар полипептидов желаемого типа, легко могут быть получены с использованием любого подходящего способа. Например, может быть получена последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид желаемого типа (например, полимеразу, переменный домен иммуноглобулина), и может быть приготовлена коллекция нуклеиновых кислот, каждая из которых содержит одну или более чем одну мутацию, например путем амплификации нуклеиновой кислоты с использованием системы допускающей ошибки полимеразной цепной реакции (ПЦР), путем химического мутагенеза (Deng et al., *J. Biol. Chem.*, 269:9533 (1994)) или с использованием бактериальных мутаторных штаммов (Low et al., *J. Mol. Biol.*, 260:359 (1996)).

В некоторых воплощениях конкретные области нуклеиновой кислоты могут быть помечены для диверсификации. Способы мутирования выбранных положений хорошо известны в данной области и включают, например, применение ошибочно спаренных олигонуклеотидов или вырожденных олигонуклеотидов как с использованием ПЦР, так и без нее. Например, созданы библиотеки синтетических антител посредством направленного введения мутаций в антигенсвязывающие петли. Случайным или полу-

случайным образом H3- и L3-области антител присоединяли к генным V-сегментам иммуноглобулинов зародышевой линии с целью создания больших библиотек с не затронутыми мутациями каркасными областями (Hoogenboom и Winter (1992), выше; Nissim et al. (1994), выше; Griffiths et al. (1994), выше; DeKruif et al. (1995), выше). В этом случае внесение разнообразия затрагивает некоторые или все другие антигенсвязывающие петли (Crameri et al. (1996), *Nature Med.*, 2: 100; Riechmann et al. (1995), *Bio/Technology*, 13: 475; Morphosys, WO 97/08320, выше). В других воплощениях конкретные области нуклеиновой кислоты могут быть выбраны в качестве мишеней для внесения разнообразия, например, посредством стратегии двухстадийной ПЦР, в которой продукт первой ПЦР используется в качестве "мегапрайма" (см., например, Landt, O. et al., *Gene* 96: 125-128 (1990)). Целенаправленное внесение разнообразия также может быть осуществлено, например, посредством SOE PCR (ПЦР со сплайсингом посредством перекрывающегося удлинения) (см., например, Horton, R.M. et al., *Gene* 77: 61-68 (1989)).

Вариабельность последовательности в выбранных положениях может быть достигнута путем изменения кодирующей последовательности, определяющей последовательность полипептида, таким образом, чтобы в данное положение можно было встроить ряд возможных аминокислот (например, все 20 или часть из них). В соответствии с номенклатурой IUPAC (Международный союз теоретической и прикладной химии) наиболее многофункциональным кодоном является NNK, который кодирует все аминокислоты, а также стоп-кодон TAG. Кодон NNK предпочтительно используют для того, чтобы внести необходимую вариабельность. Также используют другие кодоны, с помощью которых добиваются той же цели, включая кодон NNN, что приводит к созданию дополнительных стоп-кодонов TGA и TAA. Такой целенаправленный подход может способствовать "зондированию" всей последовательности в целевой области.

Библиотеки могут содержать протеазоустойчивые полипептиды антител, которые имеют известную конформацию основной цепи (см., например, Tomlinson и др., WO 99/20749).

Библиотеки могут быть получены в подходящей(ем) плазмиде или векторе. Как использовано в данном изобретении, термин "вектор" относится к дискретному элементу, который используют для введения гетерологической ДНК в клетки для ее экспрессии и/или репликации. Можно использовать любой подходящий вектор, включая плазмиды (например, бактериальные плазмиды), векторы на основе вирусов или бактериофагов, искусственные хромосомы и эписомальные векторы. Такие векторы могут быть использованы для простого клонирования и мутагенеза, или экспрессирующий вектор может быть использован для управления экспрессией библиотеки. Векторы и плазмиды обычно содержат один или более клонирующих сайтов (например, полилинкер), ориджин репликации и по меньшей мере один селективируемый маркерный ген. Экспрессирующие векторы могут дополнительно содержать элементы для управления транскрипцией и трансляцией полипептида, такие как энхансерный элемент, промотор, сигнал терминации транскрипции, сигнальные последовательности и т.п. Эти элементы могут быть организованы таким образом, чтобы быть оперативным образом связанными с клонированной вставкой, кодирующей полипептид, так чтобы полипептид экспрессировался и продуцировался, когда такой экспрессирующий вектор поддерживают в условиях, подходящих для экспрессии (например, в подходящей клетке-хозяине).

Клонирующие и экспрессирующие вектора, как правило, содержат нуклеиново-кислотные последовательности, позволяющие вектору реплицироваться в одном или более выбранных типах клеток-хозяев. Обычно в клонирующих векторах эта последовательность представляет собой последовательность, позволяющую вектору реплицироваться независимо от хромосомной ДНК хозяина, и включает ориджины репликации или автономно реплицирующиеся последовательности. Хорошо известны такие последовательности для ряда бактерий, дрожжей и вирусов. Ориджин репликации из плазмиды pBR322 подходит для большинства грамотрицательных бактерий, 2-микрометровый плазмидный ориджин подходит для дрожжей, а различные вирусные ориджины (например, SV40 (обезьяньего вируса 40), аденовируса) полезны для клонирования векторов в клетках млекопитающих. Как правило, ориджин репликации не являются необходимыми для экспрессирующих векторов млекопитающих за исключением случаев, когда их используют в клетках млекопитающих, способных реплицировать высокие уровни ДНК, таких как COS-клетки (фибробласты африканской зеленой мартышки).

Клонирующие или экспрессирующие векторы могут содержать ген селекции, также называемый селективируемым маркером. Такие маркерные гены кодируют белок, необходимый для выживания или роста трансформированных клеток-хозяев, растущих на селективной культуральной среде. Клетки-хозяева, не трансформированные вектором, содержащим ген селекции, не будут поэтому выживать в данной культуральной среде. Типичные гены селекции кодируют белки, которые придают устойчивость к антибиотикам и другим токсинам, например ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, дополняют ауксотрофные дефициты или восполняют критические питательные вещества, которых нет в ростовых средах.

Подходящие экспрессирующие векторы могут содержать ряд компонентов, например ориджин репликации, селективируемый маркерный ген, один или более элементов контроля экспрессии, таких как элемент контроля транскрипции (например, промотор, энхансер, терминирующий элемент) и/или один или более сигналов трансляции, сигнальную или лидерную последовательность и т.п. Элементы контроля

экспрессии и сигнальная или лидерная последовательность, если они присутствуют, могут быть предусмотрены в векторе или за счет другого источника. Например, для непосредственной экспрессии могут быть использованы последовательности транскрипционного и/или трансляционного контроля клонированной нуклеиновой кислоты, кодирующей цепь антитела.

Для экспрессии в желаемой клетке-хозяине может быть предусмотрен промотор. Промоторы могут быть конститутивными или индуцибельными. Например, промотор может быть оперативным образом связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей антитело, цепь антитела или его часть, с тем чтобы он направлял транскрипцию нуклеиновой кислоты. Доступны разнообразные промоторы, подходящие для прокариотических (например, β -лактамазные и лактозные промоторные системы, промотор гена щелочной фосфатазы, триптофановая (*trp*) промоторная система, промоторы *lac*, *tac*, T3, T7 для *E.coli*) и эукариотических (например, ранний и поздний промотор обезьяньего вируса 40, промотор длинных концевых повторов вируса саркомы Рауса, цитомегаловирусный промотор, поздний аденовирусный промотор, промотор EG-1a) хозяев.

В дополнение к этому, экспрессирующие векторы обычно содержат селективируемый маркер для селекции клеток-хозяев, несущих этот вектор, и, в случае способного реплицироваться экспрессирующего вектора, ориджин репликации. Гены, кодирующие продукты, которые придают устойчивость к антибиотикам или лекарственным средствам, представляют собой общеизвестные селективируемые маркеры и могут быть использованы в прокариотических (например, ген β -лактамазы (устойчивость к ампициллину), ген Tet для устойчивости к тетрациклину) и эукариотических клетках (например, гены устойчивости к неомицину (G418 или генетицину), *gpt* (микофенольной кислоте), ампициллину или гигромицину). Дегидрофолатредуктазные маркерные гены позволяют проводить селекцию с метотрексатом в разнообразных хозяевах.

Гены, кодирующие генный продукт ауксотрофных маркеров хозяина (например, LEU2, URA3, HIS3), часто используют в качестве селективируемых маркеров в дрожжах. Также рассматривается применение вирусных (например, бакуловирусных) или фаговых векторов и векторов, способных интегрироваться в геном клетки-хозяина, таких как ретровирусные векторы.

Подходящие экспрессирующие векторы для экспрессии в клетках прокариот (например, бактериальных клетках, таких как *E.coli*) или млекопитающих включают, например, вектор pET (например, pET-12a, pET-36, pET-37, pET-39, pET-40; Novagen и других фирм), фаговый вектор (например, pCANTAB 5 E; Pharmacia), pRIT2T (вектор, представляющий собой слитую конструкцию с геном белка A, Pharmacia), pCDM8, pCDNA1.1/amp, pcDNA3.1, pRc/RSV, pEF-1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), pCMV-SCRIPT, pFB, pSG5, pXT1 (Stratagene, La Jolla, CA), pCDEF3 (Goldman, L.A., et al., *Biotechniques*, 21: 1013-1015 (1996)), pSVSPORT (GibcoBRL, Rockville, MD), pEF-Bos (Mizushima, S., et al., *Nucleic Acids Res.*, 18: 5322 (1990)) и т.п. Доступны экспрессирующие векторы, которые подходят для применения в различных экспрессирующих хозяевах, таких как прокариотические клетки (*E.coli*), клетки насекомых (S2-клетки *Drosophila Schnieder*, Sf9), дрожжи (*P. methanolicus*, *P. pastoris*, *S. cerevisiae*) и клетки млекопитающих (например, COS-клетки).

Предпочтительными векторами являются экспрессирующие векторы, которые позволяют экспрессироваться нуклеотидной последовательности, соответствующей члену библиотеки полипептидов. Так, селекция с использованием типичных и/или целевых лигандов может быть проведена в результате отдельных этапов культивирования и экспрессии единичного клона, экспрессирующего член библиотеки полипептидов. Как описано выше, предпочтительной дисплейной системой селекции является бактериофаговый дисплей. Так, могут быть использованы фаговые или фагмидные векторы. Примерами векторов являются фагмидные векторы, имеющие ориджин репликации *E.coli* (для двухнитевой репликации), а также фаговый ориджин репликации (для продуцирования однонитевой ДНК). Особенности манипулирования с такими векторами и их экспрессии общеизвестны в данной области техники (Hoogenboom and Winter (1992), выше; Nissim et al. (1994), выше). Кратко, вектор может содержать ген р-лактамазы на фагмиде для придания селективности и *lac*-промотор, расположенный "вверх по течению" по отношению к экспрессирующей кассете, которая может содержать подходящую лидерную последовательность, сайт множественного клонирования, одну или более пептидных меток, один или более стоп-кодона TAG и рIII-белок фага. Таким образом, с использованием различных супрессорных и несупрессорных штаммов *E.coli* и с добавлением глюкозы, изопропилтио- β -D-галактозида (IPTG) или хелперного фага, такого как VCS M13, вектор способен реплицироваться в виде плазмиды без какой-либо экспрессии, продуцировать большие количества только данного члена библиотеки полипептидов либо продуктивные фаги, некоторые из которых содержат по меньшей мере одну копию слитой конструкции полипептид-рIII на своей поверхности.

Библиотеки и репертуары по изобретению могут быть представлены в форматах антител. Например, полипептид, содержащийся в библиотеках и репертуарах, может представлять собой отдельные V_H - или V_L -домены, каждый из которых или модифицирован, или не модифицирован. Фрагменты scFv, а также другие полипептиды антител, могут быть легко получены с использованием любого подходящего метода. В данной области техники хорошо известен ряд подходящих методов конструирования антител.

Например, scFv может быть образован путем соединения нуклеиновых кислот, кодирующих два переменных домена, с использованием подходящего олигонуклеотида, который кодирует соответствующий линкерный пептид, такой как (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃, или другие подходящие линкерные пептиды. Линкер связывает С-терминальный конец первой V-области и N-терминальный конец второй V-области. Для конструирования других форматов антител, таких как фрагменты Fv, Fab и F(ab')₂, могут быть использованы похожие методики. Для образования фрагментов Fab и F(ab')₂ полипептиды V_H и V_L могут быть объединены с сегментами константной области, которые могут быть получены из реаранжированных генов, С-генов (иммуноглобулинов) зародышевой линии или синтезированы на основании данных последовательности антител. Библиотека или репертуар по изобретению могут представлять собой библиотеку или репертуар V_H или V_L.

Полипептиды, содержащие протеазоустойчивый переменный домен, предпочтительно содержат сайт связывания с целевым лигандом (TNFR1) и сайт связывания с типичным лигандом. В некоторых воплощениях сайтом связывания с типичным лигандом является сайт связывания для суперантигена, такого как белок А, белок L или белок G. Основой для переменных доменов может служить любой желаемый переменный домен, например V_H человека (например, V_H 1a, V_H 1b, V_H 2, V_H 3, V_H 4, V_H 5, V_H 6), V_L человека (например, V_L I, V_L II, V_L III, V_L IV, V_L V, V_L VI или V_k 1) или V_k человека (например, V_k 2, V_k 3, V_k 4, V_k 5, V_k 6, V_k 7, V_k 8, V_k 9 или V_k 10) или V_{HH} верблюжьих, которые, возможно, были гуманизированы.

Нуклеиновые кислоты, клетки-хозяева и способы продуцирования протеазоустойчивых полипептидов

Данное изобретение также относится к выделенным и/или рекомбинантным нуклеиновым кислотам, кодирующим протеазоустойчивые пептиды или полипептиды, например, селективируемые или селективированные способами, описанными в данном изобретении.

Нуклеиновыми кислотами, обозначенными в данном изобретении как "выделенные", являются нуклеиновые кислоты, которые отделены от другого вещества (например, других нуклеиновых кислот, таких как геномная ДНК, кДНК и/или РНК) в своем первоначальном окружении (например, в клетках или в смеси нуклеиновых кислот, такой как библиотека). Выделенная нуклеиновая кислота может быть выделена в виде части вектора (например, плазмиды).

Нуклеиновыми кислотами, обозначенными в данном изобретении как "рекомбинантные", являются нуклеиновые кислоты, которые получены с использованием методологии рекомбинантной ДНК, включая способы, в основе которых лежит искусственная рекомбинация, такая как клонирование в вектор или хромосому с использованием, например, рестрикционных ферментов, гомологичная рекомбинация, использование вирусов и т.п., и нуклеиновые кислоты, полученные с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Изобретение также относится к рекомбинантной клетке-хозяину, которая содержит (одну или более) рекомбинантную нуклеиновую кислоту или экспрессирующую конструкцию, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую протеазоустойчивый пептид или полипептид, например, пептид или полипептид, селективируемый или селективированный способами, описанными в данном изобретении. Также предложен способ получения протеазоустойчивого пептида или полипептида, включающий поддержание рекомбинантной клетки-хозяина по изобретению в условиях, подходящих для экспрессии данного протеазоустойчивого пептида или полипептида. Способ может дополнительно включать стадию выделения или извлечения протеазоустойчивого пептида или полипептида, если желательно.

Например, нуклеиново-кислотную молекулу (т.е. одну или более из нуклеиново-кислотных молекул), кодирующую протеазоустойчивый пептид или полипептид, или экспрессирующую конструкцию (т.е. одну или более конструкций), содержащую такую нуклеиново-кислотную молекулу(ы), можно ввести в подходящую клетку-хозяина для создания рекомбинантной клетки-хозяина, используя любой способ, соответствующий выбранной клетке-хозяину (например, трансформацию, трансфекцию, электропорацию, инфекцию), с тем чтобы нуклеиново-кислотная молекула(ы) была оперативным образом связана с одним или более элементами контроля экспрессии (например, в векторе, в конструкции, созданной в результате процессов, протекающих в данной клетке, интегрированной в геном клетки-хозяина). Полученную рекомбинантную клетку-хозяина можно поддерживать в условиях, подходящих для экспрессии (например, в присутствии индуктора, в подходящем животном, в подходящих культуральных средах, дополненных соответствующими солями, ростовыми факторами, антибиотиками, пищевыми добавками и т.д.), в результате чего продуцируется кодируемый пептид или полипептид. Если желательно, кодируемый пептид или полипептид может быть выделен или извлечен (например, из животного, клетки-хозяина, среды, молока). Этот способ охватывает экспрессию в клетке-хозяине трансгенного животного (см., например, WO 92/03918, GenPharm International).

Кроме того, протеазоустойчивый пептид или полипептид, селективированный способом, описанным в данном изобретении, может быть получен в подходящей экспрессирующей системе *in vitro* посредством химического синтеза или посредством любого другого подходящего метода. Таким образом, в настоящем изобретении предложены протеазоустойчивые пептиды и полипептиды.

Полипептиды, dAb и антагонисты

Как здесь описано и примеры чего здесь приведены, протеазоустойчивые dAb по изобретению, как правило, связываются с их целевым лигандом с высокой аффинностью. Таким образом, в еще одном аспекте предложен способ селекции, выделения и/или извлечения полипептида или dAb по изобретению, связывающегося TNFR1 с высокой аффинностью. Как правило, способ включает получение библиотеки или репертуара пептидов или полипептидов (например, dAb), объединение библиотеки или репертуара с протеазой (например, трипсином, эластазой, лейкоцимом, панкреатином, слюной) в условиях, подходящих для протеазной активности, и селекцию, выделение и/или извлечение пептида или полипептида, связывающегося с лигандом (например, целевым лигандом). Поскольку библиотека или репертуар подвергается воздействию протеазы в условиях, в которых чувствительные к протеазе пептиды или полипептиды расщепляются, то активность протеазы может элиминировать менее стабильные полипептиды, обладающие низкой аффинностью связывания, и таким образом продуцировать коллекцию пептидов или полипептидов, обладающих высокой аффинностью связывания. Например, полипептид или dAb по изобретению может связываться с TNFR1 с аффинностью (K_D ; $K_D = K_{off}(kd)/K_{on}(ka)$), что определяют при помощи поверхностного плазмонного резонанса), составляющей 1 мкМ или более, или от приблизительно 500 нМ до приблизительно 0,5 пМ. Например, полипептид или dAb по изобретению может связываться с TNFR1 с аффинностью, составляющей приблизительно 500 нМ, приблизительно 100 нМ, приблизительно 10 нМ, приблизительно 1 нМ, приблизительно 500 пМ, приблизительно 100 пМ, приблизительно 10 пМ, приблизительно 1 пМ или приблизительно 0,5 пМ. Хотя авторы изобретения не желают быть связанными какой-либо конкретной теорией, пептиды и полипептиды, устойчивые к протеазам, как полагают, обладают меньшей энтропией и/или более высокой стабилизационной энергией. Таким образом, корреляция между устойчивостью к протеазе и высокой аффинностью связывания может быть связана с компактностью и стабильностью поверхностей пептидов и полипептидов и dAb, селективированных при помощи описанного здесь способа.

В одном из воплощений полипептид, dAb или антагонист по изобретению ингибирует связывание TNF α с рецептором TNF α I (рецептор p55) с ингибирующей концентрацией (IC_{50}), составляющей приблизительно от 500 нМ до 50 пМ, или от 100 нМ до 50 пМ, или от 10 нМ до 100 пМ, или от 1 нМ до 100 пМ; например 50 нМ или меньше, или 5 нМ или меньше, или 500 пМ или меньше, или 200 пМ или меньше, или 100 пМ или меньше.

В некоторых воплощениях полипептид, dAb или антагонист специфически связывается с TNFR1, например человеческим TNFR1, и диссоциирует от человеческого TNFR1 с константой диссоциации (K_D) от 300 нМ до 1 пМ, или от 300 нМ до 5 пМ, или от 50 нМ до 1 пМ, или от 50 нМ до 5 пМ, или от 50 нМ до 20 пМ, или приблизительно 10 пМ, или приблизительно 15 пМ, или приблизительно 20 пМ, что определяют при помощи поверхностного плазмонного резонанса. В некоторых воплощениях полипептид, dAb или антагонист специфически связывается с TNFR1, например человеческим TNFR1, и диссоциирует от человеческого TNFR1 с константой скорости K_{off} от $5 \times 10^{-1} \text{ c}^{-1}$ до $1 \times 10^{-7} \text{ c}^{-1}$, или от $1 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$ до $1 \times 10^{-7} \text{ c}^{-1}$, или от $1 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$ до $1 \times 10^{-7} \text{ c}^{-1}$, или от $1 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$ до $1 \times 10^{-7} \text{ c}^{-1}$, или $1 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, или $1 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$, что определяют при помощи поверхностного плазмонного резонанса. В некоторых воплощениях полипептид, dAb или антагонист специфически связывается с TNFR1, например человеческим TNFR1, с K_{on} от $1 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ до $1 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, или от $1 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ до $1 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, или приблизительно $1 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, или приблизительно $1 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. В одном из воплощений полипептид, dAb или антагонист специфически связывается с TNFR1, например человеческим TNFR1, и диссоциирует от человеческого TNFR1 с константой диссоциации (K_D) и K_{off} , определенными в этом абзаце. В одном из воплощений полипептид, dAb или антагонист специфически связывается с TNFR1, например человеческим TNFR1, и диссоциирует от человеческого TNFR1 с константой диссоциации (K_D) и K_{on} , определенными в абзаце. В некоторых воплощениях полипептид или dAb специфически связывается с TNFR1 (например, человеческим TNFR1) с K_D и/или K_{off} , и/или K_{on} , приведенными в этом абзаце, и содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности DOM1h-131-206 (представленной на фиг. 3).

Полипептид, dAb или антагонист может экспрессироваться в *E.coli* или в видах *Pichia* (например, *P. pastoris*). В одном из воплощений лиганд или мономер dAb секретируется в количестве, составляющем по меньшей мере приблизительно 0,5 мг/л при экспрессии в *E.coli* или видах *Pichia* (например, *P. pastoris*). Хотя описанные здесь лиганды и мономеры dAb могут быть секретруемыми при экспрессии в *E.coli* или видах *Pichia* (например, *P. pastoris*), они могут продуцироваться с использованием любого подходящего способа, такого как способы химического синтеза или способы биологической продукции, в которых не используется *E.coli* или виды *Pichia*.

В некоторых воплощениях полипептид, dAb или антагонист не содержат верблюжий (Camelid) иммуноглобулиновый вариабельный домен или одну или более каркасных аминокислот, которые являются уникальными для иммуноглобулиновых вариабельных доменов, кодируемых генными сегментами антигена зародышевой линии верблюда, например, в положении 108, 37, 44, 45 и/или 47.

Антагонисты TNFR1 могут быть моновалентными или поливалентными. В некоторых воплощениях антагонист является моновалентным и содержит один сайт связывания, который взаимодействует с TNFR1, где сайт связывания обеспечивается полипептидом или dAb по изобретению. Моновалентные антагонисты связываются с одним TNFR1 и могут не индуцировать перекрестное связывание или кластеризацию TNFR1 на поверхности клеток, что может привести к активации этого рецептора и трансдукции сигнала.

В других воплощениях антагонист TNFR1 является мультивалентным. Мультивалентные антагонисты TNFR1 могут содержать две или более чем две копии конкретного сайта связывания TNFR1 или содержать два или более чем два различных сайта, связывающих TNFR1, причем по меньшей мере один из связывающих сайтов обеспечивается полипептидом или dAb по изобретению. Например, как здесь описано, антагонист TNFR1 может представлять собой димер, тример или мультимер, содержащий две или более чем две копии конкретного полипептида или dAb по изобретению, связывающие TNFR1, или два или более чем два различных полипептида или dAb по изобретению, связывающие TNFR1. В одном из воплощений мультивалентный антагонист TNFR1, по существу, не оказывает антагонистическое действие в отношении TNFR1 (действует в качестве агониста TNFR1) в стандартном клеточном анализе (т.е. когда он представлен в концентрации 1, 10, 100 нМ, 1 мкМ, 10, 100, 1000 или 5000 мкМ, тогда он приводит в результате к не более чем приблизительно 5% опосредованной TNFR1 активности, индуцированной TNF α (100 пг/мл) в анализе).

В некоторых воплощениях мультивалентный антагонист TNFR1 содержит два или более чем два сайта связывания желаемого эпитопа или домена TNFR1. Например, мультивалентный антагонист TNFR1 может содержать два или более чем два сайта связывания, которые связываются одним и тем же эпитопом в домене 1 в TNFR1.

В других воплощениях мультивалентный антагонист TNFR1 содержит два или более чем два сайта связывания, обеспечиваемые полипептидами или dAb по изобретению, которые связываются с различными эпитопами или доменами в TNFR1. В одном из воплощений такие мультивалентные антагонисты не оказывают агонистического действия в отношении TNFR1, когда представлены в концентрации приблизительно 1 нМ, или приблизительно 10 нМ, или приблизительно 100 нМ, или приблизительно 1 мкМ, или приблизительно 10 мкМ, в стандартном анализе цитотоксичности L929 или стандартном анализе HeLa IL-8, как описано в WO 2006038027.

Другие антагонисты TNFR1 не ингибируют связывание TNF α с TNFR1. Такие лиганды (и антагонисты) могут обладать полезностью в качестве диагностических агентов, поскольку они могут быть использованы для связывания и обнаружения, количественного определения или измерения TNFR1 в образце, и не конкурируют с TNF в образце за связывание с TNFR1. Соответственно, может быть осуществлено точное определение того, присутствует ли или сколько присутствует TNFR1 в образце.

В других воплощениях полипептид, dAb или антагонист специфически связывается с TNFR1 с описанной здесь K_D и ингибирует летальность в стандартной модели септического шока у мышей, вызванной LPS (липополисахарид)/d-галактозамином (т.е. предотвращает летальность или уменьшает летальность по меньшей мере приблизительно на 10% по сравнению с подходящим контролем). В одном из воплощений полипептид, dAb или антагонист ингибирует летальность по меньшей мере приблизительно на 25% или по меньшей мере приблизительно на 50% по сравнению с подходящим контролем в стандартной модели септического шока у мышей, вызванной LPS/D-галактозамином, при введении в концентрации приблизительно 5 мг/кг или больше, например приблизительно 1 мг/кг.

В других воплощениях полипептид, dAb или антагонист связывается с TNFR1 и оказывает антагонистическое действие в отношении активности TNFR1 в стандартном клеточном анализе с ND_{50} не более 100 нМ, и в концентрации не более 10 мкМ dAb оказывает агонистическое действие в отношении активности TNFR1 не более чем на 5% в анализе.

В конкретных воплощениях полипептид, dAb или антагонист, по существу, не оказывает антагонистического действия в отношении TNFR1 (действует в качестве агониста TNFR1) в стандартном клеточном анализе (т.е. когда представлен в концентрации 1, 10, 100 нМ, 1 мкМ, 10, 100, 1000 или 5000 мкМ, приводя в результате к не более чем приблизительно 5% опосредованной TNFR1 активности, индуцированной TNF α (100 пг/мл) в анализе).

В некоторых воплощениях полипептид, dAb или антагонист по изобретению являются эффективными в модели хронических воспалительных заболеваний, когда вводят эффективное количество. Как правило, эффективное количество составляет от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг (например, приблизительно 1 мг/кг, приблизительно 2 мг/кг, приблизительно 3 мг/кг, приблизительно 4 мг/кг, приблизительно 5 мг/кг, приблизительно 6 мг/кг, приблизительно 7 мг/кг, приблизительно 8 мг/кг, приблизительно 9 мг/кг или приблизительно 10 мг/кг). Модели хронического воспалительного заболевания (см. описанные в WO 2006038027) признаны специалистами в данной области техники в качестве моделей, прогнозирующих терапевтическую эффективность у людей.

В конкретных воплощениях полипептид, dAb или антагонист эффективен в стандартной модели индуцированного коллагеном артрита у мышей (подробную информацию о модели см. в

тельно 5 суток, приблизительно 6 суток, приблизительно 7 суток, приблизительно 10 суток, приблизительно 14 суток, приблизительно 21 сутки или приблизительно 28 суток по сравнению с подходящим контролем. В еще одном примере введение эффективного количества полипептида, dAb или антагониста может приводить в результате к средней оценке тяжести в вызванной DSS модели IBD у мышей, составляющей от 0 до приблизительно 0,5, от приблизительно 0,5 до приблизительно 1, от приблизительно 1 до приблизительно 1,5, от приблизительно 1,5 до приблизительно 2 или от приблизительно 2 до приблизительно 2,5.

В конкретных воплощениях полипептид, dAb или антагонист эффективен в вызванной табачным дымом модели хронического обструктивного заболевания легких (COPD) (подробную информацию о модели см. в WO 2006038027 и WO 2007049017). Например, введение эффективного количества лиганда может уменьшать или замедлять возникновение симптомов COPD по сравнению с подходящим контролем.

Имеются модельные системы на животных, которые можно использовать для скрининга эффективности антагонистов TNFR1 (например, лигандов, антител или связывающихся с ними белков) в предотвращении или лечении заболеваний. В области техники известны методы тестирования системной красной волчанки (SLE) на восприимчивых мышах (Knight et al. (1978), *J. Exp. Med.*, 147: 1653; Reinersten et al. (1978), *New Eng. J. Med.*, 299: 515). Злокачественную миастению (MG) тестируют на самках мышей SJL/J, индуцируя заболевание растворимым белком AchR из другого вида (Lindstrom et al. (1988), *Adv. Immunol.*, 42: 233). Артрит у восприимчивой линии мышей вызывают введением коллагена II типа (Stuart et al. (1984), *Ann. Rev. Immunol.*, 42: 233). Описана модель, в которой адьювантный артрит у восприимчивых крыс вызывают введением белка теплового шока микобактерий (Van Eden et al. (1988), *Nature*, 331: 171). Тиреоидит у мышей вызывают введением тироглобулина, как описано (Maron et al. (1980), *J. Exp. Med.*, 152: 1115). Инсулинозависимый сахарный диабет (IDDM) возникает естественным образом или может быть вызван у определенных линий мышей типа тех, что описаны в Kanasawa et al. (1984), *Diabetologia*, 27: 113. EAE у мышей и крыс служит моделью рассеянного склероза (MS) у человека. В этой модели демиелинизирующее заболевание вызывается введением основного белка миелина (см. Paterson (1986), *Textbook of Immunopathology*, Mischer et al., eds., Grune and Stratton, New York, p. 179-213; McFarlin et al. (1973), *Science*, 179: 478; Satoh et al. (1987), *J. Immunol.*, 138: 179).

Как правило, лиганды по настоящему изобретению (например, антагонисты) будут использоваться в очищенной форме вместе с фармакологически приемлемыми носителями. Обычно эти носители включают водные или спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, любые среды, включающие физиологический раствор, и/или буферные среды. Парентеральные разбавители включают раствор хлорида натрия, декстрозный раствор Рингера, декстрозу и хлорид натрия и раствор Рингера с лактатом. Подходящие физиологически приемлемые адьюванты, при необходимости хранения полипептидного комплекса в суспензии, могут быть выбраны из таких загустителей, как карбоксиметилцеллюлоза, поливинилпирролидон, желатин и альгинаты.

Внутривенные разбавители включают жидкость, питательные добавки и электролитные добавки, такие как разбавители на основе декстрозного раствора Рингера. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как антимикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие агенты и инертные газы (Mack (1982), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16-е издание). Можно использовать различные подходящие композиции, включая композиции с длительным высвобождением.

Лиганды (например, антагонисты) по настоящему изобретению могут быть использованы в виде вводимых по отдельности композиций или вместе с другими агентами. Они могут включать различные иммунотерапевтические лекарственные средства, такие как циклоспорин, метотрексат, адриамицин или цисплатин, и иммунотоксины. Фармацевтические композиции могут включать "коктейли" различных цитотоксических или других агентов вместе с лигандами по настоящему изобретению или даже комбинациями лигандов по настоящему изобретению, имеющих различные специфичности, таких как лиганды, селективированные с использованием различных целевых антигенов или эпитопов, независимо от того, объединены они перед введением или нет.

Путь введения фармацевтических композиций по изобретению может представлять собой любой из путей, хорошо известных средним специалистам в данной области техники. Что касается терапии, включая, но не ограничиваясь этим, иммунотерапию, то селективированные лиганды по изобретению могут быть введены любому пациенту в соответствии со стандартными методиками.

Введение может быть осуществлено любым подходящим способом, в том числе парентерально, внутривенно, внутримышечно, интраперитонеально, трансдермально, через легочный путь или соответственно также посредством прямой инфузии с использованием катетера. Дозировка и частота введения будут зависеть от возраста, пола и состояния пациента, совместного введения других лекарственных средств, противопоказаний и других параметров, которые должны быть учтены практикующим врачом. Введение может быть локальным (например, локальная доставка в легкое путем внутрилегочного введения, например интраназального введения) или системным, по показаниям.

Лиганды по данному изобретению могут быть лиофилизированы для хранения и повторного разведения в подходящем носителе перед применением. Показано, что эта методика эффективна для традиционных иммуноглобулинов и что могут быть использованы известные в данной области методики лиофи-

лизации и разведения. Специалистам в данной области техники будет понятно, что лиофилизация и разведение могут приводить к потере антителами активности в различной степени (например, что касается традиционных иммуноглобулинов, то IgM антитела имеют тенденцию к большей потере активности, чем IgG антитела) и что используемые уровни, возможно, следует коррелировать с целью компенсации.

Композиции, содержащие лиганды по настоящему изобретению (например, антагонисты), или их коктейль, можно вводить для профилактического и/или терапевтического лечения. В некоторых терапевтических применениях адекватное количество, необходимое для достижения, по меньшей мере, частичного ингибирования, подавления, модуляции, киллинга или какого-либо другого измеряемого параметра популяции выбранных клеток, определяют как "терапевтически эффективную дозу". Количества, необходимые для достижения этой дозировки, будут зависеть от тяжести заболевания и общего состояния иммунной системы пациента, но обычно варьируют от 0,005 до 5,0 мг лиганда, например dAb или антагониста, на 1 кг массы тела, где чаще всего используют дозы от 0,05 до 2,0 мг/кг/доза. В случае профилактических применений композиции, содержащие лиганды по настоящему изобретению или их коктейли, также можно вводить в похожих или нескольких меньших дозировках для предупреждения, ингибирования или задержки начала заболевания (например, для поддержания ремиссии или бессимптомного состояния, либо для предупреждения острой фазы). Практикующий врач сможет определить подходящий интервал дозирования для лечения, подавления или предупреждения заболевания. Когда лиганд TNFR1 (например, антагонист) вводят для лечения, подавления или предупреждения хронического воспалительного заболевания, тогда его можно вводить вплоть до четырех раз в сутки, два раза в неделю, один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз в месяц или один раз каждые два месяца в дозе, например, от примерно 10 мкг/кг до примерно 80 мг/кг, от примерно 100 мкг/кг до примерно 80 мг/кг, от примерно 1 до примерно 80 мг/кг, от примерно 1 до примерно 70 мг/кг, от примерно 1 до примерно 60 мг/кг, от примерно 1 до примерно 50 мг/кг, от примерно 1 до примерно 40 мг/кг, от примерно 1 до примерно 30 мг/кг, от примерно 1 до примерно 20 мг/кг, от примерно 1 до примерно 10 мг/кг, от примерно 10 до примерно 10 мг/кг, от примерно 10 мкг/кг до примерно 5 мг/кг, от примерно 10 мкг/кг до примерно 2,5 мг/кг, примерно 1 мг/кг, примерно 2, примерно 3, примерно 4, примерно 5, примерно 6, примерно 7, примерно 8, примерно 9 или примерно 10 мг/кг. В конкретных воплощениях лиганд TNFR1 (например, антагонист) вводят для лечения, подавления или предупреждения хронического воспалительного заболевания один раз в неделю или один раз в месяц в дозе от примерно 10 мкг/кг до примерно 10 мг/кг (например, примерно 10, примерно 100 мкг/кг, примерно 1 мг/кг, примерно 2, примерно 3, примерно 4, примерно 5, примерно 6, примерно 7, примерно 8, примерно 9 или примерно 10 мг/кг).

Лечение или терапия, проведенные с использованием композиций, описанных в данном изобретении, считаются "эффективными", если один или более симптомов ослабляются (например, по меньшей мере на 10% или по меньшей мере на один пункт по шкале клинической оценки) относительно таких симптомов, присутствующих до лечения, или относительно таких симптомов у индивидуума (человека или модельного животного), не подвергнутого лечению такой композицией или другим подходящим контролем. Конечно, симптомы будут варьировать в зависимости от целевого заболевания или расстройства, но могут быть оценены практикующим врачом или специалистом средней квалификации. Такие симптомы могут быть оценены, например, посредством мониторинга уровня одного или более биохимических индикаторов заболевания или расстройства (например, уровней фермента или метаболита, которые коррелируют с данным заболеванием, количеством пораженных клеток и т.д.), посредством мониторинга физических проявлений (например, воспаления, размера опухоли и т.д.) или согласно принятой шкале клинической оценки, например, расширенной шкале инвалидизации (Expanded Disability Status Scale (EDSS)) (для множественного склероза), опроснику Ирвина больных воспалительным заболеванием кишечника (Irvine Inflammatory Bowel Disease Questionnaire) (32 вопроса позволяют оценить качество жизни в отношении кишечной функции, системных симптомов, социальной функции и эмоционального статуса - оценка варьирует от 32 до 224 баллов, при этом более высокие баллы указывают на лучшее качество жизни), шкале оценки качества жизни больных ревматоидным артритом (Quality of Life Rheumatoid Arthritis Scale) или другой приемлемой шкале клинической оценки, известной в данной области.

Длительное (например, в течение одних суток или более, или еще дольше) ослабление симптомов заболевания или расстройства по меньшей мере на 10% или по меньшей мере на один или более пунктов по данной клинической шкале является показателем "эффективного" лечения. Аналогично, профилактика, осуществляемая с использованием композиции, описанной в данном изобретении, является "эффективной", если начало или тяжесть одного или более чем одного симптома замедляется, уменьшается или исчезает по сравнению с такими симптомами у аналогичного индивидуума (человека или животной модели), не подвергнутого лечению данной композицией.

Композиция, содержащая лиганд (например, антагонист) или его коктейль по настоящему изобретению, может быть использована в профилактических и терапевтических целях для изменения, инактивации, киллинга или удаления выбранной популяции целевых клеток у млекопитающего. В дополнение к этому, выбранные репертуары полипептидов, описанных в данном изобретении, могут быть использованы экстракорпорально или селективно *in vitro* для киллинга, истощения или иного эффективного удаления популяции целевых клеток из гетерогенной коллекции клеток. Кровь млекопитающего можно объе-

динить экстракорпорально с лигандами, посредством чего нежелательные клетки подвергаются уничтожению или иным образом удаляются из крови для возврата млекопитающему в соответствии со стандартными методиками.

Композиция, содержащая лиганд (например, антагонист) по настоящему изобретению, может быть использована в профилактических и терапевтических целях для изменения, инактивации, уничтожения или удаления выбранной популяции целевых клеток у млекопитающего.

Лиганды (например, антагонисты TNFR1, мономеры dAb) могут быть введены и/или приготовлены вместе с одним или более чем одним дополнительным терапевтическим или активным агентом. Когда лиганд (например, dAb) вводят с дополнительным терапевтическим агентом, тогда указанный лиганд может быть введен до, одновременно или после введения дополнительного агента. Как правило, лиганд и дополнительный агент вводят способом, обеспечивающим перекрытие терапевтического эффекта.

В одном из воплощений изобретение относится к способу лечения, подавления или предупреждения хронического воспалительного заболевания, включающему введение млекопитающему, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективной(го) дозы или количества полипептида, dAb или антагониста TNFR1 по изобретению.

В одном из воплощений изобретение относится к способу лечения, подавления или предупреждения артрита (например, ревматоидного артрита, ювенильного ревматоидного артрита, анкилозирующего спондилита, псориатического артрита), включающему введение млекопитающему, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективной(го) дозы или количества полипептида, dAb или антагониста TNFR1 по изобретению.

В другом воплощении изобретение относится к способу лечения, подавления или предупреждения псориаза, включающему введение млекопитающему, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективной(го) дозы или количества полипептида, dAb или антагониста TNFR1 по изобретению.

В другом воплощении изобретение относится к способу лечения, подавления или предупреждения воспалительного заболевания кишечника (например, болезни Крона, язвенного колита), включающему введение млекопитающему, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективной(го) дозы или количества полипептида, dAb или антагониста TNFR1 по изобретению.

В другом воплощении изобретение относится к способу лечения, подавления или предупреждения хронического обструктивного заболевания легких (например, хронического бронхита, хронического обструктивного бронхита, эмфиземы), включающему введение млекопитающему, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективной(го) дозы или количества полипептида, dAb или антагониста TNFR1 по изобретению.

В другом воплощении изобретение относится к способу лечения, подавления или предупреждения пневмонии (например, бактериальной пневмонии, такой как стафилококковая пневмония), включающему введение млекопитающему, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективной(го) дозы или количества полипептида, dAb или антагониста TNFR1 по изобретению.

В изобретении предложен способ лечения, подавления или предупреждения других заболеваний легких в дополнение к хроническому обструктивному заболеванию легких и пневмонии. Другие заболевания легких, которые можно лечить, подавлять или предупреждать в соответствии с изобретением, включают, например, муковисцидоз и астму (например, стероид-резистентную астму). Таким образом, в другом воплощении изобретение относится к способу лечения, подавления или предупреждения заболевания легких (например, муковисцидоза, астмы), включающему введение млекопитающему, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективной(го) дозы или количества полипептида, dAb или антагониста TNFR1 по изобретению.

В конкретных воплощениях антагонист TNFR1 вводят посредством внутрилегочной доставки, такой как ингаляция (например, внутривнутрибронхиальная, интраназальная или пероральная ингаляция, интраназальные капли), или посредством системной доставки (например, парентеральной, внутривенной, внутримышечной, интраперитонеальной, подкожной).

В другом воплощении изобретение относится к способу лечения, подавления или предупреждения септического шока, включающему введение млекопитающему, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективной(го) дозы или количества полипептида, dAb или антагониста TNFR1 по изобретению.

В другом аспекте изобретения предложена композиция, содержащая полипептид, dAb или антагонист TNFR1 по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

Кроме того, согласно настоящему изобретению предложен способ лечения заболевания с использованием полипептида, dAb или антагониста TNFR1 либо композиции по настоящему изобретению. В одном из воплощений заболевание представляет собой рак или воспалительное заболевание, например ревматоидный артрит, астму или болезнь Крона.

Форматы

Увеличенный период полувыведения полезен для применений *in vivo* иммуноглобулинов, особенно антител и в особенности фрагментов антител небольшого размера. Такие фрагменты (Fv, связанные дисульфидной связью Fv, Fab, scFv, dAb) подвергаются быстрому клиренсу из организма; таким образом, несмотря на то, что они способны быстро достигать большинства частей организма, их можно быстро получить и с ними легче работать, их применения *in vivo* были ограничены только их непродолжительной персистенцией *in vivo*. Одно из воплощений изобретения решает эту проблему путем обеспечения увеличенного периода полувыведения лигандов *in vivo* и, следовательно, более длительного сохранения в организме функциональной активности лиганда.

Методы фармакокинетического анализа и определения периода полувыведения лиганда хорошо известны специалистам в данной области техники. Подробности можно найти в Kenneth, A. et al.: *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists* и в Peters et al., *Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach* (1996). Также дана ссылка на "Pharmacokinetics", M. Gibaldi & D. Perron, опубликованную Marcel Dekker, 2nd Rev. ex edition (1982), где описаны такие фармакокинетические параметры, как периоды полувыведения t-альфа и t-бета и площадь под кривой (AUC).

Периоды полувыведения (t^{1/2} альфа и t^{1/2} бета) и AUC можно определить из кривой зависимости концентрации лиганда в сыворотке от времени. Для моделирования кривой можно использовать пакет программ WinNonlin (фирмы Pharsight Corp., Mountain View, CA94040, USA). В первой фазе (альфа-фазе) лиганд в основном подвергается распределению в организме пациента с некоторой элиминацией. Вторая фаза (бета-фаза) представляет собой конечную фазу, когда лиганд уже распределен и концентрация в сыворотке уменьшается по мере того, как лиганд выводится из организма пациента. Период полувыведения t-альфа представляет собой период полувыведения в первой фазе, а период полувыведения t-бета представляет собой период полувыведения во второй фазе. Таким образом, в одном из воплощений согласно настоящему изобретению предложены лиганд или композиция, содержащая лиганд по изобретению, с периодом полувыведения t-альфа в диапазоне 15 мин или больше. В одном из воплощений нижняя граница диапазона составляет 30, 45 мин, 1 ч, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11 или 12 ч. В дополнение к этому, или альтернативно, лиганд или композиция по изобретению будут иметь период полувыведения t-альфа в диапазоне до 12 ч включительно. В одном из воплощений верхняя граница диапазона составляет 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 ч. Примером подходящего диапазона является диапазон от 1 до 6 ч, от 2 до 5 ч или от 3 до 4 ч.

В одном из воплощений согласно настоящему изобретению предложены лиганд (полипептид, dAb или антагонист) или композиция, содержащая лиганд по изобретению, с периодом полувыведения t-бета в диапазоне 2,5 ч или больше. В одном из воплощений нижняя граница диапазона составляет 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11 или 12 ч. В дополнение к этому, или альтернативно, лиганд или композиция по изобретению имеют период полувыведения t-бета в диапазоне до 21 суток включительно. В одном из воплощений верхняя граница диапазона составляет 12, 24 ч, 2 суток, 3, 5, 10, 15 или 20 суток. В одном из воплощений лиганд или композиция по изобретению будут иметь период полувыведения t-бета в диапазоне от 12 до 60 ч. В другом воплощении он будет лежать в диапазоне от 12 до 48 ч. В еще одном воплощении он будет лежать в диапазоне от 12 до 26 ч.

В дополнение к этому или в противоположность приведенным выше критериям, согласно настоящему изобретению предложены лиганд или композиция, содержащая лиганд по изобретению, имеющие величину AUC (площадь под кривой) в диапазоне 1 мг·мин/мл или больше. В одном из воплощений нижняя граница диапазона составляет 5, 10, 15, 20, 30, 100, 200 или 300 мг·мин/мл. В дополнение к этому, или альтернативно, лиганд или композиция по изобретению имеют AUC в диапазоне до 600 мг·мин/мл. В одном из воплощений верхняя граница диапазона составляет 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75 или 50 мг·мин/мл. В одном из воплощений лиганд по изобретению будет иметь AUC в диапазоне, выбранном из группы, состоящей из следующего: 15-150, 15-100, 15-75 и 15-50 мг·мин/мл.

Полипептиды и dAb по изобретению и антагонисты, содержащие их, могут быть представлены в формате с большим гидродинамическим размером, например, посредством присоединения ПЭГ (полиэтиленгликоль) группы, сывороточного альбумина, трансферрина, рецептора трансферрина или, по меньшей мере, его трансферрин-связывающей части, Fc-области антитела, или посредством конъюгирования с доменом антитела. Например, полипептиды, dAb и антагонисты были форматированы в виде более крупного антигенсвязывающего фрагмента антитела или в виде антитела (например, форматированы в виде Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, IgG, scFv).

Гидродинамический размер лигандов (например, мономеров и мультимеров dAb) по изобретению может быть определен с использованием способов, которые хорошо известны в данной области техники. Например, для определения гидродинамического размера лиганда может быть использована гель-фильтрационная хроматография. Матрицы, подходящие для гель-фильтрационного определения гидродинамических размеров лигандов, такие как поперечносшитые агарозные матрицы, хорошо известны и легко доступны.

Размер формата лиганда (например, размер ПЭГ группировки, присоединенной к мономеру dAb),

можно варьировать в зависимости от желаемого применения. Например, когда лиганд, как предполагают, удаляется из кровообращения и проникает в периферические ткани, то желательно поддерживать гидродинамический размер лиганда достаточно низким для того, чтобы облегчить выход из кровотока. Альтернативно, когда желательно, чтобы лиганд оставался в системном кровообращении в течение более продолжительного периода времени, тогда размер лиганда можно увеличить, например, путем форматирования в виде Ig-подобного белка.

Увеличение периода полувыведения путем конъюгирования с антигеном или эпитопом, который увеличивает период полувыведения *in vivo*

Гидродинамический размер лиганда и период его полувыведения из сыворотки также могут быть увеличены путем конъюгирования или присоединения TNFR1-связывающего полипептида, dAb или антагониста по изобретению к связывающему домену (например, антителу или фрагменту антитела), который связывается с антигеном или эпитопом, который увеличивает период полувыведения *in vivo*, как описано в данном изобретении. Например, TNFR1-связывающий агент (например, полипептид) может быть конъюгирован или связан с антителом или фрагментом антитела против сывороточного альбумина или против неонатального Fc-рецептора, например dAb, Fab, Fab' или scFv против SA или против неонатального Fc-рецептора, или с аффителом против SA или аффителом против неонатального Fc-рецептора, или авимером против SA, или связывающим доменом против SA, который содержит каркас, выбранный, но предпочтительно не ограниченный этим, из группы, состоящей из CTLA-4, липокалина, SpA, аффитела, авимера, GroE1 и фибронектина (см. PCT/GB2008/000453, поданную 8 февраля 2008 г., в которой описаны эти связывающие домены, при этом указанные домены и их последовательности включены в данную заявку посредством ссылки и образуют часть описания настоящего изобретения). Конъюгирование относится к композиции, содержащей полипептид, dAb или антагонист по изобретению, которые связываются (ковалентно или нековалентно) со связывающим доменом, который связывается с сывороточным альбумином.

Подходящие полипептиды, которые увеличивают период полувыведения из сыворотки *in vivo*, включают, например, белки слияния лиганда, специфичного к рецептору трансферрина, и нейрофармацевтического агента (см. патент США № 5977307, содержание которого включено в данное описание посредством ссылки), рецептор эндотелиальных клеток капилляров головного мозга, трансферрин, рецептор трансферрина (например, растворимый рецептор трансферрина), инсулин, рецептор инсулиноподобного ростового фактора 1 (IGF 1), рецептор инсулиноподобного ростового фактора 2 (IGF 2), рецептор инсулина, фактор свертывания крови X, α 1-антитрипсин и HNF 1 α (ядерный фактор гепатоцитов 1 α). Подходящие полипептиды, которые увеличивают период полувыведения из сыворотки, также включают альфа-1-гликопротеин (орозомукоид; AAG), альфа-1-антихимотрипсин (ACT), альфа-1-микроглобулин (белок HC; AIM), антитромбин III (AT III), аполипопротеин A-1 (Apo A-1), аполипопротеин B (Apo B), церулоплазмин (Cp), компонент комплемента C3 (C3), компонент комплемента C4 (C4), ингибитор эстеразы C1 (C1 INH), C-реактивный белок (CRP), ферритин (FER), гемопексин (HPX), липопротеин(а) (Lp(a)), маннозасвязывающий белок (MBP), миоглобин (Myo), преальбумин (транстиретин; PAL), ретинолсвязывающий белок (RBP) и ревматоидный фактор (RF).

Подходящие белки внеклеточного матрикса включают, например, коллагены, ламинины, интегрины и фибронектин. Коллагены являются основными белками внеклеточного матрикса. В настоящее время известно около 15 типов коллагеновых молекул, обнаруженных в различных частях организма, например коллаген I типа (составляющий 90% коллагена организма), обнаруженный в костях, коже, сухожилиях, связках, роговице, внутренних органах, или коллаген II типа, обнаруженный в хряще, позвоночном диске, хорде и стекловидном теле глаза.

Подходящие белки крови включают, например, белки плазмы (например, фибрин, α -2-макроглобулин, сывороточный альбумин, фибриноген (например, фибриноген А, фибриноген В), сывороточный амилоидный белок А, гаптоглобин, профилин, убиквитин, утероглобулин и β -2-микроглобулин), ферменты и ингибиторы ферментов (например, плазминоген, лизоцим, цистатин С, альфа-1-антитрипсин и панкреатический ингибитор трипсина), белки иммунной системы, такие как иммуноглобулиновые белки (например, IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, легкие цепи (каппа/лямбда) иммуноглобулинов), транспортные белки (например, ретинолсвязывающий белок, α -1-микроглобулин), дефензины (например, бета-дефензин 1, дефензин нейтрофилов 1, дефензин нейтрофилов 2 и дефензин нейтрофилов 3) и т.п.

Подходящие белки, обнаруженные в гематоэнцефалическом барьере или в нервной ткани, включают, например, рецептор меланокортина, миелин, переносчик аскорбата и т.п.

Подходящие полипептиды, которые увеличивают период полувыведения из сыворотки *in vivo*, также включают белки, локализованные в почке (например, полицистин, коллаген IV типа, переносчик органических анионов KI, антиген Хейманна), белки, локализованные в печени (например, алкогольдегидрогеназу, G250), белки, локализованные в легком (например, секреторный компонент, который связывается с IgA), белки, локализованные в сердце (например, HSP (белок теплового шока) 27, который ассоциируется с дилатационной кардиомиопатией), белки, локализованные в коже (например, кератин), ос-

теоспецифические белки, такие как (костные) морфогенные белки (BMP), которые представляют собой подгруппу суперсемейства белков трансформирующего ростового фактора β , демонстрирующих остеогенную активность (например, BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8), опухолеспецифические белки (например, трофобластный антиген, герцептиновый рецептор, эстрогеновый рецептор, катепсины (например, катепсин В, который можно обнаружить в печени и селезенке)).

Подходящие белки, специфические для заболевания, включают, например, антигены, экспрессируемые только на активированных Т-клетках, включая LAG-3 (ген активации лимфоцитов), лиганд остеопротегерина (OPGL; см. Nature 402, 304-309 (1999)), OX40 (член семейства рецепторов TNF, экспрессирующийся на активированных Т-клетках и специфически активируемый в Т-клетках человека, продуцирующих вирус лейкоза типа I (HTLV-I); см. Immunol. 165 (1): 263-70 (2000)). Подходящие белки, специфические для заболевания, также включают, например, металлопротеазы (ассоциированные с артритом/видами рака), включая CG6512 дрозофилы (*Drosophila*), параплегии человека, FtsH человека, AFG3L2 человека, ftsH мыши; и ангиогенные ростовые факторы, включая кислотный фактор роста фибробластов (FGF-1), основной фактор роста фибробластов (FGF-2), фактор роста сосудистого эндотелия/фактор проницаемости сосудов (VEGF/VPF), трансформирующий фактор роста- α (TGF α), фактор некроза опухолей-альфа (TNF- α), ангиогенин, интерлейкин-3 (IL-3), интерлейкин-8 (IL-8), тромбоцитарный эндотелиальный фактор роста (PD-ECGF), плацентарный ростовой фактор (PlGF), фактор роста тромбоцитов(PDGF)-BB мидкин (midkine) и фракталкин (fractalkine).

Подходящие полипептиды, увеличивающие период полувыведения из сыворотки *in vivo*, также включают стресс-белки, такие как белки теплового шока (HSP). В норме HSP являются внутриклеточными. Когда они обнаруживаются вне клеток, это является индикатором того, что клетка погибла и из нее вылилось содержимое. Эта непрограммируемая гибель клеток (некроз) случается как результат травмы, заболевания или повреждения, при этом внеклеточные HSP запускают ответ иммунной системы. Связывание с внеклеточным HSP может приводить к локализации композиции по изобретению в месте заболевания.

Подходящие белки, вовлеченные в Fc-транспорт, включают, например, рецептор Брамбелла (также известный как FcRB). Этот Fc-рецептор имеет две функции, обе из которых потенциально полезны для доставки. Функции представляют собой (1) транспорт IgG от матери к ребенку через плаценту; (2) защиту IgG от расщепления с пролонгированием тем самым периода его полувыведения из сыворотки. Полагают, что данный рецептор осуществляет рециркуляцию IgG из эндосом (см. Holliger et al., Nat. Biotechnol. 15(7): 632-6 (1997)).

dAb, связывающиеся с сывороточным альбумином

Согласно изобретению в одном из воплощений предложен полипептид или антагонист (например, лиганд с двойной специфичностью, содержащий dAb против TNFR1 (первое dAb)), который связывается с TNFR1, и второе dAb, которое связывается с сывороточным альбумином (SA), причем второе dAb связывается с SA с K_D , как определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, составляющей от 1 нМ до 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 100, 200, 300, 400 или 500 мкМ (т.е. от $\times 10^{-9}$ до 5×10^{-4}), или от 100 нМ до 10 мкМ, или от 1 до 5 мкМ или от 3 до 70 нМ или от 10 нМ до 1, 2, 3, 4 или 5 мкМ. Например, от 30 до 70 нМ, как определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса. В одном из воплощений первое dAb (или мономер dAb) связывается с SA (например, HSA) с K_D , как определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, составляющей приблизительно 1, 50, 70, 100, 150, 200, 300 нМ или 1, 2 или 3 мкМ. В одном из воплощений, относящихся к лиганду с двойной специфичностью, содержащему первое анти-SA dAb и второе dAb к TNFR1, аффинность (например, K_D и/или K_{off} , как измерено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием BiaCore) второго dAb в отношении своей мишени от 1 до 100000 раз (например, от 100 до 100000, или от 1000 до 100000, или от 10000 до 100000 раз) выше аффинности первого dAb в отношении SA. В одном из воплощений сывороточным альбумином является сывороточный альбумин человека (HSA). Например, первое dAb связывается с SA с аффинностью приблизительно 10 мкМ, тогда как второе dAb связывается со своей мишенью с аффинностью 100 пМ. В одном из воплощений сывороточным альбумином является сывороточный альбумин человека (HSA). В одном из воплощений первое dAb связывается с SA (например, HSA) с K_D приблизительно 50, например 70, 100, 150 или 200 нМ. Подробности относительно лигандов с двойной специфичностью можно найти в WO 03002609, WO 04003019 и WO 04058821.

Лиганды по изобретению в одном из воплощений могут содержать dAb, которое связывается с сывороточным альбумином (SA) с K_D , как определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, составляющей от 1 нМ до 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 100, 200, 300, 400 или 500 мкМ (т.е. от $\times 10^{-9}$ до 5×10^{-4}), или от 100 нМ до 10 мкМ, или от 1 до 5 мкМ, или от 3 до 70 нМ, или от 10 нМ до 1, 2, 3, 4 или 5 мкМ. Например, от 30 до 70 нМ, как определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса. В одном из воплощений первое dAb (или мономер dAb) связывается с SA (например, HSA) с K_D , как определено с помощью поверхностного плазмонного резонанса, приблизительно 1, 50, 70, 100, 150, 200, 300 нМ или 1, 2 или 3 мкМ. В одном из воплощений первое и второе dAb соединены линкером, например линкером, состоящим из 1-4 аминокислот, или из 1-3 аминокислот, или более 3 аминокислот, или

более 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 или 20 аминокислот. В одном из воплощений более длинный линкер (более 3 аминокислот) используют для повышения эффективности (K_D одного или обоих dAb в данном антагонисте).

В конкретных воплощениях лигандов и антагонистов dAb связывается с сывороточным альбумином человека и конкурирует за связывание с альбумином с cAb, выбранным из группы, состоящей из:

MSA-16, MSA-26 (для описания этих последовательностей см. WO 04003019, причем данные последовательности и их нуклеиново-кислотные аналоги включены в данное описание посредством ссылки и образуют часть описания настоящего текста);

DOM7m-16 (SEQ ID NO: 473), DOM7m-12 (SEQ ID NO: 474), DOM7m-26 (SEQ ID NO: 475), DOM7r-1 (SEQ ID NO: 476), DOM7r-3 (SEQ ID NO: 477), DOM7r-4 (SEQ ID NO: 478), DOM7r-5 (SEQ ID NO: 479), DOM7r-7 (SEQ ID NO: 480), DOM7r-8 (SEQ ID NO: 481), DOM7h-2 (SEQ ID NO: 482), DOM7h-3 (SEQ ID NO: 483), DOM7h-4 (SEQ ID NO: 484), DOM7h-6 (SEQ ID NO: 485), DOM7h-1 (SEQ ID NO: 486), DOM7h-7 (SEQ ID NO: 487), DOM7h-22 (SEQ ID NO: 489), DOM7h-23 (SEQ ID NO: 490), DOM7h-24 (SEQ ID NO: 491), DOM7h-25 (SEQ ID NO: 492), DOM7h-26 (SEQ ID NO: 493), DOM7h-21 (SEQ ID NO: 494), DOM7h-27 (SEQ ID NO: 495), DOM7h-8 (SEQ ID NO: 496), DOM7r-13 (SEQ ID NO: 497), DOM7r-14 (SEQ ID NO: 498), DOM7r-15 (SEQ ID NO: 499), DOM7r-16 (SEQ ID NO: 500), DOM7r-17 (SEQ ID NO: 501), DOM7r-18 (SEQ ID NO: 502), DOM7r-19 (SEQ ID NO: 503), DOM7r-20 (SEQ ID NO: 504), DOM7r-21 (SEQ ID NO: 505), DOM7r-22 (SEQ ID NO: 506), DOM7r-23 (SEQ ID NO: 507), DOM7r-24 (SEQ ID NO: 508), DOM7r-25 (SEQ ID NO: 509), DOM7r-26 (SEQ ID NO: 510), DOM7r-27 (SEQ ID NO: 511), DOM7r-28 (SEQ ID NO: 512), DOM7r-29 (SEQ ID NO: 513), DOM7r-30 (SEQ ID NO: 514), DOM7r-31 (SEQ ID NO: 515), DOM7r-32 (SEQ ID NO: 516), DOM7r-33 (SEQ ID NO: 517)

(для описания этих последовательностей см. WO 2007080392, причем данные последовательности и их нуклеиново-кислотные аналоги включены в данное описание посредством ссылки и образуют часть описания настоящего текста; SEQ ID NO в этом абзаце аналогичны приведенным в WO 2007080392);

dAb8 (dAb10), dAb10, dAb36, dAb7r20 (DOM7r20), dAb7r21 (DOM7r21), dAb7r22 (DOM7r22), dAb7r23 (DOM7r23), dAb7r24 (DOM7r24), dAb7r25 (DOM7r25), dAb7r26 (DOM7r26), dAb7r27 (DOM7r27), dAb7r28 (DOM7r28), dAb7r29 (DOM7r29), dAb7r29 (DOM7r29), dAb7r31 (DOM7r31), dAb7r32 (DOM7r32), dAb7r33 (DOM7r33), dAb7r33 (DOM7r33), dAb7h22 (DOM7h22), dAb7h23 (DOM7h23), dAb7h24 (DOM7h24), dAb7h25 (DOM7h25), dAb7h26 (DOM7h26), dAb7h27 (DOM7h27), dAb7h30 (DOM7h30), dAb7h31 (DOM7h31), dAb2 (dAb 4,7,41), dAb4, dAb7, dAb11, dAb12 (dAb7m12), dAb13 (dAb 15), dAb15, dAb16 (dAb21, dAb7m16), dAb17, dAb18, dAb19, dAb21, dAb22, dAb23, dAb24, dAb25 (dAb26, dAb7m26), dAb27, dAb30 (dAb35), dAb31, dAb33, dAb34, dAb35, dAb38 (dAb54), dAb41, dAb46 (dAb 47, 52 и 56), dAb47, dAb52, dAb53, dAb54, dAb55, dAb56, dAb7m12, dAb7m16, dAb7m26, dAb7r1 (DOM 7r1), dAb7r3 (DOM7r3), dAb7r4 (DOM7r4), dAb7r5 (DOM7r5), dAb7r7 (DOM7r7), dAb7r8 (DOM7r8), dAb7r13 (DOM7r13), dAb7r14 (DOM7r14), dAb7r15 (DOM7r15), dAb7r16 (DOM7r16), dAb7r17 (DOM7r17), dAb7r18 (DOM7r18), dAb7r19 (DOM7r19), dAb7h1 (DOM7h1), dAb7h2 (DOM7h2), dAb7h6 (DOM7h6), dAb7h7 (DOM7h7), dAb7h8 (DOM7h8), dAb7h9 (DOM7h9), dAb7h10 (DOM7h10), dAb7h11 (DOM7h11), dAb7h12 (DOM7h12), dAb7h13 (DOM7h13), dAb7h14 (DOM7h14), dAb7p1 (DOM7p1) и dAb7p2 (DOM7p2)

(для описания этих последовательностей см. PCT/GB2008/000453, поданную 8 февраля 2008 г., причем данные последовательности и их нуклеиново-кислотные аналоги включены в данное описание посредством ссылки и образуют часть описания настоящего текста). Альтернативные названия показаны в круглых скобках после dAb, например dAb8 имеет альтернативное название dAb10, т.е. dAb8 (dAb10). Эти последовательности также приведены на фиг. 51a и b.

В некоторых воплощениях dAb связывается с сывороточным альбумином человека и содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 80%, или по меньшей мере

примерно 85%, или по меньшей мере примерно 90%, или по меньшей мере примерно 95%, или по меньшей мере примерно 96%, или по меньшей мере примерно 97%, или по меньшей мере примерно 98%, или по меньшей мере примерно 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью dAb, выбранного из группы, состоящей из

MSA-16, MSA-26, DOM7m-16 (SEQ ID NO: 473), DOM7m-12 (SEQ ID NO: 474), DOM7m-26 (SEQ ID NO: 475), DOM7r-1 (SEQ ID NO: 476), DOM7r-3 (SEQ ID NO: 477), DOM7r-4 (SEQ ID NO: 478), DOM7r-5 (SEQ ID NO: 479), DOM7r-7 (SEQ ID NO: 480), DOM7r-8 (SEQ ID NO: 481), DOM7h-2 (SEQ ID NO: 482), DOM7h-3 (SEQ ID NO: 483), DOM7h-4 (SEQ ID NO: 484), DOM7h-6 (SEQ ID NO: 485), DOM7h-1 (SEQ ID NO: 486), DOM7h-7 (SEQ ID NO: 487), DOM7h-22 (SEQ ID NO: 489), DOM7h-23 (SEQ ID NO: 490), DOM7h-24 (SEQ ID NO: 491), DOM7h-25 (SEQ ID NO: 492), DOM7h-26 (SEQ ID NO: 493), DOM7h-21 (SEQ ID NO: 494), DOM7h-27 (SEQ ID NO: 495), DOM7h-8 (SEQ ID NO: 496), DOM7r-13 (SEQ ID NO: 497), DOM7r-14 (SEQ ID NO: 498), DOM7r-15 (SEQ ID NO: 499), DOM7r-16 (SEQ ID NO: 500), DOM7r-17 (SEQ ID NO: 501), DOM7r-18 (SEQ ID NO: 502), DOM7r-19 (SEQ ID NO: 503), DOM7r-20 (SEQ ID NO: 504), DOM7r-21 (SEQ ID NO: 505), DOM7r-22 (SEQ ID NO: 506), DOM7r-23 (SEQ ID NO: 507), DOM7r-24 (SEQ ID NO: 508), DOM7r-25 (SEQ ID NO: 509), DOM7r-26 (SEQ ID NO: 510), DOM7r-27 (SEQ ID NO: 511), DOM7r-28 (SEQ ID NO: 512), DOM7r-29 (SEQ ID NO: 513), DOM7r-30 (SEQ ID NO: 514), DOM7r-31 (SEQ ID NO: 515), DOM7r-32 (SEQ ID NO: 516), DOM7r-33 (SEQ ID NO: 517) (SEQ ID NO в этом абзаце аналогичны приведенным в WO2007080392),

dAb8, dAb 10, dAb36, dAb7r20, dAb7r21, dAb7r22, dAb7r23, dAb7r24, dAb7r25, dAb7r26, dAb7r27, dAb7r28, dAb7r29, dAb7r30, dAb7r31, dAb7r32, dAb7r33, dAb7h21, dAb7h22, dAb7h23, Ab7h24, Ab7h25, Ab7h26, dAb7h27, dAb7h30, dAb7h31, dAb2, dAb4, dAb7, dAb11, dAb12, dAb13, dAb15, dAb16, dAb17, dAb18, dAb19, dAb21, dAb22, dAb23, dAb24, dAb25, dAb26, dAb27, dAb30, dAb31, dAb33, dAb34, dAb35, dAb38, dAb41, dAb46, dAb47, dAb52, dAb53, dAb54, dAb55, dAb56, dAb7m12, dAb7m16, dAb7m26, dAb7r1, dAb7r3, dAb7r4, dAb7r5, dAb7r7, dAb7r8, dAb7r13, dAb7r14, dAb7r15, dAb7r16, dAb7r17, dAb7r18, dAb7r19, dAb7h1, dAb7h2, dAb7h6, dAb7h7, dAb7h8, dAb7h9, dAb7h10, dAb7h11, dAb7h12, dAb7h13, dAb7h14, dAb7p1 и dAb7p2.

Например, dAb, которое связывается с сывороточным альбумином человека, может содержать аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 90%, или по меньшей мере примерно 95%, или по меньшей мере примерно 96%, или по меньшей мере примерно 97%, или по меньшей мере примерно 98%, или по меньшей мере примерно 99% идентичности аминокислотной последовательности с

DOM7h-2 (SEQ ID NO:482), DOM7h-3 (SEQ ID NO:483), DOM7h-4 (SEQ ID NO:484), DOM7h-6 (SEQ ID NO:485), DOM7h-1 (SEQ ID NO:486), DOM7h-7 (SEQ ID NO:487), DOM7h-8 (SEQ ID NO:496), DOM7r-13 (SEQ ID NO:497), DOM7r-14 (SEQ ID NO:498), DOM7h-22 (SEQ ID NO:489), DOM7h-23 (SEQ ID NO:490), DOM7h-24 (SEQ ID NO:491), DOM7h-25 (SEQ ID NO:492), DOM7h-26 (SEQ ID NO:493), DOM7h-21 (SEQ ID NO:494), DOM7h-27 (SEQ ID NO:495) (SEQ ID NO в этом абзаце аналогичны приведенным в WO2007080392),

dAb8, dAb 10, dAb36, dAb7h21, dAb7h22, dAb7h23, Ab7h24, Ab7h25, Ab7h26, dAb7h27, dAb7h30, dAb7h31, dAb2, dAb4, dAb7, dAb11, dAb12, dAb13, dAb15, dAb16, dAb17, dAb18, dAb19, dAb21, dAb22, dAb23, dAb24, dAb25, dAb26, dAb27, dAb30, dAb31, dAb33, dAb34, dAb35, dAb38, dAb41, dAb46, dAb47, dAb52, dAb53, dAb54, dAb55, dAb56, dAb7h1, dAb7h2, dAb7h6, dAb7h7, dAb7h8, dAb7h9, dAb7h10, dAb7h11, dAb7h12, dAb7h13 и dAb7h14.

В некоторых воплощениях dAb связывается с сывороточным альбумином человека и содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 80%, или по меньшей мере

примерно 85%, или по меньшей мере примерно 90%, или по меньшей мере примерно 95%, или по меньшей мере примерно 96%, или по меньшей мере примерно 97%, или по меньшей мере примерно 98%, или по меньшей мере примерно 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью dAb, выбранного из группы, состоящей из

DOM7h-2 (SEQ ID NO:482), DOM7h-6 (SEQ ID NO:485), DOM7h-1 (SEQ ID NO:486), DOM7h-7 (SEQ ID NO:487), DOM7h-8 (SEQ ID NO:496), DOM7h-22 (SEQ ID NO:489), DOM7h-23 (SEQ ID NO:490), DOM7h-24 (SEQ ID NO:491), DOM7h-25 (SEQ ID NO:492), DOM7h-26 (SEQ ID NO:493), DOM7h-21 (SEQ ID NO:494), DOM7h-27 (SEQ ID NO:495) (SEQ ID NO в этом абзаце аналогичны приведенным в WO2007080392),

dAb7h21, dAb7h22, dAb7h23, Ab7h24, Ab7h25, Ab7h26, dAb7h27, dAb7h30, dAb7h31, dAb2, dAb4, dAb7, dAb38, dAb41, dAb7h1, dAb7h2, dAb7h6, dAb7h7, dAb7h8, dAb7h9, dAb7h10, dAb7h11, dAb7h12, dAb7h13 и dAb7h14.

В более конкретных воплощениях dAb представляет собой V_k -область dAb, которая связывается с сывороточным альбумином человека и имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из

DOM7h-2 (SEQ ID NO:482), DOM7h-6 (SEQ ID NO:485), DOM7h-1 (SEQ ID NO:486), DOM7h-7 (SEQ ID NO:487), DOM7h-8 (SEQ ID NO:496) (SEQ ID NO в этом абзаце аналогичны приведенным в WO2007080392),

dAb2, dAb4, dAb7, dAb38, dAb41, dAb54, dAb7h1, dAb7h2, dAb7h6, dAb7h7, dAb7h8, dAb7h9, dAb7h10, dAb7h11, dAb7h12, dAb7h13 и dAb7h14.

В более конкретных воплощениях dAb представляет собой V_H -область dAb, которая связывается с сывороточным альбумином человека и имеет аминокислотную последовательность, выбранную из dAb7h30 и dAb7h31.

В более конкретных воплощениях dAb представляет собой dAb7h11 или dAb7h14.

В других воплощениях dAb, лиганд или антагонист связывается с сывороточным альбумином человека и содержит один, два или три CDR (гипервариабельных участка) любой из перечисленных выше аминокислотных последовательностей, например один, два или три CDR из dAb7h11 или dAb7h14.

Подходящие верблюжьи (Camelid) V_{HH} , которые связываются с сывороточным альбумином, включают таковые, описанные в WO 2004/041862 (Ablynx N.V.) и в WO 2007080392 (причем последовательности V_{HH} и их нуклеиново-кислотные аналоги включены в данное описание посредством ссылки и образуют часть описания настоящего текста), такие как последовательность A (SEQ ID NO:518), последовательность B (SEQ ID NO:519), последовательность C (SEQ ID NO:520), последовательность D (SEQ ID NO:521), последовательность E (SEQ ID NO:522), последовательность F (SEQ ID NO:523), последовательность G (SEQ ID NO:524), последовательность H (SEQ ID NO:525), последовательность I (SEQ ID NO:526), последовательность J (SEQ ID NO:527), последовательность K (SEQ ID NO:528), последовательность L (SEQ ID NO:529), последовательность M (SEQ ID NO:530), последовательность N (SEQ ID NO:531), последовательность O (SEQ ID NO:532), последовательность P (SEQ ID NO:533), последовательность Q (SEQ ID NO:534), причем номера этих последовательностей соответствуют номерам, приведенным в WO 2007080392 или WO 2004/041862 (Ablynx N.V.). В некоторых воплощениях верблюжий (Camelid) V_{HH} связывается с сывороточным альбумином человека и содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 80%, или по меньшей мере примерно 85%, или по меньшей мере примерно 90%, или по меньшей мере примерно 95%, или по меньшей мере примерно 96%, или по меньшей мере примерно 97%, или по меньшей мере примерно 98%, или по меньшей мере примерно 99% идентичности аминокислотной последовательности с последовательностью ALB1, описанной в WO 2007080392 или любой из SEQ ID NO:518-534, причем номера этих последовательностей соответствуют номерам, приведенным в WO 2007080392 или WO 2004/041862.

В некоторых воплощениях лиганд или антагонист содержит dAb против сывороточного альбумина, которое конкурирует с любым dAb против сывороточного альбумина, приведенным в данном изобретении, за связывание с сывороточным альбумином (например, сывороточным альбумином человека).

В альтернативном воплощении антагонист или лиганд содержит связывающую группировку, специфичную к целевому антигену (например, TNFR1 человека), которая содержит неиммуноглобулиновые последовательности, как описано в родственной заявке PCT/GB2008/000453, поданной 8 февраля 2008 г.; описание этих связывающих группировок, способы их получения и селекции (например, из разнообразных библиотек) и их последовательности включены в данное описание посредством ссылки как часть описания настоящего текста).

Конъюгирование с группировкой, удлиняющей период полувыведения (например, альбумином)

В одном из воплощений (одна или более чем одна) группировку, удлиняющую период полувыведения (например, альбумин, трансферрин и их фрагменты и аналоги), конъюгируют или объединяют со связывающимся с TNFR1 полипептидом, dAb или антагонистом по изобретению. Примеры альбумина, фрагментов альбумина или вариантов альбумина, подходящих для применения в связывающемся с TNFR1 формате, описаны в WO 2005077042, описание которой включено в данное описание посредством ссылки и образует часть описания настоящего текста. В частности, в настоящем изобретении могут быть использованы следующие далее альбумин, фрагменты альбумина или варианты альбумина:

SEQ ID NO:1 (как описано в WO 2005077042, при этом данная последовательность непосредственно включена в настоящее описание посредством ссылки);

фрагмент или вариант альбумина, содержащий аминокислоты 1-387 из SEQ ID NO:1 в WO 2005077042 или состоящий из них;

альбумин или его фрагмент или вариант, содержащий аминокислотную последовательность, выbranную из группы, состоящей из: (a) аминокислот 54-61 из SEQ ID NO:1 в WO 2005077042; (b) аминокислоты 76-89 из SEQ ID NO:1 в WO 2005077042; (c) аминокислоты 92-100 из SEQ ID NO:1 в WO 2005077042; (d) аминокислоты 170-176 из SEQ ID NO:1 в WO 2005077042; (e) аминокислоты 247-252 из SEQ ID NO:1 в WO 2005077042; (f) аминокислоты 266-277 из SEQ ID NO:1 в WO 2005077042; (g) аминокислоты 280-288 из SEQ ID NO:1 в WO 2005077042; (h) аминокислоты 362-368 из SEQ ID NO:1 в WO 2005077042; (i) аминокислоты 439-447 из SEQ ID NO:1 в WO 2005077042 (j) аминокислоты 462-475 из SEQ ID NO:1 в WO 2005077042; (k) аминокислоты 478-486 из SEQ ID NO:1 в WO 2005077042 и (l) аминокислоты 560-566 из SEQ ID NO:1 в WO 2005077042.

Следующие примеры альбумина, фрагментов и аналогов, подходящих для применения в связывающемся с целевым антигеном формате, описаны в WO 03076567, описание которой включено в данное описание посредством ссылки и которое образует часть описания настоящего текста. В частности, в настоящем изобретении могут быть использованы следующие далее альбумин, фрагменты или варианты:

сывороточный альбумин человека, как описано в WO 03076567, например, на фиг. 3 (причем информация об этой последовательности непосредственно включена в настоящее описание посредством ссылки);

сывороточный альбумин человека (HA), состоящий из единичной негликозилированной полипептидной цепи из 585 аминокислот с молекулярной массой 66500 (см. Meloun, et al., FEBS Letters 58: 136 (1975); Behrens, et al., Fed. Proc. 34: 591 (1975); Lawn, et al., Nucleic Acids Research 9: 6102-6114 (1981); Minghetti, et al., J. Biol. Chem. 261: 6747 (1986));

полиморфный вариант или аналог либо фрагмент альбумина, как описано в Weitkamp, et al., Ann. Hum. Genet. 37: 219 (1973);

фрагмент или вариант альбумина, как описано в EP 322094, например HA(1-373), HA(1-388), HA(1-389), HA(1-369) и HA(1-419) и фрагменты среди 1-369 и 1-419;

фрагмент или вариант альбумина, как описано в EP 399666, например, HA(1-177) и HA(1-200) и фрагменты среди HA(1-X), где X равно любому числу от 178 до 199.

Когда (одну или более чем одну) удлиняющую период полувыведения группировку (например, альбумин, трансферрин и их фрагменты и аналоги) используют для представления в формате связывающихся с TNFR1 полипептидов, dAb и антагонистов по изобретению, они могут быть конъюгированы с использованием любого подходящего способа, такого как непосредственное слияние со связывающейся с TNFR1 группировкой (например, анти-TNFR1 dAb), например с использованием единой нуклеотидной конструкции, кодирующей слитый белок, при этом данный слитый белок кодируется как единая полипептидная цепь с удлиняющей период полувыведения группировкой, расположенной на N- или C-конце по отношению к связывающейся с TNFR1 группировке. Альтернативно, конъюгирование может быть осуществлено с использованием пептидного линкера между группировками, например пептидного линкера, который описан в WO 03076567 или WO 2004003019 (при этом описания линкера включены посредством ссылки в настоящее описание для представления примеров применения в настоящем изобретении). Обычно полипептид, увеличивающий период полувыведения из сыворотки *in vivo*, представляет собой полипептид, существующий в природе *in vivo* и который устойчив к расщеплению либо удалению посредством эндогенных механизмов, посредством которых нежелательное вещество выводится из организма (например, человека). Например, полипептид, увеличивающий период полувыведения из сыворотки *in vivo*, может быть выбран из белков внеклеточного матрикса, белков, обнаруживаемых в крови, белков, обнаруживаемых в гематоэнцефалическом барьере или в нервной ткани, белков, локализованных в почках, печени, легких, сердце, коже или костях, стресс-белков, белков, характерных для конкретного заболевания, или белков, вовлеченных в Fc-транспорт.

В воплощениях изобретения, описанных по всему этому описанию, вместо использования анти-TNFR1 "dAb" в антагонисте или лиганде по изобретению, предполагается, что специалист средней квалификации может использовать полипептид или домен, содержащий один или более либо все 3 CDR из dAb по изобретению, которое связывается с TNFR1 (например, CDR, привитые на подходящий белковый остов или каркас, например аффитело, остов SpA, домен рецепторов LDL (липопротеины низкой плотно-

сти), класс А, или домен EGF). Соответственно, данное описание в целом следует истолковывать в смысле предложения антагонистов, в которых такие домены используются вместо dAb. В этой связи см. РСТ/GB2008/000453, поданную 8 февраля 2008 г., описание которой включено посредством ссылки.

Таким образом, в одном из воплощений антагонист по изобретению содержит иммуноглобулиновый единичный переменный домен или доменное антитело (dAb), обладающий(ее) специфичностью связывания с TNFR1, или определяющие комплементарность участка такого dAb в подходящем формате. Антагонистом может быть полипептид, состоящий из такого dAb или состоящий по существу из такого dAb. Антагонистом может быть полипептид, содержащий dAb (или CDR из dAb) в подходящем формате, таком как формат на основе антитела (например, IgG-подобный формат, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂), или лиганд с двойной специфичностью, содержащий dAb, которое связывается с TNFR1, и второе dAb, которое связывается с другим целевым белком, антигеном или эпитопом (например, сывороточным альбумином).

Полипептиды, dAb и антагонисты по изобретению могут быть представлены в различных подходящих форматах на основе антител, которые известны в данной области техники, таких как IgG-подобные форматы, химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела, одноцепочечные антитела, биспецифические антитела, тяжелые цепи антител, легкие цепи антител, гомодимеры и гетеродимеры тяжелых цепей и/или легких цепей антител, антигенсвязывающие фрагменты любого из перечисленного выше (например, Fv-фрагмент (например, одноцепочечный Fv (scFv), связанный дисульфидной связью Fv), Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент), единичный переменный домен (например, V_H, V_L), dAb и модифицированные версии любого из перечисленного выше (например, модифицированные посредством ковалентного присоединения полиалкиленгликоля (например, полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, полибутиленгликоля) или другого подходящего полимера).

В некоторых воплощениях изобретения предложен лиганд (например, анти-TNFR1 антагонист), представленный в IgG-подобном формате. Такие форматы имеют традиционную четырехцепочечную структуру молекулы IgG (две тяжелые цепи и две легкие цепи), в которых одна или более чем одна из переменных областей (V_H и/или V_L) заменена на dAb по изобретению. В одном из воплощений каждая из переменных областей (2 V_H-области и 2 V_L-области) заменена на dAb или единичный переменный домен, по меньшей мере один из которых представляет собой анти-TNFR1 dAb по изобретению. dAb или единичный(е) переменный домен(ы), которые включены в IgG-подобный формат, могут иметь одну и ту же специфичность или разные специфичности. В некоторых воплощениях IgG-подобный формат является тетравалентным и может иметь одну (только против TNFR1), две (например, против TNFR1 и против SA), три или четыре специфичности. Например, IgG-подобный формат может быть моноспецифическим и содержать 4 dAb, которые имеют одинаковую специфичность; биспецифическим и содержать 3 dAb, которые имеют одинаковую специфичность, и другое dAb, имеющее иную специфичность; биспецифическим и содержать два dAb, которые имеют одинаковую специфичность, и два dAb, которые имеют общую, но другую специфичность триспецифическим и содержать первое и второе dAb, которые имеют одинаковую специфичность, третье dAb с другой специфичностью, а четвертое dAb со специфичностью, отличающейся от первого, второго и третьего dAb; или тетраспецифическим и содержать четыре dAb, каждое из которых имеет разную специфичность. Можно получить антигенсвязывающие фрагменты IgG-подобных форматов (например, Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, scFv). В одном из воплощений IgG-подобные форматы или их антигенсвязывающие фрагменты не связываются перекрестно с TNFR1, например, данный формат может быть моновалентным в отношении TNFR1. Если желательно иметь функцию активации системы комплемента и/или функцию антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), то лиганд может быть представлен в IgG1-подобном формате. При желании, IgG-подобный формат может содержать мутированную константную область (вариант константной области тяжелой цепи IgG) с целью минимизации связывания с Fc-рецепторами и/или способности фиксировать комплемент (см., например, Winter и др., GB 2209757 B; Morrison и др., WO 89/07142; Morgan и др., WO 94/29351, 22 декабря 1994 г.).

Лиганды по изобретению (полипептиды, dAb и антагонисты) могут быть представлены в формате в виде слитого белка, содержащего первый иммуноглобулиновый единичный переменный домен, который слит непосредственно со вторым иммуноглобулиновым единичным переменным доменом. При желании, то такой формат дополнительно может содержать группировку, удлиняющую период полувыведения. Например, лиганд может содержать первый иммуноглобулиновый единичный переменный домен, который слит непосредственно со вторым иммуноглобулиновым единичным переменным доменом, слитым непосредственно с иммуноглобулиновым единичным переменным доменом, который связывается с сывороточным альбумином.

Как правило, ориентация полипептидных доменов, имеющих сайт связывания со специфичностью связывания с мишенью, и то, содержит ли данный лиганд линкер, является предметом выбора при конструировании. Однако некоторые ориентации, с линкерами или без них, могут обеспечивать более удовлетворительные характеристики связывания по сравнению с другими ориентациями. Все ориентации (например, dAb1-линкер-dAb2; dAb2-линкер-dAb1) охватываются данным изобретением и лиганды, которые содержат ориентацию, обеспечивающую желаемые характеристики связывания, могут быть легко идентифицированы посредством скрининга.

Полипептиды и dAb по изобретению, включая мономеры, димеры и тримеры dAb, могут быть присоединены к Fc-области антитела, содержащей один или оба домена C_H2 и C_H3 и возможно шарнирную область. Например, для получения таких полипептидов могут быть использованы векторы, кодирующие лиганды, соединенные в виде единой нуклеотидной последовательности с Fc-областью.

В изобретении также предложены димеры, тримеры и полимеры вышеупомянутых мономеров dAb.

Кодон-оптимизированные последовательности

Как описано выше, согласно воплощениям изобретения предложены кодон-оптимизированные нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептиды и переменные домены по изобретению. Как показано в следующей иллюстрации, могут быть получены кодон-оптимизированные последовательности с примерно 70%-ной идентичностью, которые кодируют один и тот же переменный домен (в этом случае аминокислотная последовательность переменного домена идентична DOM1h-131-206). В этом случае последовательности были оптимизированы для экспрессии в *Pichia pastoris* (кодон-оптимизированные последовательности 1-3) или *E.coli* (кодон-оптимизированные последовательности 4 и 5).

Авторы изобретения осуществили расчеты с учетом вырожденности генетического кода и максимизировали количество нуклеотидных изменений в каждом вырожденном кодоне, кодируемом нуклеотидной последовательностью DOM1h-131-206, как показано на фиг. 19, и рассчитали теоретическую нуклеотидную последовательность, которая все еще будет кодировать переменный домен, идентичный DOM1h-131-206. Этот расчет показал, что теоретическая последовательность будет иметь только 57%-ную идентичность с нуклеотидной последовательностью DOM1h-131-206, как показано на фиг. 19.

Кодон-оптимизированная последовательность 1.

Последовательность ДНК

```
gaggttcaattggtggaatccgggtggtggattggttcaacctggtggttctttgagattgtcctgtgctgcttcc
ggtttactttcgctcacgagactatggtttgggttagacaggctccaggtaaaggattggaatgggtttcccac
attccaccagatggtcaagatccattctacgctgactccggttaaggaagattcactatctccagagacaactcc
aagaacactttgtacttgacagatgaactccttgagagctgaggatactgctggttaccactgtgctttgttgcca
aagagaggaccttggttgattactggggacaggaactttggttactgtttcttcc
```

Соответствующая а.к. (аминокислотная) последовательность

```
evqllesggglvqpggsrlrlscaasgftfahetmvwvvrqapggkglewvshipdggdpfyadsvkgrftisrdns
kntlylqmnsrlraedtavyhcallpkrpwwfdywggtlvtvss
```

74,1% идентичности нуклеотидной последовательности с последовательностью WT (дикого типа).

		1	50
Dom1h-131-206;	(1)	GAGGTTCAATGCTTGGNAATCCGGTGGTGGATTCGCTTCAACCTGGTGGTTC	
кодон-оптимизированная			
Dom1h-131-206 WT	(1)	GAGGTCGAGCTGTTGGAGCTTGGGGGAGGCCTGGTACAGCCTGGGGGGCTG	
Консенсусная	(1)	GAGGT CA TGTTGA TC GG GG GG TTGGT CA CCTGG GG TC	
		51	100
Dom1h-131-206;	(51)	TTEGAGATTCCTCCCTGGCTGGCTTCCGGTTTTACTTTCCGCTCACGAGACTA	
кодон-оптимизированная			
Dom1h-131-206 WT	(51)	CCTGCCCTCTCCCTGTGAGCCTCCGGATTCACTTTGGGATGAGACGA	
Консенсусная	(51)	TG G T TCCTGTGC GC TCCGG TT AC TT GC CA GAGAC A	
		101	150
Dom1h-131-206;	(101)	TGGTTCGGCTTAGACAGGCTCCAGGTAAGGATTGGAATGGGTTTCCAC	
кодон-оптимизированная			
Dom1h-131-206 WT	(101)	TGGTCTGGCTCCGCCAGGCCAGGCAAGGCTCTACAGTGGCTCTCAT	
Консенсусная	(101)	TGGT TGGGT G CAGGC CCAGG AA GG T GA TGGGT TC CA	
		151	200
Dom1h-131-206;	(151)	ATTCCACCAGATGGTCAAGATCCATTCTACGCTGACTCCGTTAAGGGAAG	
кодон-оптимизированная			
Dom1h-131-206 WT	(151)	ATTCCCGGGGTFGGGCAAGATCCCTTCTACGGCAGACTCCGTTAAGGSCCG	
Консенсусная	(151)	ATTCC CC GATGGTCA GATCC TTCTACGC GACTCCGT AAGGG G	
		201	250

Dom1h-131-206; (201) ATTCACTATCTCGAGAGACAACCTCCAAGAACAACCTTGTACTTGCAGATGA
 кодон-оптимизированная
 Dom1h-131-206 WT (201) GTTCACCATCTCCGCGACAATTCGAAGAACAGCGTATATCTGCAAAATGA
 Консенсусная (201) TTCAC ATCTCC G GACAA TCCAAGAACAC T TA TGCA ATGA
 251 300

Dom1h-131-206; (251) ACTCCTTGAGAGCTGAGGATACTGCTGTTTACCACAGTGCTTGTGGCA
 кодон-оптимизированная
 Dom1h-131-206 WT (251) ACAGCCTGCCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATCACTGTGGCGCTGCTTCGT
 Консенсусная (251) AC C TG G GC GAGGA AC GC GT TA CACTGTGC TG T CC
 301 350

Dom1h-131-206; (301) AAGAGAGGACCTTGGTTTGATTACTGGGGACAGGGAACTTGGTTACTGT
 кодон-оптимизированная
 Dom1h-131-206 WT (301) AAGAGGGGGCCTTGGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAAACCTTGGTCAACGT
 Консенсусная (301) AAGAG GG CCTGGTTTGA TACTGGGG CAGGGAAC TGGT AC GT
 351 363

Dom1h-131-206; (351) TTCTTCCTAATGA
 кодон-оптимизированная
 Dom1h-131-206 WT (351) CTCGAGC-----
 Консенсусная (351) TC C

Кодон-оптимизированная последовательность 2.

Последовательность ДНК

Gagaaaagagaggttcaattgcttgaatctggaggaggtttgggtccagccaggaggtcccttcgactaagttgt
 gctgccagtggtttacgcttctcatgaaactatggtatgggtccgacaggcacctggtaaaggctcttgaatgg
 gtttcacatatccctccagacgggtcaagaccattttacgctgattccgtgaaaggcagatttacaatttcacga
 gataattctaaaaacaccttgacttcaaatgaactcattgagagctgaggacactgcagttatcactgcgct
 ttactaccaaaaacgtggaccttgggttgattattggggccaaggtagcttagtgactgtagttct

Соответствующая а.к. последовательность

ekrevqllesggglvqpggsrlrlscaasgftfahetmvwvrqapgkglewvshippdgdqpfyadsvkgrftisr
 dnskntlylqmnsrlraedtavyhcallpkrpwwfdywgggtlvtvss

71,1% идентичности нуклеотидной последовательности с последовательностью WT.

		1		50
Dom1h-131-206 WT	(1)	-----GAGCTGCAGCTCTTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTACAGCC		
Только Pichia 206 MFa dAb	(1)	GAGAAAAGACAGGTTCAATTCCTTGAATCTGGAGCAGCTTGGTCCAGCC		
Консенсусная	(1)	GAGGT CA TG T GA TCTGG GGAGG TTGGT CAGCC		
		51		100
Dom1h-131-206 WT	(42)	TGGGGGTCCCTTGCCTCTCTCCTGTGCAGCGTCCGGATTCACCTTTGGG		
Только Pichia 206 MFa dAb	(51)	AGGAGGCTCCCTTCGACTAAGTTGTCTGCAGTGGTTTACGTTTGGCTC		
Консенсусная	(51)	GG GGGTCCCT CG CT TGTGC GCC GG TT AC TTTGC C		
		101		150
Dom1h-131-206 WT	(92)	ATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCACCAAGGGAAGGGTCTAGAGTGG		
Только Pichia 206 MFa dAb	(101)	ATGAAACTATGGTATGGTCCGACAGGCACCTGGTAAAGTCTTGAATGG		
Консенсусная	(101)	ATGA AC ATGGT TGGTCCG CAGGCACC GG AA GGTCT GA TGG		
		151		200
Dom1h-131-206 WT	(142)	GTCTACATATTCCTCCGGATGGTCAAGTCCCTTCTACBCAGACTCCGT		
Только Pichia 206 MFa dAb	(151)	GTTCACATATCCGTCCAGACGGTCCAGACCCATTTTACGGTGTATCCGT		
Консенсусная	(151)	GT TCACATAT CC CC GA GGTCA GA CC TT TACGC GA TCCGT		
		201		250
Dom1h-131-206 WT	(192)	GAAAGGCGGTTCCACCATCTCCCGCACAATTCGAAGAACAGCGTATATC		
Только Pichia 206 MFa dAb	(201)	GAAAGCCAGATTTACAATTTCCAGGATATAATCTAAAACACCTTGTACT		
Консенсусная	(201)	GAA GGC G TT AC AT TC CG GA AATTC AA AACAC T TA		
		251		300
Dom1h-131-206 WT	(242)	TGCAATGAACAGCCTCCGTGCCAGGACACAGCGGTATATCACTGTGGC		
Только Pichia 206 MFa dAb	(251)	TACAAATGAACATTCAGAGCTGAGGACACTGGCAGTTTATCACTCCGT		
Консенсусная	(251)	T CAAATGAAC TG G GC GAGGACAC GC GT TATCACTG GC		
		301		350
Dom1h-131-206 WT	(292)	CTGCTCCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAAACCT		
Только Pichia MFa 206 dAb	(301)	TTACTACCAAAAACGTGGACCTTGGTTTGATTATTGGGGCAAGGTAGCT		
Консенсусная	(301)	T CT CC AA G GG CCTGGTTTGA TA TGGGG CA GG AC T		
		351		367
Dom1h-131-206 WT	(342)	GGTCAACCTCTCAGGC-		
Только Pichia MFa 206 dAb	(351)	AGTCACTGT-TAGTTCT		
Консенсусная	(351)	GT AC GT T G C		

Кодон-оптимизированная последовательность 3.

Последовательность ДНК

gaagtgcagcttcttgaagtggaggagctagtgacagccaggggatctttaagattatcatgcgctgccagt
 ggatttacttttctcagagacgatgggtctgggtgagacaagctcctggaaaagggttagagtggttctcag
 atccacctgatggtcaagatccttctcagcagattccgtcaaggaagatttactatctccagagataatagt
 aaaaacactttgtacctacagatgaactcacttagagccgaagataaccgctgtgtaccactgcgcttgttgcca
 aagagaggtccttgggtcgattactggggctcagggtactctggttacagttctcatct

Соответствующая а.к. последовательность

evqllesggglvqpggsrlrlscaasgftfahetmvwvrqapgkglewvshippdgdqpfyadsvkgrftisrdns
 kntlylqmnsrlraedtavyhcallpkrpwwfdywgggtlvtvss

72,6% идентичности нуклеотидной последовательности с последовательностью WT.

		1	50
Dom1h-131-206 WT	(1)	GAGGTGCAGCTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGGCTGGGGGGTC	
Только Pichia Pre 206 dAb	(1)	GAAGTGCAGCTTCTTGAAGTGGTGGAGGGCTAGTGCAGCCAGGGGATC	
Консенсусная	(1)	GA GTGCAGCT T GA TGG GGAGG T GT CAGCC GGGGG TC	
		51	100
Dom1h-131-206 WT	(51)	CCTGGCTCTCTCCTGTGCACCTCCGGATTCCACCTTTGGGCATGAGACGA	
Только Pichia Pre 206 dAb	(51)	TTTAAGATATCATCCGCTGCCAGTGCATTACTTTTGGTCAACAGACGA	
Консенсусная	(51)	T G T TC TG GC GCC GGATT AC TTTGC CA GAGACGA	
		101	150
Dom1h-131-206 WT	(101)	TGGTGTGGCTCCGCCAGGCACCAGGGAGGGTCTAGAGTGGGGTCTCAGAT	
Только Pichia Pre 206 dAb	(101)	TGGTGTGGCTGAGACAGCTCCGTGGAAAGGTTTAGAGTGGGTTCCTCAC	
Консенсусная	(101)	TGGT TGGGT G CA GC CC GG AA GGT TAGAGTGGGT TC CA	
		151	200
Dom1h-131-206 WT	(151)	ATTCCCCCGGATGGTCAAGATCCCTTCTACGGCAGACTCCGTGAAGGGCCG	
Только Pichia Pre 206 dAb	(151)	ATTCCACCTGATGCTCAAGATCCCTTCTACGCAGATCCGTCAAGAGGAG	
Консенсусная	(151)	ATTCC CC GATGGTCA GATCC TTCTACGCAGA TCCGT AA GG G	
		201	250
Dom1h-131-206 WT	(201)	GTTCAACATCTCCCGGACAAATCCAGAAAGAGGCTATATCTGCNAATGA	
Только Pichia Pre 206 dAb	(201)	ATTTACTATTTCCAGAGATAATAGTAAAGAGACTTGGACCTACAGATGA	
Консенсусная	(201)	TT AC ATCTCC G GA AAT AA AACAC T TA CT CA ATGA	
		251	300
Dom1h-131-206 WT	(251)	ACAGCCTGGCGTCCGAGGACACAGCCGATATACACTGTGGCGCTTCCT	
Только Pichia Pre 206 dAb	(251)	ACTCACTTAGAGCGGAAGATACCGCTCTGTACCACCTCCGCTTGTGCCA	
Консенсусная	(251)	AC CT G GCGA GA AC GC GT TA CACTG GC TG T CC	
		301	350
Dom1h-131-206 WT	(301)	AAGAGGGGGCCTTGGTTGACTACTGGGGTCAGGGAAACCGTGGTCAACGT	
Только Pichia Pre 206 dAb	(301)	AAGAGAGTCCCTTGGTCCGATTAAGTGGGGTCAGGGTACTGTGTTACAGT	
Консенсусная	(301)	AAGAG GG CCTTGGTT GA TACTGGGGTCAGGG AC CTGGT AC GT	
		351	
Dom1h-131-206 WT	(351)	CTCGAGC-	
Только Pichia Pre 206 dAb	(351)	CTC-ATCT	
Консенсусная	(351)	CTC A C	

Кодон-оптимизированная последовательность 4.

Последовательность ДНК

gaagtacaactgctggagagcggtggcgccctgggtcaaccgggtgggtccctgcgccctgtcctgtgcgggcatct
 ggtttcaccttcgcacacgaaccatggtggtggttcgccaagctccgggcaaggcctggaatggtaagccac
 attcctccagatggccaggaccattctatgcggtatccggttaagggtcgcttaccatttctcgtgataactcc
 aaaaacacctgtacctgcagatgaactccctgcgccgaggatactgcggtgtaccattgtgcgctgctgct
 aacgtggcccgtggttcgattactgggtcagggtactctggtcaccgtaagcagc

Соответствующая а.к. последовательность

evqllesggglvqpggslrlscaasgftfahetmwwvrqapgkglewvshipdggdpfyadsvkgrftisrdns
 kntllylqmnsraedtavyhcallpkrqpwfdywgqgtlvtvss

76,5% идентичности нуклеотидной последовательности с последовательностью WT.

		1	50
Dom1h-131-206 WT	(1)	GAGGTGCAGCTGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTC	
Только E.coli Sec 206 dAb	(1)	GAAGTACACTGTCTGGAGAGCGGTGGCGCCCTGGTTCACCGGGTGGTTG	
Консенсусная	(1)	GA GT CA CTG TGGAG GG GG GGC TGGT CA CC GG GG TC	
		51	100
Dom1h-131-206 WT	(51)	CCTGGCTCTCTCCTGTGCACCTCCGGATTCCACCTTTGGGCATGAGACGA	
Только E.coli Sec 206 dAb	(51)	CCTGGCCTGTCTGTGGGCACTGGTTTCACCTTCGCACACGAAACCA	
Консенсусная	(51)	CCTGGC CT TCCTGTGC GC TC GG TTCACCTT GC CA GA AC A	
		101	150
Dom1h-131-206 WT	(101)	TGGTGTGGCTCCGCCAGGCACCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAT	
Только E.coli Sec 206 dAb	(101)	TGGTGTGGGTTCGCCAAGCTCCGGGCAAGGCCGGAATGGGTAAGCCAC	
Консенсусная	(101)	TGGTGTGGGT CGCCA GC CC GG AA GG CT GA TGGGT CA	
		151	200
Dom1h-131-206 WT	(151)	ATTCCCCCGGATGGTCAAGATCCCTTCTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCG	
Только E.coli Sec 206 dAb	(151)	ATTCCCTCAGATGGCCAGGACCCATTCTATGGGATTCGGTTAAGGGTCCG	
Консенсусная	(151)	ATTCC CC GATGG CAGGA CC TTCTA GC GA TCCGT AAGGG CG	
		201	250
Dom1h-131-206 WT	(201)	GTTCAACATCTCCCGGACAAATCCAGAAACAGGCTATATCTGCNAATGA	
Только E.coli Sec 206 dAb	(201)	CTTTACCATTGTCTGTGATAACTCCAAAACACCCCTGTACCTGCAGATGA	
Консенсусная	(201)	TT ACCAT TC CG GA AA TCCAA AACAC CT TA CTGCA ATGA	
		251	300
Dom1h-131-206 WT	(251)	ACAGCCTGGCGTCCGAGGACACAGCCGATATACACTGTGGCGTGGTTCCT	
Только E.coli Sec 206 dAb	(251)	ACTCCCTGGCGCCGAGGATACTGGGTGTACCATTGTGGCGTGGTGGCT	
Консенсусная	(251)	AC CCTGGC GCCGAGGA AC GCGGT TA CA TGTGGCTGCT CCT	
		301	350
Dom1h-131-206 WT	(301)	AAGAGGGGGCCTTGGTTGACTACTGGGGTCAGGGAAACCGTGGTCAACGT	
Только E.coli Sec 206 dAb	(301)	AAACCTGCCCGTGGTTCGATTAAGTGGGGTCAGGGTACTGTGGTCAACGT	
Консенсусная	(301)	AA G GG CC TGGT GA TACTGGGGTCAGGG AC CTGGTCAACGT	
		351	
Dom1h-131-206 WT	(351)	CTCGAGC	
Только E.coli Sec 206 dAb	(351)	AAGCAGC	
Консенсусная	(351)	AGC	

Кодон-оптимизированная последовательность 5.

Последовательность ДНК

```
gaggttcaactgctggaatctggtggtggtctggtacaaccgggtggttccctgctgtgagctgtgcagcctct
ggtttcaccttcgctcatgagaccatggtttgggtacgccaggctcogggtaaggcctggagtgggtaagccat
atccctcctgatggtcaggaccggtctctatgctgattccgtcaaggccggtttaccatttctcgtgacaacagc
aaaaacactctgtacctgcaaatgaactccctgctgagcagaagacacggcggtttatcactgtgactgctgcca
aaacggcgcccttggttcgactactggggccagggtactctggtcactgtatcttct
```

Соответствующая а.к. последовательность

```
evqllesggglvqpggsrlriscasgftfahetmvwvrgapgkglewvshipdgdqdpfyadsvkgrftisrdns
kntlylqmnsrlraedtavyhcallpkrpwwfdywggtlvtvss
```

78,4% идентичности нуклеотидной последовательности с последовательностью WT.

		1	50
Dom1h-131-206 WT	(1)	GAGGTGCAGCTCTTCCAGTCTGGGGGAGGCTTCGTACAGCCCTGGGGGGTTC	
Только E.coli IC 206 dAb	(1)	GAGGTTCAACTGCTGGAATCTGGTGGTGGTCTGGTACAAACCGGTTGTTT	
Консенсусная	(1)	GAGGT CA CTG TGA TCTGG GG GG TGGTACA CC GG GG TC	100
		51	100
Dom1h-131-206 WT	(51)	CCTGCGTCTCTCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTGCGCATGAGACGA	
Только E.coli IC 206 dAb	(51)	CCTGCGTCTGAGCTGTGCAGCCTCTGGTTTCACCTTCGGTCAATGAGACCA	
Консенсусная	(51)	CCTGCGTCT CTGTGCAGCCTC GG TTCACCTT GC CATGAGAC A	101 150
		101	150
Dom1h-131-206 WT	(101)	TGGTGTGGGTCCGCCAGGCACCAGGGGAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACAT	
Только E. coli IC 206 dAb	(101)	TGGTGTGGGTACGCCAGGCTCCGGTAAAGGCCTGGAGTGGGTAAAGCCAT	
Консенсусная	(101)	TGGT TGGGT CGCCAGGC CC GG AA GG CT GAGTGGGT CAT	151 200
		151	200
Dom1h-131-206 WT	(151)	ATTCGCCGGATGGTCCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCG	
Только E.coli IC 206 dAb	(151)	ATCCCTCCTATGGTCCAGGACCCGTTCTATGTTGATTCGGTCAAGGCCG	
Консенсусная	(151)	AT CC CC GATGGTCCAGGA CC TTCTA GC GA TCCGT AA GGCCG	201 250
		201	250
Dom1h-131-206 WT	(201)	GTTCACCATCTCCCGCAGCAATTCCAAGAACACGGTATATCTGCAAAATGA	
Только E.coli IC 206 dAb	(201)	TTTTACCATTCTCTCTGACAAACAGCAAAAACACTCTGTACTCTGCAAAATGA	
Консенсусная	(201)	TT ACCAT TC CG GACAA CAA AACAC CT TA CTGCAAAATGA	251 300
		251	300
Dom1h-131-206 WT	(251)	ACAGCCTGCGTGGCCAGGACACACCGGTATATCACTGTGGCGTCTCCT	
Только E.coli IC 206 dAb	(251)	ACTCCCTGCGTGCAGAGAGACACCGCGTTTATCACTGTGGCACTGCTGCCA	
Консенсусная	(251)	AC CCTGCGTGC GA GACAC GCGGT TATCACTGTGC CTGCT CC	301 350
		301	350
Dom1h-131-206 WT	(301)	AAGAGGGGGCTTGGTGTGACTACTGGGGTCCAGGCAACCTGGTCCACCGT	
Только E.coli IC 206 dAb	(301)	AAACGCGCCCTTGGTGTGACTACTGGGGCCAGGTTACTCTGCTCACTGT	
Консенсусная	(301)	AA G GG CTTGGTT GACTACTGGGG CAGGG AC CTGGTCAAC GT	351
		351	
Dom1h-131-206 WT	(351)	CTCGAGC	
Только E.coli IC 206 dAb	(351)	ATCTTCT	
Консенсусная	(351)	TC	

Пояснение на примерах

Пример А.

Основная селекция и характеристика доменных антител к TNFR1 человека.

Доменные антитела получали из фаговых библиотек. И селекцию в растворе, и пэннинг в отношении пассивно адсорбированного TNFR1 человека осуществляли в соответствии с релевантными стандартными способами. TNFR1 человека приобретали в виде растворимого рекомбинантного белка либо в R&D Systems (№ по каталогу 636-R1-025/CF), либо в Peprotech (№ по каталогу 310-07) и использовали либо непосредственно (в случае пассивной селекции), либо после биотинилирования, используя реакцию сочетания через первичные амины с последующим качественным контролем его активности в биологическом анализе и анализе его MW (молекулярная масса) и степени биотинилирования посредством масс-спектрометрии. Обычно осуществляли 3 раунда селекции, используя уменьшающиеся уровни антигена в каждом последующем раунде.

Продукты селекции подвергали скринингу с использованием фагового ELISA на присутствие анти-TNFR1-связывающих клонов. ДНК из этих селектированных фагов выделяли и субклонировали в экспрессирующий вектор для экспрессии растворимых фрагментов dAb. Растворимые фрагменты dAb экспрессировали в 96-луночных планшетах и супернатанты использовали для скрининга на присутствие анти-TNFR1-связывающих dAb, используя либо непосредственное связывание в ELISA с детекцией анти-с-мус, либо BIAcore™ с использованием чипа BIAcore™ со стрептавидин/биотинилированным TNFR1, и ранжировали в соответствии со скоростями диссоциации.

Основные молекулы, описанные ниже, происходили из родительского dAb, названного DOM1h-131 (описанного в WO 2006038027). Эту молекулу селектировали из фаг-дисплейной библиотеки после 3 раундов селекции с использованием 60 нМ биотинилированного антигена. Покрытые стрептавидином или нейтравидином гранулы Dynabeads чередовали в качестве захватывающих реагентов в каждом раунде селекции для предупреждения селекции структур, связывающихся либо со стрептавидином, либо с нейтравидином. Эффективность основной молекулы DOM1h-131 на этой стадии находилась в низком микромолярном диапазоне, как определено в клеточном анализе на фибробластах MRC-5 с высвобождением IL-8. Кинетика связывания, определенная при помощи BIAcore™, обычно представляла скорости

быстрой ассоциации и быстрой диссоциации (fast-on/fast-off rates). Уровни экспрессии в *E. coli* этой основной молекулы DOM1h-131 в виде мономера с присоединенной к С-концу тус-меткой находились в диапазоне 8 мг/л.

Созревание аффинности основных молекул

DOM1h-131 подвергали созреванию аффинности с получением мутантов с более высокой эффективностью и улучшенными биофизическими характеристиками (см. фиг. 3 в отношении аминокислотных последовательностей основных молекул, происходящих из DOM1h-131). После создания допускающей ошибки библиотеки (в среднем 1 аминокислотная замена на последовательность dAb, размер библиотеки 8×10^7) с использованием ПЦП-полимеразы низкой точности (Genemorph II, Stratagene) осуществляли семь раундов селекции, используя эти допускающие ошибки библиотеки. Такая стратегия привела к выделению клона DOM1h-131-8, молекулы, в которой 4 аминокислотные замены (одна в каркасной области 1 (FR1), одна в CDR1, одна в CDR3 и одна в FR4) дали приблизительно 100-кратное улучшение эффективности, как измерено в анализе с использованием клеток MRC-5 (приблизительно 4 нМ). В этом анализе клетки MRC-5 инкубировали с тестируемыми образцами в течение 1 ч, затем добавляли TNF- α (200 пг/мл). После инкубации в течение ночи определяли высвобождение IL-8 с использованием клеточного анализа, обнаруживающего IL-8 при помощи ABI 8200 (FMAT) (fluorometric microvolume assay technology; технология флуориметрического анализа в микрообъеме). В каждый эксперимент включали кривую зависимости от дозы TNF- α . Концентрация TNF- α , используемая для конкуренции с dAb за связывание с TNFR1 (200 пг/мл), составляла приблизительно 70% от максимального ответа на TNF- α в этом анализе.

Для дальнейшего улучшения эффективности отдельные аминокислотные положения диверсифицировали посредством олиго-направленного мутагенеза по ключевым положениям, предсказанным на основании информации о допускающей ошибки консенсусной последовательности основной молекулы. Во время этого процесса посредством скрининга с использованием BIAcore™ выделили улучшенный вариант клона DOM1h-131-8, DOM1h-131-24 (первоначально названный DOM1h-131-8-2 до коррекции), который имел единственную аминокислотную мутацию K94R (нумерация аминокислот согласно Kabat) и эффективность в RBA 200-300 пМ.

Далее на основе этой основной молекулы и NNS-библиотеки, из которой она происходила, создавали допускающие ошибки библиотеки и подвергали их трем раундам фаговой селекции, используя тепловую обработку (описание способа см. в Jespers L., et al., Aggregation-resistant domain antibodies selected on phage by heat denaturation. Nat. Biotechnol. 2004 Sep; 22(9): 1161-5). В процессе селекции библиотеки объединяли и из клонов, полученных во втором раунде селекции, получали dAb, такие как DOM1h-131-53, которое, как полагали, было более термостабильным. Предположили, что эти клоны будут обладать улучшенными биофизическими характеристиками. Некоторые мутации в каркасной области в клоне DOM1h-131-53 были эмбрионального типа для создания клона DOM1h-131-83. Этот клон стал основой для дальнейшей диверсификации посредством олиго-направленного мутагенеза индивидуальных CDR либо с применением фаг-дисплейной селекции, как описано выше, либо с применением технологии компартиментализации *in vitro* с использованием эмульсий. С применением фаг-дисплейной стратегии были созданы основные молекулы DOM1h-131-117 и DOM1h-131-151. DOM1h-131-511 создавали с применением технологии компартиментализации *in vitro*.

На этой стадии сравнивали эти три основные молекулы в биофизических и биологических анализах, и наилучшими свойствами обладала молекула DOM1h-131-511. Кроме того, эти молекулы тестировали на их устойчивость к протеолитическому расщеплению в присутствии трипсина или лейкозима. Лейкозим состоит из объединенной слюны, полученной от пациентов с муковисцидозом, и содержит высокие уровни эластазы и других протеаз, и его использовали в качестве имитатора условий *in vivo* при легочных заболеваниях. Эти результаты показали, что все три основные молекулы DOM1h-131-117, DOM1h-131-151 и DOM1h-131-511 быстро расщеплялись в присутствии трипсина или лейкозима. Эти данные поставили вопрос о персистенции DOM1h-131-511 *in vivo*, в организме пациента, и была разработана стратегия селекции в отношении улучшенной устойчивости к трипсину. Предположили, что такая улучшенная устойчивость к трипсину может оказывать благоприятный эффект на другие биофизические свойства данной молекулы. По существу модифицировали стандартный способ селекции фагов, чтобы обеспечить возможность селекции в присутствии протеаз перед селекцией по антигену. Для этого конструировали новый фаговый вектор, в котором делетировали концевую последовательность с-тус, чтобы обеспечить возможность селекции в присутствии трипсина без отщепления экспонируемого dAb от фага. На основе DOM1h-131-511 создали допускающие ошибки библиотеки и клонировали их в вектор pDOM33 (см. фиг. 50 в отношении карты вектора pDOM33). Фаговые концентраты, полученные из этой библиотеки, предварительно обрабатывали трипсином в концентрации либо 1 мг/мл, либо 100 мкг/мл при 37°C в течение 24 ч, затем добавляли ингибитор протеазы, который представлял собой полный набор ингибиторов протеаз от Roche (2 \times), для блокирования активности трипсина перед селекцией по релевантному антигену. Осуществляли четыре раунда селекции. Экспрессируемые растворимые TNFR1-связывающие dAb оценивали, используя BIAcore™, в отношении их способности связываться с TNFR1 в

присутствии или в отсутствие протеаз при инкубациях в течение 1 ч или в течение ночи при 37°C в присутствии или в отсутствие трипсина (в конечной концентрации трипсина 100 или 1000 мкг/мл).

Это привело к выделению двух основных молекул DOM1h-131-202 и DOM1h-131-206, которые демонстрировали улучшенную устойчивость к протеазам, как показано в BIAcore™-экспериментах по связыванию с антигеном. Интересно отметить, что DOM1h-131-202 содержала только одну мутацию в CDR2 (V53D) (нумерация всех аминокислот согласно Kabat) по сравнению с DOM1h-131-511, в то время как DOM1h-131-206 содержала только две мутации: первая мутация является такой же, как в DOM1h-131-202 (мутация V53D в CDR2), а вторая мутация представляет собой мутацию Y91H в FR3 (см. фиг. 3). Эта мутация Y91H в FR3 встречается в гене 3-20 зародышевой линии человека, что указывает на то, что этот остаток присутствует в антителах человека. Три клона DOM1h-131-511, DOM1h-131-202 и DOM1h-131-206 имеют аминокислотные последовательности, показанные на фиг. 3.

Активность молекул определяли, как показано ниже.

Оценка аффинности связывания DOM1H-131-202, DOM1H-131-511 и DOM1H-131-206 в отношении связывания с человеческим TNFR1 с использованием BIAcore™

Аффинности связывания DOM1H-131-202, DOM1H-131-511 и DOM1H-131-206 в отношении связывания с человеческим рекомбинантным TNFR1, экспрессируемым в *E.coli*, оценивали посредством BIAcore™-анализа. Анализ осуществляли с использованием биотинилированного человеческого TNFR1. 1400 RU (резонансных единиц) биотинилированного TNFR1 использовали для нанесения на чип со стрептавидином (SA). Поверхность регенерировали до исходного состояния, используя элюцию в условиях слабой кислотности. DOM1H-131-202, DOM1H-131-511 и DOM1H-131-206 пропускали через эту поверхность при определенных концентрациях, используя скорость потока 50 мкл/мин. Для работы использовали устройство BIAcore™ 3000, и данные анализировали и подгоняли к модели связывания 1:1. Данные по связыванию хорошо соответствовали модели 1:1 для всех тестируемых молекул. Все значения K_D рассчитывали, исходя из констант k_{on} и k_{off} . BIAcore™-анализы осуществляли при 25°C.

Приведенные ниже данные получены их трех независимых экспериментов. В каждом эксперименте результаты вычисляли путем усреднения числа подгонок с использованием наибольших концентраций dAb для k_d и меньших концентраций для k_a . Данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения (в скобках) результатов (табл. 1).

Таблица 1

Данные BIAcore™ для связывания DOM1H-131-202, DOM1H-131-511 и DOM1H-131-206 с TNFR1 человека

	k_{on}	k_{off}	K_D (нМ)
DOM1H-131-511 (511)	5,03E+05 (1,07E+05)	5,06E-04 (1,01E-04)	1,07 (0,44)
DOM1H-131-202 (202)	1,02E+06 (2,69E+05)	5,42E-04 (3,69E-05)	0,55 (0,11)
DOM1H-131-206 (206)	1,55E+06 (3,57E+05)	7,25E-04 (1,95E-04)	0,47 (0,06)

DOM1H-131-202, DOM1H-131-511 и DOM1H-131-206 связывались с TNFR1 человека сходным образом и с высокой аффинностью. DOM1H-131-202 и DOM1H-131-206 связываются со средними аффинностями 0,55 и 0,47 нМ соответственно. И DOM1H-131-202, и DOM1H-131-206 имеют несколько лучшую аффинность по сравнению с DOM1H-131-511, который имеет среднюю аффинность 1,07 нМ.

Анализ связывания с рецептором

Эффективность dAb определяли в отношении TNFR1 человека в анализе связывания с рецептором. В этом анализе измеряют связывание TNF-альфа с TNFR1 и определяют способность растворимого dAb блокировать это взаимодействие. Слияние TNFR1-FC улавливают на шариках, предварительно покрытых козьими антителами против IgG человека (H&L). Покрытые рецептором гранулы инкубируют с TNF-альфа (10 нг/мл), dAb, биотин-конъюгированным анти-TNF-альфа и стрептавидин-(alexa fluor 647) в 384-луночном планшете с прозрачным дном и черными стенками. Через 6 ч планшет считывают в системе ABI 8200 Cellular Detection и определяют ассоциированную с гранулами флуоресценцию. Если dAb блокирует связывание TNF-альфа с TNFR1, то интенсивность флуоресценции будет уменьшаться.

Данные анализировали с использованием программного обеспечения для анализа ABI 8200. Кривые зависимости эффекта от концентрации и значения эффективности (EC_{50} , средняя эффективная концентрация) определяли с использованием GraphPad Prism и сигмоидальной кривой зависимости ответа от дозы с переменным наклоном. Анализ повторяли в трех отдельных параллелях. Кривую зависимости от дозы TNF-альфа включали в каждый эксперимент (фиг. 38 и 39). Концентрация TNF-альфа, используемая для конкуренции с dAb за связывание с TNFR1 (10 нг/мл), составляет приблизительно 90% от максимального ответа на TNF-альфа в этом анализе.

Репрезентативный график, представленный на фиг. 39, демонстрирует способность dAb ингибировать связывание TNF-альфа с TNFR1. Во всех трех экспериментах отрицательные контрольные образцы

(HEL4, dAb против лизоцима белка куриного яйца и имитация V_H) слабо ингибируют взаимодействие между TNF-альфа и TNFR1 при высоких концентрациях. Средние значения эффективности (EC_{50}) для тестируемых образцов и положительных контролей (анти-TNFR1 mAb (моноклональное антитело), полученное от R&D Systems, mAb225) и Enbrel™ (этанерцепт; димерная слитая конструкция, состоящая из TNFR2, связанного с Fc-областью IgG1; разрешен для лечения ревматоидного артрита) представлены в табл. 2.

Таблица 2
Значения эффективности (EC_{50}) для DOM1H-131-202, DOM1H-131-206 и DOM1H-131-511 в анализе связывания с рецептором TNFR1 для трех повторных экспериментов.

Образец	Средняя EC_{50} (нМ)	SEM (стандартная ошибка среднего)
DOM1H-131-202	0,11	0,008
DOM1H-131-206	0,07	0,01
DOM1H-131-511	0,19	0,01
Enbrel™ (этанерцепт)	0,20	0,07
Анти-TNFR1 mAb № mAb225	0,08	0,003

В этом анализе DOM1H-131-206 кажется более эффективным, чем два других тестируемых dAb, и имеет похожую эффективность с имеющимся в продаже анти-TNFR1 mAb, MAB225 (R&D Systems).

Экспрессию основных клонов в *Pichia pastoris* осуществляли, как описано ниже.

Первичную аминокислотную последовательность трех основных молекул использовали для получения кодон-оптимизированных генов для секретируемой экспрессии в *Pichia pastoris*. Имеется 75%-ная идентичность последовательностей между кодон-оптимизированной и кодон-неоптимизированной последовательностью DOM1H-131-206. Три синтетических гена клонировали в экспрессирующий вектор pPIC-Z α (от Invitrogen) и затем осуществляли трансформацию двух штаммов *Pichia*, X33 и KM71H. Трансформированные клетки высевали на чашки с увеличивающимися концентрациями зеоцина (100, 300, 600 и 900 мкг/мл) для селекции клонов с множественными интегратами. Для скрининга экспрессии было отобрано приблизительно 15 клонов для каждой клеточной линии и конструкции.

Поскольку корреляция между высокой/низкой копийностью гена и уровнем экспрессии в *Pichia pastoris* до конца не понятна, несколько клонов отбирали во всем диапазоне концентраций зеоцина. Циклы ферментации в 5-литровом ферментаторе осуществляли с использованием клонов, которые не были подвергнуты расширенному скринингу в отношении высокой продуктивности. Это позволило получить значительные количества материала для дальнейших исследований.

Получение материала для характеристики белка

Для очистки V_H dAb из супернатантов микробных культур широко используются хроматографические смолы на основе белка А. Хотя это позволяет использовать одностадийный способ очистки для получения высокоочищенного материала, обычно в более чем 90% случаев условия элюции при низких pH для некоторых молекул могут приводить к образованию агрегатов. Также существует проблема ограниченной емкости аффинных смол для dAb; это означает необходимость использования значительных количеств смолы для обработки материала из ферментаторов. Для получения высококачественного материала с целью его характеристики и дальнейших исследований стабильности и исследований с применением небулайзеров разработали следующий способ очистки с использованием смолы с индукцией заряда смешанной модальности в качестве первичной стадии захвата с последующей анионообменной хроматографией. Без какой-либо значительной оптимизации это позволяет достичь приблизительно 70%-ного извлечения экспрессированного dAb с чистотой приблизительно 95%.

Для проведения стадии захвата на смоле с индукцией заряда смешанной модальности (Capto MMC от GE Healthcare) колонку уравнивают, используя 50 мМ фосфат натрия pH 6,0, и супернатант наносят без разведения или корректировки pH. После промывки колонки белок элюируют градиентом pH, используя буфер для элюции, представляющий собой 50 мМ Трис pH 9,0. Конкретные условия промывки и градиента слегка варьируют в зависимости от pI элюируемого белка.

Пик элюата затем дополнительно очищают посредством стадии анионообменной хроматографии. Это позволяет удалить остаточную HMW (высокомолекулярную) примесь, такую как алкогольоксидаза, и уменьшает содержание эндотоксина. Смолу уравнивают либо PBS, либо фосфатным буфером pH 7,4 без соли. При нанесении элюата с Capto MMC на анионообменную смолу dAb не связывается, и его извлекают из проскока (flow through). Эндотоксин и другие примеси связываются со смолой. Присутствие соли, в случае использования PBS-буфера, улучшает выход белка до 91% для этой стадии вместо выхода 86%, достигаемого в отсутствие соли. Однако присутствие соли снижает эффективность удаления эндотоксина, так что типичный уровень эндотоксина в dAb после этой стадии с включением соли составлял 58 EU/мл по сравнению с уровнем менее 1,0 EU/мл, полученным в отсутствие соли.

Характеристика белка

Материал, полученный из циклов ферментации в 5-литровом ферментаторе, характеризовали в отношении идентичности, используя масс-спектрометрию с электрораспылением, аминоконцевое секвенирование и изоэлектрическое фокусирование, а также в отношении чистоты, используя SDS-PAGE, SEC и набор для окрашивания гликопротеинов Gelcode (Pierce).

Идентичность

Анализ аминоконцевой последовательности первых пяти остатков каждого белка дал ожидаемый результат (EVQLL...). Масс-спектрометрию осуществляли на образцах белков, в которых произвели замену буфера на H₂O:ацетонитрил 50:50, содержащий 0,1% ледяной уксусной кислоты, с использованием C4 Zip-tips (Millipore). Измеренная масса каждого из трех белков находилась в пределах 0,5 Да от теоретической массы на основании первичной аминокислотной последовательности (рассчитанной с использованием средних масс) с учетом разницы масс -2, получаемой в результате образования внутренней дисульфидной связи. IEF использовали для идентификации белков на основании их pI, которые различались для каждого белка.

Чистота

Эти три белка наносили на невосстанавливающие SDS-PAGE гели в количествах 1 мкг и 10 мкг в двух повторностях. Во всех случаях наблюдали одну полосу. Для демонстрации уровней чистоты также осуществляли гель-фильтрацию. При проведении гель-фильтрации (SEC) на колонку G2000 SWXL TOSOH наносили по 100 мкг каждого белка при скорости потока 0,5 мл/мин. Использовали подвижную фазу PBS/10% этанол.

Исследование стабильности dAb в отношении селекции кандидатов

При показании COPD необходимо доставлять Ab в легкое, например, с использованием распылительного устройства. Это означает, что белок может испытывать сдвиговую деформацию и тепловой стресс в некотором диапазоне в зависимости от типа используемого небулайзера и может подвергаться ферментативному расщеплению протеазами во внутривнепочечной среде. Определяли, может ли белок доставляться с использованием этого типа устройства, происходит ли правильное распределение по размеру частиц и остается ли он функциональным после доставки небулайзером. Поэтому исследовали внутреннюю стабильность молекулы в диапазоне физических нагрузок для того, чтобы определить исходную стабильность и наиболее чувствительные анализы для измерения стабильности. Поскольку стабильность каждого белка будет зависеть от буферного раствора, в котором он растворен, необходимо было провести некоторую подготовительную работу. Такая информация, как буфер, pH, также может быть полезна для представления о стабильности белка во время последующего процесса очистки и дальнейшего хранения. Для того чтобы охарактеризовать изменения в молекулах во время воздействия на них различных физических нагрузок, использовали ряд аналитических методик, таких как гель-фильтрация (SEC), SDS-PAGE и изоэлектрическое фокусирование (IEF).

Оценка стабильности DOM1H-131-202, DOM1H-131-511 и DOM1H-131-206 при действии протеаз

Стабильность DOM1H-131-202, DOM1H-131-511 и DOM1H-131-206 при действии протеаз оценивали в BIAcore™-анализе остаточной связывающей активности после предварительной инкубации в течение определенных периодов времени с избытком протеаз. Приблизительно 1400 RU биотинилированного TNFR1 использовали для нанесения на чип со стрептавидином (SA). 250 нМ DOM1H-131-202, DOM1H-131-511 и DOM1H-131-206 инкубировали только с PBS или с 100 мкг/мл трипсина, эластазы или лейкозима в течение 1, 3 и 24 ч при 30°C. Реакцию останавливали путем добавления коктейля ингибиторов протеаз. Затем смеси dAb/протеазы пропускали через чип, покрытый TNFR1, вычитая сигнал ячейки сравнения.

Поверхность чипа регенерировали перед каждым циклом инъекции, используя 10 мкл 0,1 М глицина, pH 2,2. Фракцию DOM1H-131-202, DOM1H-131-511 и DOM1H-131-206, связавшихся с TNFR1 человека (за 10 с), предварительно инкубированных с протеазами, определяли относительно dAb, связавшегося в отсутствие протеаз. BIAcore™-анализы осуществляли при 25°C.

Данные получали из трех независимых экспериментов. Гистограмма показывает средние значения, а планки погрешностей указывают на стандартное отклонение результатов (результаты см. на фиг. 24).

Обнаружили, что DOM1H-131-202 и DOM1H-131-206 показали более высокую устойчивость к протеолитическому расщеплению трипсином, эластазой или лейкозимом по сравнению с DOM1H-131-511. Различие между DOM1H-131-202 и DOM1H-131-206 по сравнению с DOM1H-131-511 наиболее ярко выражено после инкубации в течение 1 ч с трипсином и 3 ч с эластазой или лейкозимом.

Термостабильность, определенная с использованием DSC

Для того чтобы определить, при каких значениях pH молекулы имели наибольшую стабильность, использовали дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC) для измерения температур плавления (T_m) каждого dAb в буфере Бриттона-Робинсона. Поскольку буфер Бриттона-Робинсона изготовлен из трех буферных систем (ацетата, фосфата и бората), то в одном и том же растворе можно получать pH в диапазоне от 3 до 10. Теоретическую величину pI определяли из первичной аминокислотной последовательности белков. На основании данных DSC обнаружили, что pH, при котором dAb имеют самую

высокую внутреннюю термостабильность, составляет: pH 7 для DOM1H-131-202 (202), pH 7-7,5 для DOM1H-131-206 (206) и pH 7,5 для DOM1H-131-511 (511). Во всех последующих исследованиях нагрузок и стабильности для каждого dAb использовали следующие значения pH: для DOM1H-131-202 (202) и DOM1H-131-206 (206) pH 7,0, а для DOM1H-131-511 (511) pH 7,5 в буфере Бриттона-Робинсона. Результаты суммированы ниже в табл. 3.

Таблица 3

Краткий обзор значений pH и T_m для DOM1H-131-202 (202), DOM1H-131-206 (206) и DOM1H-131-511 (511), как определено посредством DSC в буфере Бриттона-Робинсона при концентрации 1 мг/мл

dAb	pH, который дает наибольшую внутреннюю термостабильность	T_m (°C) dAb при данном pH
DOM1H-131-202 (202)	7,0	68,6
DOM1H-131-206 (206)	7,0-7,5	65,8
DOM1H-131-511 (511)	7,5	58,0

Тестирование собственной растворимости

Все основные молекулы dAb концентрировали в центрифужных концентраторах Vivaspin (отсечение 5 кДа) для определения их максимальной растворимости и выходов после концентрирования. Эксперименты осуществляли в буфере Бриттона-Робинсона при наиболее стабильном pH. Объемы образцов и концентрации измеряли во времени и регистрировали отклонение от ожидаемой концентрации, а также процентный выход образца.

Обнаружили, что все белки могут быть сконцентрированы до концентрации более 100 мг/мл в буфере Бриттона-Робинсона. И DOM1H-131-202 (202), и DOM1H-131-206 (206) демонстрировали более низкие выходы, чем ожидалось, по сравнению с DOM1H-131-511 (511), но остающиеся все еще на приемлемых уровнях.

Доставка основных dAb с использованием небулайзеров

В результате тестирования различных небулайзеров и препаративных буферов было продемонстрировано, что dAb могут эффективно доставляться с использованием широкого набора распылительных устройств. Важнее то, что впервые было показано, что распыление dAb в препаративном буфере приводило к получению желаемого распределения частиц по размерам (сравнимое с использованием процента капель менее 5 мкм) для эффективной доставки в легкое при сохранении функциональности белка. Это дополнительно описано ниже.

Сравнение производительности различных устройств

DOM1H-131-511 (511) тестировали в шести распылительных устройствах, включающих по два устройства из каждой из трех основных групп небулайзеров, используемых для жидких композиций, т.е. ультразвуковых небулайзеров, струйных небулайзеров и небулайзеров на основе технологии вибрирующего сита. В каждом устройстве dAb тестировали в концентрации 5 мг/мл с диапазоном концентраций ПЭГ. Для каждого образца измеряли процент капель размером менее 5 мкм, используя устройство Malvern Spraytek (Malvern Instruments Limited, UK), и результаты представлены на фиг. 35. Стабильность каждого образца после его распыления оценивали, используя SEC для анализа количества образца, который димеризовался как в веществе, оставшемся в колпачке, так и в собранном аэрозоле. Результаты можно видеть на фиг. 36. Чем меньше степень образования димеров, тем выше стабильность.

Большая часть устройств может доставлять 40% или более жидкой композиции в подходящем диапазоне размеров, но устройства eFlow (распылительное устройство на основе технологии вибрирующего сита) и PARI LC (струйный небулайзер) работают лучше, причем устройство PARI LC* (star) доставляет более 80%, когда в состав буфера включен ПЭГ. Это увеличение доставки при использовании ПЭГ также наблюдается для eFlow и в меньшей степени для PARI LC+.

Важно, что также обнаружили, что после распыления сохраняется активность dAb (см. результаты на фиг. 8).

Влияние буферных добавок

Вследствие меньшей стабильности DOM1H-131-511 (511), 50 мМ фосфатный препаративный буфер, содержащий как ПЭГ 1000, так и сахарозу (и имеющий вязкость, которая находится в диапазоне, который определен как примерно равный вязкости раствора от примерно 2 до примерно 10% ПЭГ 1000 в 50 мМ фосфатном буфере, содержащем 1,2% сахарозы (мас./об.)), способствует защите dAb как от сдвиговой деформации, так и от теплового стресса. Поскольку и DOM1H-131-202 (202), и DOM1H-131-206 (206) имеют более высокие T_m и демонстрируют значительно улучшенную стабильность к тепловому стрессу, все молекулы тестировали как в исходном препаративном буфере, так и в буфере Бриттона-Робинсона (который имеет меньшую вязкость, чем препаративный буфер). dAb тестировали в обоих устройствах E-flow и PARI LC+ со временем работы 3,5 мин при концентрации белка 5 мг/мл и распределение частиц по размерам определяли с использованием устройства Malvern Spraytek. Для сравнения имеющееся в продаже лекарственное средство для лечения муковисцидоза (обозначенное как стандартный белок X), которое доставляют с использованием распылительного устройства, тестировали в его

собственном препаративном буфере. Результаты представлены на фиг. 37. Для хорошей доставки и распределения в глубоких отделах легких идеальный размер частиц составляет менее 6 мкм, например менее 5 мкм. Все dAb обеспечивают сравнимые уровни размеров частиц, которые были меньше 5 мкм как в буфере Бриттона-Робинсона, так и в препаративном буфере (как описано ранее). Однако более высокая вязкость препаративного буфера может быть особенно полезной для продуцирования частиц в подходящем диапазоне размеров, например частиц менее 5 мкм. Концентрацию dAb в колпачке устройства определяли, измеряя A_{280} до и после распыления. Обнаружили, что концентрация белка не изменялась существенно, что указывает на то, что ни белок, ни разбавитель не распылялись предпочтительно во время доставки.

Заключение

Продемонстрировано, как описано выше, что полипептиды, такие как dAb, можно распылять с использованием различных, имеющихся в продаже распылительных устройств, и важно, что они сохраняют стабильность и биологическую активность после распыления и что после распыления не наблюдается никакой значительной агрегации. Когда в состав буфера добавляют эксципиенты, увеличивающие вязкость, такие как ПЭГ, распределение частиц по размеру и процент капель с размером менее 5 мкм могут быть улучшены, что потенциально улучшает доставку dAb в глубокие отделы легких.

Доставка dAb в легкие также может быть улучшена посредством увеличения концентрации dAb, например, вплоть до концентрации примерно 40 мг/мл, и времени доставки без какого-либо уменьшения стабильности или активности dAb.

Пример 1.

Фаговый вектор PDOM13

Использовали вектор pDOM13 для фагового дисплея на основе нитчатого фага (fd). Этот вектор продуцирует белки, слитые с оболочечным фаговым белком III. Сайт множественного клонирования pDOM13 проиллюстрирован на фиг. 1. Гены, кодирующие dAb, клонировали в виде SalI/NotI-фрагментов.

Пример 2.

Протеазные селекции экспонируемых на фагах доменных антител (dAb) с различной устойчивостью к трипсину

Гены, кодирующие dAb: DOM4-130-54, которое связывается с IL-1R1, DOM1h-131-511, которое связывается с TNFR1, и DOM15-10, DOM15-26 и DOM15-26-501, которые связываются с VEGFA, клонировали в pDOM13, и фаги, экспонирующие эти dAb, получали в соответствии со стандартными методами. Фаги очищали посредством ПЭГ-преципитации, ресуспендировали в PBS и титровали.

Указанные выше dAb демонстрировали разную способность противостоять расщеплению трипсином при тестировании их в виде выделенных белков. Устойчивость к расщеплению оценивали следующим образом: dAb (1 мг/мл) в PBS инкубировали с трипсином в концентрации 40 мкг/мл при 30°C, что приводит к молекулярному соотношению dAb:трипсин 25:1. Образцы (30 мкл) отбирали непосредственно перед добавлением трипсина и затем через 1, 3 и 24 ч. Протеазную активность нейтрализовали путем добавления полного набора ингибиторов протеаз от Roche (2x) с последующим погружением в жидкий азот и хранением на сухом льду. По 15 мкг каждого образца dAb далее анализировали посредством электрофореза на геле Novex (10-20%) Tricine и белки окрашивали с помощью SureBlue (1x).

И DOM15-10, и DOM15-26-501, оба, в значительной степени переваривались в течение первых трех часов. DOM15-26, DOM4-130-54 и DOM1h-131-511 оказались более стабильными, причем переваривание этих dAb становилось заметным только через 24 ч (фиг. 2).

Экспонируемые на фагах dAb инкубировали также в присутствии трипсина для оценки того, коррелирует ли устойчивость к трипсину экспонируемых на фагах Ab с результатами, полученными с выделенными растворимыми dAb. Тестировали различные концентрации трипсина и времена инкубации. Во всех случаях после нейтрализации трипсина полным набором ингибиторов протеаз от Roche фаги тестировали в отношении их способности связываться с типичным лигандом: белком A, который связывается со всеми V_H -доменными антителами (например, DOM1h-131, DOM15-26, DOM15-26-501), или белком L, который связывается со всеми N_K -доменными антителами (например, DOM4-130-54, DOM15-10). Фаги также тестировали в отношении связывания с целевыми антигенами. В обоих случаях предполагалось, что связывание коррелирует с сохранением структурной целостности dAb благодаря устойчивости к протеолизу. Связывающую активность измеряли либо посредством ELISA (с использованием конъюгированных антител против фага), либо посредством элюции связавшихся фагов и анализа титрованием после инфицирования клеток *E. coli* TG1, находящихся в экспоненциальной фазе роста.

Тестирование DOM15-10, DOM15-26 и DOM15-26-501 на фаге

Каждое dAb обрабатывали в течение 1 ч при комнатной температуре трипсином в диапазоне концентраций (100, 10 и 0 мкг/мл). Активность трипсина блокировали полным набором ингибиторов протеаз от Roche (1X) и затем фаги разбавляли в 2% Marvell в PBS, инкубировали с 50 нМ биотинилированного антигена (рекомбинантного VEGF человека (R&D Systems)) в течение 1 ч при комнатной температуре. Добавляли покрытые стрептавидином гранулы (Dynabeads M-280 (Invitrogen)), которые предварительно блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре 2% Marvell в PBS, и смесь затем инкубировали в

течение 5 мин при комнатной температуре. Все стадии инкубации с Dynabeds осуществляли на вращающемся диске. Несвязавшийся фаг отмывали путем промывки гранул восемь раз 1 мл 0,1% Tween-20 в PBS. Связавшийся фаг элюировали, используя 0,5 мл 0,1 М глицина, pH 2,2, и нейтрализовали 100 мкл 1 М трис-HCl, pH 8,0. Элюированный фаг использовали для инфицирования клеток TG1, находящихся в экспоненциальной фазе роста (1 ч при 37°C), и высевали на чашки с тетрациклином. Чашки инкубировали в течение ночи при 37°C и осуществляли подсчет колоний (см. табл. 4). Наилучшие результаты наблюдали для селекции с инкубацией при 100 мкг/мл трипсина. Наблюдалось примерно 10-кратное увеличение выхода DOM15-26 по сравнению с DOM15-10 и DOM15-26-501.

Второй эксперимент осуществляли для дополнительного подтверждения этих результатов в более жестких условиях инкубации. Экспонируемые на фагах dAb обрабатывали в течение 1 или 2 ч при 37°C с перемешиванием (250 об/мин). Наилучшие результаты наблюдали для селекции с инкубацией в течение 2 ч при 100 мкг/мл трипсина. Выход DOM15-26 был в 200 раз выше, чем выход DOM15-26-501, и в 1000 раз выше, чем выход DOM15-10.

В третьем эксперименте фаги, экспонирующие DOM15-26 и DOM15-26-501, вначале смешивали 1:1. Затем их инкубировали либо с трипсином (1000 мкг/мл), либо без трипсина в течение 2 ч при 37°C с перемешиванием (250 об/мин) и затем селектировали в отношении связывания с антигеном, как описано выше. Секвенирование десяти колоний для каждой селекции обнаружило смешанную популяцию клонов для селекции без предварительной обработки трипсином (DOM15-26: 4/10; DOM15-26-501: 6/10), в то время как все клоны для селекции с трипсином кодировали DOM15-26, как и ожидалось.

Эти эксперименты показывают, что селекционное давление может быть получено путем добавления протеазы к фагам, экспонирующим dAb, так что предпочтительно селектируются фаги, экспонирующие наиболее стабильные к протеолизу dAb (после пэннинга на типичном лиганде или антигене).

Таблица 4

Эксперимент	Длительность инкубации	Темп.	Концентрация трипсина	Титр DOM15-26	Титр DOM15-26-501	Смешанный титр 1:1	Титр DOM15-10
1 исходное кол-во (input) 10 ¹⁰	1 ч	Комн. темп.	100 мкг/мл	1,6x10 ⁸	6,3x10 ⁷		1,1x10 ⁷
	1 ч	Комн. темп.	10 мкг/мл	3x10 ⁸	4,4x10 ⁸		2,4x10 ⁸
	1 ч	Комн. темп.	0 мкг/мл	0,9x10 ⁸	2x10 ⁸		0,7x10 ⁸
2 исходное кол-во 10 ⁹	1 ч, 250 об/мин	37°C	100 мкг/мл	2x10 ⁷	1x10 ⁶		1x10 ⁵
	2 ч, 250 об/мин	37°C	100 мкг/мл	1x10 ⁷	6x10 ⁴		1x10 ⁴
	2 ч, 250 об/мин	37°C	0 мкг/мл	5,4x10 ⁷	4,1x10 ⁷		3x10 ⁸
3 исходное кол-во 10 ¹⁰	2 ч, 250 об/мин	37°C	100 мкг/мл	2,3x10 ⁸	8x10 ⁵	6,8x10 ⁷	
	2 ч, 250 об/мин	37°C	0 мкг/мл	3,9x10 ⁸	4,4x10 ⁸	4,8x10 ⁸	

Тесты с DOM4-130-54 на фаге

DOM4-130-54 тестировали согласно аналогичному протоколу, как описано выше. Варьировали следующие параметры: концентрацию трипсина, температуру и длительность инкубации. Биопэннинг осуществляли против IL-IRI-Fc (слияние IL-1RI и Fc) при 1 нМ концентрации в PBS. Значительное уменьшение фагового титра наблюдали только после инкубации фага с трипсином в концентрации 100 мкг/мл в течение ночи при 37°C (см. табл. 5).

Таблица 5

Длительность инкубации	Температура	Концентрация трипсина	Титр
1 ч	Комнатная темп.	100 мкг/мл	1,8 x 10 ¹⁰
1 ч	Комнатная темп.	10 мкг/мл	7,2 x 10 ⁹
1 ч	Комнатная темп.	0 мкг/мл	6,6 x 10 ⁹
В течение ночи	Комнатная темп.	100 мкг/мл	2,16 x 10 ⁹
В течение ночи	Комнатная темп.	10 мкг/мл	7,2 x 10 ⁹
В течение ночи	Комнатная темп.	0 мкг/мл	7,8 x 10 ⁹
В течение ночи	37°C	100 мкг/мл	2,04 x 10 ⁸
В течение ночи	37°C	10 мкг/мл	3,84 x 10 ⁸
В течение ночи	37°C	0 мкг/мл	7,2 x 10 ⁹

Тесты с фагом, экспонирующим DOM1h-131

Фаг DOM1h-131 (близкородственный DOM1h-131-511 по аминокислотной последовательности), обрабатывали трипсином в концентрации 0, 10, 100 и 1000 мкг/мл в течение 1 ч при комнатной температуре. Переваривание ингибировали путем добавления 25x полного набора ингибиторов протеаз (Roche). Последовательные 2-кратные разведения фага осуществляли в планшете для ELISA, покрытом 1 нМ

TNFRI, и связывание фага определяли с помощью анти-M13-HPP (пероксидаза хрена). Результаты представлены ниже в табл. 6.

Таблица 6

DOM1h-131				
Концентрация трипсина				Исходное количество фага
1 мг/мл	100 мкг/мл	10 мкг/мл	0 мкг/мл	
0,284	0,418	0,784	0,916	4,51E+10
0,229	0,377	0,802	0,944	2,26E+10
0,183	0,284	0,860	0,949	1,13E+10
0,133	0,196	0,695	0,962	5,64E+09
0,114	0,141	0,573	0,946	2,82E+09
0,089	0,115	0,409	0,850	1,41E+09
0,084	0,084	0,286	0,705	7,05E+08
0,080	0,084	0,213	0,577	3,52E+08

Эти тест-эксперименты ясно демонстрируют, что 100 мкг/мл трипсина и температура 37°C подходят для создания селекционного давления на фаги, экспонирующие dAb с разной степенью устойчивости к протеолизу трипсином. Продолжительность инкубации с протеазой может быть оптимизирована для каждого экспонируемого на фаге dAb, если это желательно.

Пример 3.

Протеазная селекция экспонируемых на фагах репертуаров доменных антител

Были созданы четыре репертуара с использованием следующих dAb в качестве родительских молекул: DOM4-130-54, DOM1h-131-511, DOM15-10 и DOM15-26-555. Случайные мутации вводили в гены посредством ПЦР, используя набор Stratagene Mutazyme II, биотинилированные праймеры и 5-50 пг матрицы для 50 мкл реакционной смеси. После переваривания с использованием SalI и NotI вставки очищали от непереваренных продуктов с помощью покрытых стрептавидином гранул и лигировали в pDOM13 по соответствующим сайтам. Клетки E.coli TB1 трансформировали очищенной смесью для лигирования, получая в результате большие репертуары устойчивых к тетрациклину клонов: $8,5 \times 10^8$ (DOM4-130-54), $1,5 \times 10^9$ (DOM1h-131-511), 6×10^8 (DOM15-10) и 3×10^9 (DOM15-26-555).

Фаговые библиотеки получали двойной преципитацией с ПЭГ и ресуспендировали в PBS.

Частоты аминокислотных мутаций составляли 2,3 и 4,4 для репертуаров DOM1h-131-511 и DOM4-130-54 соответственно. Функциональность оценивали путем тестирования 96 клонов в фаговом ELISA, используя лунки, покрытые белком А или белком L (в концентрации 1 мкг/мл). 62,5 и 27% клонов демонстрировали функциональный дисплей dAb в репертуарах DOM1h-131-511 и DOM4-130-54 соответственно.

Частоты аминокислотных мутаций составляли 2,5 и 4,6 для репертуаров DOM15-10 и DOM15-26-555 соответственно. Функциональность оценивали путем тестирования 96 клонов в фаговом ELISA, используя лунки, покрытые белком А или белком L (в концентрации 1 мкг/мл). 31,3 и 10,4% клонов демонстрировали функциональный дисплей dAb в репертуарах DOM15-10 и DOM15-26-555 соответственно.

Репертуары DOM4-130-54 и DOM1h-131-511

Для селекции dAb с улучшенной устойчивостью к протеазам осуществляли четыре раунда селекции, используя эти библиотеки.

Первый раунд селекции был основан на связывании с антигеном (1 нМ или 10 нМ антигена) без обработки протеазами для очистки библиотеки с целью удаления клонов, которые больше не связывались с антигеном с высокой аффинностью. Выходы после 1-го раунда составляли 10^8 - 10^{10} (по сравнению с исходным количеством 10^{11} фагов), что указывает на то, что большая часть библиотеки связывалась с антигеном с высокой аффинностью.

Во 2-м раунде вводили обработку протеазой (100 мкг/мл трипсина) и выходы представлены в табл. 7.

Таблица 7

Условия инкубации с трипсином	Библиотека DOM1h-131-511	Библиотека DOM4-130-54
37°C, в течение ночи	$1,86 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$
37°C, 2 ч	$4,8 \times 10^8$	$5,1 \times 10^8$
Комнатная температура, 2 ч	$1,2 \times 10^9$	$4,62 \times 10^9$
Без трипсина	приблизит. 1×10^9	приблизит. 4×10^9
Без антигена	$1,8 \times 10^4$	менее 6×10^3

Наблюдали значительную селекцию, когда dAb обрабатывали трипсином при 37°C в течение ночи. Этот выход использовали для 3-го раунда, где фаг обрабатывали либо 1 мг/мл, либо 100 мкг/мл трипсина

при 37°C в течение 24 ч. Титры фагов, обработанных трипсином, из 3-го раунда составляли 10^5 - 10^6 для репертуара DOM1h-131-511 и 10^7 - 10^8 для репертуара DOM4-130-154.

Все выходы после 3-го раунда (DOM1h-131-511 и DOM4-130-154 с 1 мг/мл и 100 мкг/мл) подвергали четвертому раунду селекции против 1 нМ антигена с 100 мкг/мл трипсина. Титры находились в диапазоне 10^6 - 10^8 аналогично тому, что наблюдали в 3-м раунде. Некоторое обогащение наблюдали для репертуара DOM1h-131-511, но никакого обогащения не наблюдали для репертуара DOM4-130-54.

Репертуары DOM15-10 и DOM15-26-555

Первый раунд селекции осуществляли с 2 нМ концентрацией биотинилированного hVEGF (человеческого фактора роста сосудистого эндотелия) и без протеазной обработки для очистки библиотеки с целью удаления клонов, которые больше не связывались с антигеном с высокой аффинностью. Выходы после 1-го раунда составляли примерно 10^8 (по сравнению с исходным количеством 10^{10} фагов для DOM15-10 и 10^{11} фагов для DOM15-26-555), что указывает на то, что большая часть библиотеки связывалась с антигеном с высокой аффинностью.

Второй и третий раунды селекции осуществляли с 2 нМ биотинилированного hVEGF. Перед пэннингом на hVEGF фаги инкубировали в присутствии трипсина (100 мкг/мл) при 37°C в шейкере (250 об/мин). Продолжительность инкубации составляла 1 ч для репертуара DOM15-10 и 2 ч для репертуара DOM15-26-555.

Выходы были следующими: $1,5 \times 10^6$ и 9×10^5 для второго и третьего раундов селекции с репертуаром DOM15-10; $2,2 \times 10^8$ и $3,9 \times 10^9$ для второго и третьего раундов селекции с DOM15-26-555.

Пример 4.

Анализ продуктов селекции: репертуары DOM4-130-54 и DOM1h-131-511

Все продукты 3-го раунда и 4-го раунда субклонировали в вектор pDOM5 и использовали для трансформации клеток JM83. Вектор pDOM5 представляет собой вектор на основе pUC119. Экспрессия белков находится под контролем P_{lac}-промотора. Лидерная последовательность GAS1 (growth arrest-specific protein 1; белок 1, специфический для остановки роста) (см. WO 2005/093074) обеспечивает секрецию выделенных растворимых dAb в периплазму и культуральный супернатант E.coli JM83. 96 и 72 индивидуальных колоний после 3-го раунда и 4-го раунда перекальвали случайным образом для экспрессии.

12-24 клон секвенировали из каждого выхода после 3-го раунда и 4-го раунда. Консенсусные мутации наблюдали для обоих раундов селекции и приблизительно 25 клонов, содержащих консенсусные мотивы, выбирали для дальнейшей характеристики. Аминокислотные последовательности этих клонов представлены на фиг. 3 (селектированные варианты DOM1h-131-511) и фиг. 4 (селектированные варианты DOM4-130-54), а последовательности ДНК представлены на фиг. 19A-19L. Аминокислоты, которые отличаются от родительской последовательности в селектированных клонах, указаны (идентичные аминокислоты обозначены точками). Петли, соответствующие CDR1, CDR2 и CDR3, обведены рамками.

Эти клоны экспрессировали в большем количестве, очищали на белке L (для вариантов DOM4-130-54) и белке A (для вариантов DOM1h-131-511) и тестировали в отношении связывания с антигеном на ВІАсоге после 1 ч инкубации или после инкубации в течение ночи при 37°C в присутствии или в отсутствие трипсина (конечная концентрация 100 или 1000 мкг/мл).

Как правило, продукты селекции DOM4-130-54 были более стабильными, причем большая часть клонов сохраняла устойчивость к трипсину в течение 1 ч, а самые лучшие клоны - в течение ночи. По сравнению с этим небольшое количество клонов после селекции DOM1h-131-511 было устойчивым к трипсину в течение 1 ч и в то же время ни один клон не был устойчив в течение ночи.

Пример 5.

Анализ продуктов селекции: репертуары DOM15-10 и DOM15-26-555

Эффективность селекции с предварительной обработкой трипсином сначала тестировали посредством фагового ELISA с использованием моноклональных антител с перевариванием и без переваривания трипсином. Перекальвали восемнадцать колоний со второго раунда селекции и 24 колонии с третьего раунда селекции каждой библиотеки. Клоны DOM15-10, DOM15-26-501 и DOM15-26 использовали в качестве контролей. Дополнительные контроли включали раствор амплифицированных и очищенных фагов из каждой библиотеки после второго и третьего раундов селекции с использованием трипсина.

Каждый образец фага делили на две фракции, первую обрабатывали 100 мкг/мл трипсина, вторую не обрабатывали трипсином. Инкубацию обеих фракций осуществляли в течение 1 ч при 37°C с перемешиванием (250 об/мин) и блокировали путем добавления полного набора ингибиторов протеаз от Roche (1×).

Фаговый ELISA осуществляли, используя переваренные и непереваренные трипсином образцы. Лунки в ELISA покрывали нейтравидином в концентрации 1 мкг/мл в 0,1 М бикарбонатном буфере. После стадий промывки PBS и блокирования покрытых антигеном лунок 1% Tween-20 в PBS в течение 1 ч при комнатной температуре лунки покрывали биотинилированным hVEGF, разбавленным в 1% Tween-20 в PBS в концентрации 100 нг/мл. Затем лунки промывали PBS и добавляли обработанные или необработанные фаговые супернатанты, разбавленные 1:1 1% Tween-20/PBS. После 30 мин инкубации при 37°C

лунки промывали 1% Tween-20/PBS с последующей 30-минутной инкубацией при 37°C с конъюгатом анти-(фаг M13)-HRP (разбавленным 1/5000 в 1% Tween-20/PBS). Затем лунки промывали PBS и пероксидазой. Реакцию инициировали путем добавления реагента SureBlue. Примерно через 10 мин реакцию останавливали эквивалентным объемом 1 М HCl и лунки считывали при OD_{450 нм}.

Считывание результатов ELISA для нестабильных контролей DOM15-10 и DOM15-26-501, обработанных трипсином, давало OD450 ниже 0,404, и это значение принимали в качестве предельного значения для нестабильного клона. Все образцы, которые давали OD ниже 0,404, считались нестабильными. Все образцы, которые давали большее значение, считались стабильными.

Таблица 8

Библиотека	Трипсин		Без трипсина	
	2-я селекция	3-я селекция	2-я селекция	3-я селекция
DOM15-10	33%	89%	100%	100%
DOM15-26-555	94,4%	100%	100%	100%

В табл. 8 показано процентное содержание стабильных клонов после второго и третьего раундов трипсиновой селекции каждой библиотеки. Обогащение устойчивых к трипсину клонов является заметным в обеих библиотеках после третьего раунда селекции. Полученные в ELISA значения для контрольных лунок, содержащих амплифицированную очищенную фаговую смесь, после каждого раунда селекции были намного выше 0,404 в каждом случае после переваривания трипсином. Кроме того, небольшое увеличение сигнала наблюдали при сравнении обработанных трипсином фагов после третьего раунда селекции с обработанными трипсином фагами после второго раунда селекции. Фаговая библиотека DOM15-10 демонстрировала увеличение примерно на 14% от исходного значения. Фаговая библиотека DOM15-26-555 демонстрировала увеличение, которое представляет собой примерно 2% от исходного значения.

В целом эти результаты демонстрируют, что селекция с предварительной обработкой трипсином была эффективной для отбора устойчивых к трипсину фаговых клонов из репертуаров DOM15-10 и DOM15-26-555.

Все продукты второго и третьего раундов селекции (DOM15-26-555) и только после третьего раунда селекции (DOM15-10) субклонировали в вектор pDOM5 и трансформировали в электрокомпетентные клетки HB2151. Вектор pDOM5 представляет собой вектор на основе pUC119. Экспрессия белков находится под контролем P_{lac}-промотора. Лидерная последовательность GAS1 обеспечивает секрецию выделенных растворимых dAb в периплазму и культуральный супернатант E.coli HB2151. 184 индивидуальные колонии после каждого раунда селекции (3 и 4) случайным образом перекалывали для экспрессии в 1 мл среды для культивирования.

Бактериальные супернатанты разбавляли в буфере HBS-EP BIAcore (соотношение объемов 1:1) и разделяли на две равные части. Трипсин добавляли только в один флакон до конечной концентрации 20 мкг/мл. Инкубацию осуществляли в течение 40 мин при 37°C с перемешиванием (250 об/мин). После блокирования реакции полным набором ингибиторов протеаз от Roche (1X) как обработанные трипсином, так и необработанные трипсином фаговые супернатанты тестировали на BIAcore 3000 в отношении связывания с антигеном (2000 RU биотинилированного hVEGF на сенсорном чипе SA).

Критериями для перенесенных перекалыванием клонов были: уменьшение связывания с антигеном менее чем на 15% для dAb, обработанных трипсином, относительно необработанных dAb (на основании максимальных RU, достигаемых для выбранной временной точки), которое отражает стабильность dAb к протеазной обработке в целом; и уменьшение скорости диссоциации менее чем на 40% между двумя временными точками в процессе диссоциации dAb от антигена. На основании этих величин осуществляли секвенирование 60 клонов после второго и третьего раундов селекции библиотеки DOM15-26-555 и 17 клонов после третьего раунда селекции библиотеки DOM15-10. Консенсусные мутации наблюдались в продуктах обеих библиотек и 17 клонов из каждой библиотеки, содержащих консенсусные мотивы, выбрали для дальнейшей характеристики. Аминокислотные последовательности этих клонов представлены на фиг. 5 (селектированные варианты DOM15-26-555) и фиг. 6 (селектированные варианты DOM15-10), а последовательности ДНК представлены на фиг. 20А-20Е. Аминокислоты, которые отличаются от родительской последовательности в селектированных клонах, указаны (идентичные аминокислоты обозначены точками). Петли, соответствующие CDR1, CDR2 и CDR3, обведены рамками.

Эти клоны экспрессировали в 50 мл культуральной среды для экспрессии, очищали на белке А (для вариантов DOM15-26-555) или белке L (для вариантов DOM15-10), разбавленных до концентрации 100 нМ в буфере HBS-EP, и тестировали в отношении связывания с антигеном на BIAcore после 1,5 ч инкубации при 37°C с перемешиванием (250 об/мин) в присутствии или в отсутствие трипсина (конечная концентрация 20 мкг/мл).

Эти клоны тестировали также в отношении устойчивости к трипсину, используя способ, описанный в примере 2. Белки подвергали замене буфера на PBS и концентрировали до 1 мг/мл. 25 мкг белка смешивали с 1 мкг трипсина (Promega) и инкубировали в течение 0 ч и 24 ч при 30°C. После этого реакцию блокировали полным набором ингибиторов протеаз от Roche (1X) и DTT (дитиотреитол), а также добав-

ляли агент для нанесения образцов. Образцы денатурировали в течение 5 мин при 100°C. Затем 15 мкг каждого образца анализировали посредством электрофореза на гелях Novex 10-20% Trisine и белки окрасивали с помощью SureBlue (1x).

Как правило, продукты селекции DOM15-26-555 были более стабильными, причем большая часть клонов сохраняла устойчивость к трипсину в течение 1,5 ч при тестировании на ВІАсоге и в течение ночи при тестировании на SDS-PAGE. По сравнению с этим, только небольшое количество клонов после селекции DOM15-10 было устойчивым к трипсину в течение ночной обработки при тестировании на SDS-PAGE.

Пример 6.

Идентификация вариантов DOM1h-131-511

DOM1h-131-203, DOM1h-131-204 и DOM1h-131-206 анализировали более подробно. Их сравнивали на ВІАсоге при концентрации dAb 500 нМ после инкубации с различными концентрациями трипсина (варьирующими от 0 до 100 мкг/мл) в течение ночи при 37°C. Кривые ВІАсоге представлены на фиг. 7. Результаты ясно показывают, что оба варианта более устойчивы, чем родительское антитело, к протеолизу при высоких концентрациях трипсина (100 мкг/мл). Два dAb, DOM1h-131-202 и DOM1h-131-206, также сравнивали вместе с их родительским антителом в отношении устойчивости к различным другим протеазам, включая лейкозим, эластазу и панкреатин, в условиях, описанных выше, при концентрации протеазы 100 мкг/мл. dAb продемонстрировали повышенную устойчивость к протеолизу по сравнению с родительским антителом в отношении всех протестированных протеаз. Кривые ВІАсоге для эластазы и лейкозима представлены на фиг. 8.

Каждое dAb (5 мкМ) обрабатывали 100 мкг/мл трипсина с чистотой "для секвенирования" в течение 0, 1, 3 и 24 ч. Реакцию ингибировали полным набором ингибиторов протеаз от Roche (25X) и продукты реакции анализировали на геле 4-12% Novex Bis-Tris. Гели представлены на фиг. 9.

Пример 7.

Идентификация вариантов DOM4-130-54

DOM4-130-201 и DOM4-130-202 анализировали более подробно. Их сравнивали на ВІАсоге при концентрации dAb 500 нМ после инкубации с различными концентрациями трипсина (варьирующими от 0 до 100 мкг/мл) в течение ночи при 37°C. Кривые ВІАсоге представлены на фиг. 10. Результаты ясно показывают, что все три варианта более устойчивы, чем родительское антитело, к протеолизу при высоких концентрациях трипсина (100 мкг/мл). DOM4-130-201 и DOM4-130-202 также сравнивали с родительским антителом в отношении устойчивости к различным другим протеазам, включая лейкозим, эластазу и панкреатин, в условиях, описанных выше, с концентрацией протеазы 100 мкг/мл. Хотя результаты были менее наглядными, чем с трипсином, основные dAb продемонстрировали повышенную устойчивость к протеолизу по сравнению с родительским антителом в отношении всех тестируемых протеаз. Кривые ВІАсоге для эластазы и лейкозима представлены на фиг. 11.

Каждое dAb (5 мкМ) обрабатывали 100 мкг/мл трипсина с чистотой "для секвенирования" в течение 0, 1, 3 и 24 ч. Реакцию ингибировали полным набором ингибиторов протеаз от Roche (25X) и продукты реакции анализировали на геле 4-12% Novex Bis-Tris. Гели представлены на фиг. 9.

Пример 8.

Дополнительная характеристика вариантов DOM1h-131-511 и DOM4-130-54

Сначала dAb анализировали с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) для того, чтобы определить, коррелирует ли увеличение устойчивости к трипсину с увеличением температуры плавления (T_m). Увеличение стабильности в присутствии трипсина коррелирует с увеличением T_m (см. табл. 9).

Таблица 9

Название	T_m , °C
DOM1h-131-511	57,9
DOM1h-131-202	67,5
DOM1h-131-203	65,7
DOM1h-131-204	62,3
DOM1h-131-206	64,9
DOM4-130-54	54,1
DOM4-130-201	64,7
DOM4-130-202	64,5

dAb, происходящие из DOM1h-131-511, также сравнивали в анализе с использованием клеток MRC-5 (см. табл. 10). В этом анализе измеряли способность dAb нейтрализовать TNF α -стимулированное высвобождение IL-8 для того, чтобы определить, приводит ли увеличение стабильности в присутствии трипсина к уменьшению эффективности. Однако активность устойчивых к трипсину dAb в этом анализе была по существу неизменной.

Таблица 10

Образец	ND50 (средняя нейтрализующая доза), нМ
DOM1h-131-511	1,98
DOM1h-131-511	1,71
DOM1h-131-511 (230307CE)	1,89
DOM1h-131-203 (230307CE)	2,28
DOM1h-131-204 (230307CE)	1,89
DOM1h-131-511	1,46
DOM1h-131-206 (230307CE)	0,71

dAb, происходящие из DOM4-130-54, тестировали в анализе связывания с рецептором для того, чтобы посмотреть, обладают ли они все той же способностью ингибировать связывание IL-1 с IL-RI (см. табл. 11). В этом анализе активность устойчивых к трипсину dAb была неизменной.

Таблица 11

dAb	IC50 (нМ)
DOM4-130-54	280 нМ
DOM4-130-201	257 нМ
DOM4-130-202	254 нМ

Пример 9.

Идентификация вариантов DOM15-26-555

DOM15-26-588, DOM15-26-589, DOM15-26-591 и DOM15-26-593 анализировали более подробно вместе с их родительским антителом и двумя дополнительными dAb, DOM15-26-594 и DOM15-26-595, которые были созданы посредством мутагенеза с целью объединения мутаций, которые могли бы оказывать наибольшее влияние на эффективность и стабильность (E6V и F100S/I). Последовательности представлены на фиг. 12. Клоны сравнивали на ВІАscore в отношении связывания с hVEGF при концентрации dAb 100 нМ после инкубации с трипсином в концентрации 200 мкг/мл. Реакцию осуществляли в течение 3 и 24 ч при 37°C с перемешиванием (250 об/мин). Кривые ВІАscore для самого лучшего клона DOM15-26-593 и родительского антитела представлены на фиг. 13. Другие результаты представлены в виде диаграммы на фиг. 14. Эти результаты ясно показывают, что все варианты более устойчивы, чем родительское антитело, к протеолизу после 24-часовой обработки трипсином.

Устойчивость к трипсину DOM15-26-593 и родительского антитела также исследовали, анализируя обработанные и необработанные образцы на SDS-PAGE. Кратко, белки подвергали замене буфера на PBS и концентрировали до 1 мг/мл. 25 мкг белка смешивали с 1 мкг трипсина со степенью чистоты "для секвенирования" (Promega) и инкубировали в течение 0, 1, 3 и 24 ч при 30°C. После этого реакцию блокировали полным набором ингибиторов протеаз от Roche (1X) и DTT, а также добавляли агент для нанесения образцов. Образцы денатурировали в течение 5 мин при 100°C. 15 мкг каждого образца наносили на гели Novex 10-20% Trisine и белки окрашивали с помощью SureBlue (1x). Результаты представлены на фиг. 15. Профиль устойчивости к трипсину для DOM15-26-593 в этом эксперименте отличался от профиля, продемонстрированного ВІАscore экспериментом, подтверждая тот факт, что различия в условиях реакции могут оказывать влияние на конечный результат расщепления трипсином. Тем не менее, DOM15-26-593 имеет лучшие биофизические свойства, а также аффинность, чем другие селектированные клоны, как показано ниже. Краткий обзор свойств вариантов DOM15-26-555 также представлен ниже в табл. 12.

Таблица 12

	Свойство					
	SEC-MALLS		DSC	RBA	ВІАscore	Стабильность в присутствии трипсина
dAb	% мономера	Рассчит. MW	Tm, °C	нМ	K _D , нМ	% связывания при +24 ч
15-26	0	37-136	64	10	28,2	30
15-26-501	0-40	18-290	51	1,14	9,1	5
15-26-555	0	28-78	63	11,7	26,1	10
15-26-588	10	33	70	27	59,1	15
15-26-589	90	17	63	1,94	9,6	65
15-26-591	20	21-234	63	16	38	35
15-26-593	80	17	65	0,323	3,2	80
15-26-595	60	17	65	0,828	5	70

Пример 10.

Идентификация вариантов DOM15-10

DOM15-10-11 анализировали более подробно вместе с его родительским вариантом DOM15-10. Последовательности представлены на фиг. 16. dAb сравнивали на ВІАscore в отношении связывания с

hVEGF при концентрации dAb 100 нМ после инкубации с трипсином в концентрации 200 мкг/мл. Реакцию осуществляли в течение 1, 3 и 24 ч при 37°C с перемешиванием (250 об/мин). Кривые ВІАсоге для этих dAb представлены на фиг. 17. Результаты ясно показывают, что селектированный вариант более устойчив к протеолизу, чем родительское антитело, после 24-часовой обработки трипсином.

Устойчивость к трипсину основной молекулы и родительского антитела также проверяли посредством анализа обработанных и необработанных образцов на SDS-PAGE. Кратко, белки подвергали замене буфера на PBS и концентрировали до 1 мг/мл. 25 мкг белка смешивали с 1 мкг трипсина со степенью чистоты "для секвенирования" (Promega) и инкубировали в течение 0, 1, 3 и 24 ч при 30°C. После этого реакцию блокировали полным набором ингибиторов протеаз от Roche (1X) и DTT, а также добавляли агент для нанесения образцов. Образцы денатурировали в течение 5 мин при 100°C. 15 мкг каждого образца наносили на гели Novex 10-20% Trisine и белки окрашивали с помощью SureBlue (1x). Результаты представлены на фиг. 185. В этом случае профиль устойчивости к трипсину хорошо коррелирует с результатами ВІАсоге теста с использованием трипсина, показывая, что связывающая активность непосредственно отражает целостность белка.

Пример 11.

Дополнительная характеристика вариантов DOM15-26-555 и DOM15-10

dAb анализировали с использованием дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) для того, чтобы определить, коррелирует ли увеличение устойчивости к трипсину с увеличением T_m . Результаты представлены в табл. 13. Имеется корреляция между устойчивостью к трипсину вариантов DOM15-26-555 и температурой плавления. Основные молекулы DOM15-26-588 и DOM15-26-593 демонстрируют улучшенные T_m , а другие клоны нет. Важно отметить, что обе родительские молекулы DOM15-26-555 и DOM15-10 имеют гораздо более высокие T_m (63,3-63,7°C) на старте, чем родительские молекулы DOM4-130-54 и DOM1h-131-511 (T_m на старте: 57,9-54,1°C), но в целом протеазоустойчивые клоны достигают значений T_m в аналогичном диапазоне (средняя T_m 65,1°C для вариантов DOM1h-131-511/DOM4-130-54 и средняя T_m 64,9°C для вариантов DOM15-26-55/DOM15-10).

Таблица 13

Название	T_m , °C
DOM15-26-555	63,3
DOM15-26-588	70,1
DOM15-26-589	63
DOM15-26-591	63
DOM15-26-593	65
DOM15-10	63,7
DOM15-10-11	63,3

Эти dAb также сравнивали в анализе связывания с рецептором и осуществляли измерения кинетики на ВІАсоге для того, чтобы определить, приводит ли увеличение стабильности в присутствии трипсина к уменьшению эффективности. Однако активность dAb в данном анализе оказалась по существу незатронутой или даже улучшенной. Результаты представлены в табл. 14.

Таблица 14

Клон (ID)	EC ₅₀ (нМ)	K _D (нМ)
DOM15-26-555	11,7	26,1
DOM15-26-588	27	59,1
DOM15-26-589	1,94	9,6
DOM15-26-591	16	38
DOM15-26-593	0,323	3,2
DOM15-26-594	4,09	15,1
DOM15-26-595	0,828	5
DOM15-10	10,23	23,6
DOM15-10-11	3,58	14,6

Преимущества увеличенной T_m

Большинство белков, включая доменные антитела, существуют в двух состояниях: свернутом состоянии (результатом которого является биологически активная молекула) и развернутом состоянии (которое не связано с функциональной активностью). Эти два состояния сосуществуют при всех температурах, и относительная доля каждого состояния обычно определяется константой K, которая является функцией кинетических констант сворачивания и разворачивания. Температуру плавления обычно определяют как температуру, при которой K=1, т.е. температуру, при которой доля свернутого белка равна доле развернутого белка. Константа K определяется стабилизирующими и дестабилизирующими внутримолекулярными взаимодействиями в белке и поэтому в первую очередь определяется аминокислотной последовательностью белка. Внешние параметры, такие как температура, pH, состав буфера, давление,

вливают на К и таким образом на температуру плавления.

Развернутые белки являются удобными мишенями для механизмов деградации: (1) экспонирование дисульфидных связей увеличивает риск окисления или восстановления в зависимости от обстоятельств, (2) повышенная гибкость скелета благоприятствует реакциям аутопротеолиза, (3) экспонирование пептидных сегментов делает их мишенями для протеаз *in vivo*, для протеаз во время способов получения и для переноса протеаз на следующие стадии обработки и длительного хранения и (4) экспонирование склонных к агрегации сегментов приводит к внутримолекулярной агрегации и осаждению белка. Во всех случаях происходит потеря целостности белка, содержания белка и активности белка, ставя под сомнение попытки, направленные на (1) обеспечение воспроизводимости партий, (2) обеспечение стабильности при хранении в течение длительного времени и (3) обеспечение эффективности *in vivo*.

В природе белки под действием эволюции были сконструированы таким образом, чтобы адекватно функционировать при температуре тела и чтобы без труда замещаться посредством механизмов гомеостаза. Терапевтические белки, полученные в биотехнологическом процессе, сталкиваются с другим окружением: их часто продуцируют с использованием технологии рекомбинантной ДНК в чужеродном хозяине и экспрессируют в большем количестве в больших сосудах, подвергают очень важным изменениям pH или состава буфера в последующих процессах и, наконец, хранят в высоких концентрациях в нефизиологических буферах в течение длительного периода времени. Новые способы доставки (например, ингаляция, пластырь для подкожного введения, наночастицы для замедленной доставки) также оказывают дополнительное стрессовое воздействие на терапевтические белки. В конце концов, введение методов белковой инженерии привело к получению улучшенных или полностью новых терапевтических белков. Поскольку большая часть методов инженерии представляет собой методы *in vitro*, направленные на изменение или создание новых аминокислотных последовательностей, то эволюционные процессы, которые постепенно улучшали биологические белки, не происходят, что приводит к получению белков с субоптимальными характеристиками в отношении устойчивости к стрессу.

Способ по настоящему изобретению направлен на воспроизведение одного из условий, с которыми сталкиваются белки в ходе дарвиновской эволюции. Пептиды или полипептиды, например иммуноглобулиновые единичные переменные домены, "заселены" протеазами, которые играют главную роль в ремоделировании ткани и белковом гомеостазе. Любую конкретную мутацию, которая может приводить к образованию белка с улучшенным соответствием его функции, также тестируют на ее способность соответствовать окружению, в котором белок функционирует. Этот процесс воспроизводят в одном из воплощений настоящего изобретения: создают репертуар пептидных или полипептидных вариантов и подвергают воздействию протеазы. На второй стадии репертуар вариантов приводят в контакт со специфической мишенью. Только те варианты белка, которые оказались устойчивыми к деградации протеазой, способны взаимодействовать с мишенью и поэтому извлекаются, например, в простом процессе аффинной очистки, названном "биоэ́ннинггом". Данная система предлагает ряд преимуществ по сравнению с процессами *in vivo*: репертуар белков может столкнуться с более широким диапазоном условий, например, с набором протеаз в более высоких концентрациях, в течение более длительных периодов времени, в различных буферах или pH и при различных температурах. Таким образом, такая технология *in vitro* предлагает средства для конструирования белков, которые могут функционировать и оставаться стабильными в более широком диапазоне условий окружающей среды, чем те условия, из которых они происходят. Ясно, что это дает значительные преимущества для биотехнологической промышленности и для области терапевтических белков, в частности.

Пример 12.

РК корреляционные данные для протеазоустойчивых основных молекул

Родительское dAb и протеазоустойчивое dAb в каждой из четырех линий dAb затем оценивали *in vivo* (перечень и подробности см. в табл. 15).

Таблица 15

Линия	dAb (ID)	Устойчивость к трипсину	T _m (°C)	Активность (нМ)	ID Fc слияния
DOM4-130	DOM4-130-54	Хорошая	54	0,128*	DMS1541
	DOM4-130-202	Очень высокая	64	0,160*	DMS1542
DOM1h-131	DOM1h-131-511	Хорошая	57	0,048†	DMS1543
	DOM1h-131-206	Очень высокая	64	0,047†	DMS1544
DOM15-10	DOM15-10	Низкая	64	0,913†	DMS1546
	DOM15-10-11	Высокая	63	0,577†	DMS1531
DOM15-26	DOM15-26-501(*)	Низкая	52	0,330†	DMS1545
	DOM15-26-593	Высокая	65	0,033†	DMS1529

*: по данным биоанализа с использованием MRC5/IL-a;

†: по данным RBA-анализа.

Примечание: DOM15-26-501 является родительским вариантом DOM15-26-555, приведенным в качестве примера в настоящем патенте. DOM15-26-555 имеет одну герминальную аминокислотную мутацию в CDR1 (I34M). DOM15-26-501 характеризуется более низкой температурой плавления, чем DOM15-26-555 (52°C по сравнению с 63,3°C), и повышенной чувствительностью к перевариванию трип-

сином. DOM15-26-501 выбрали относительно DOM15-26-555 для РК исследования, поскольку оно является более типичным в отношении плохой стабильности по сравнению с DOM15-26-593.

Авторы изобретения истолковывают устойчивость следующим образом:

- 1 низкая,
- 2 средняя,
- 3 хорошая,
- 4 высокая,
- 5 очень высокая.

Тогда это означает, что устойчивость к трипсину родительских молекул является следующей:

DOM4-130-54 хорошая,
 DOM1h-131-511 хорошая,
 DOM15-10 низкая,
 DOM15-26-501 низкая.

Для селективированных основных молекул:

DOM4-130-202 очень высокая,
 DOM1h-131-206 очень высокая,
 DOM15-10-11 высокая,
 DOM15-26-593 высокая.

Поскольку доменные антитела характеризуются небольшим размером (12-15 кДа), они быстро выводятся из кровообращения после в/в (внутривенной) или п/к инъекции. Действительно, предел отсечения при почечной клубочковой фильтрации составляет более чем 50 кДа, и поэтому небольшие белки, такие как dAb, не задерживаются в кровотоке, поскольку они проходят через почки. Поэтому для того, чтобы оценить долговременные эффекты устойчивости к протеазам *in vivo*, авторы изобретения метили доменные антитела группировкой, которая увеличивает пребывание в системе кровообращения. Некоторые подходы (например, ПЭГ, слияния с Fc, слияния с альбумином и т.д.), направленные на увеличение периода полувыведения, известны из литературы. В настоящем изобретении доменные антитела были помечены (или форматированы) Fc-областью IgG1 антитела человека. Этот формат обеспечивает два преимущества: (1) молекулярный размер полученных dAb-Fc составляет приблизительно 75 кДа, что является достаточным для обеспечения удержания в кровотоке, (2) Fc-группировка антитела связывается с FcRn рецептором (также известным как рецептор Брамбелла). Этот рецептор локализуется на эпителиальных клетках, эндотелиальных клетках и гепатоцитах и вовлечен в пролонгирование продолжительности жизни антител и альбумина: действительно, после пиноцитоза антител и других сывороточных белков, белки направляются в подкисленную эндосому, где FcRn рецептор перехватывает антитела (посредством связывания с Fc-областью) перед переносом в эндосому и возвращает их в кровоток. Таким образом, посредством мечения dAb Fc-областью обеспечивается присутствие dAb в течение более длительного периода времени по меньшей мере в двух компартментах - сыворотке и презэндосомальных компартментах, каждый из которых содержит специфический набор протеолитических ферментов. В дополнение к этому, FcR рецептор опосредует трансцитоз, посредством чего Fc-несущие белки мигрируют во внесосудистое пространство и из внесосудистого пространства.

Форматирование с использованием Fc осуществляли посредством слияния гена, кодирующего VH и VK dAb, с геном, кодирующим Fc IgG1 человека, через короткий промежуточный пептидный линкер (выделенный жирным шрифтом):

Для VH dAb (подчеркнуто):

EVQ.....GQGTLVTVSSASTHTCPPCPAPELLGGP...(hlgG1Fc)...PGK*

Для VK dAb (подчеркнуто):

DIQ.....GQGTKVEIKRTVAAPSTHTCPPCPAPELLGGP...(hlgG1Fc)...PGK*

Материал получали путем временной трансфекции клеток HEK293/6E, используя 293-фектин (Invitrogen) в соответствии со стандартными протоколами. Эти клетки разработаны для высоких уровней временной экспрессии при их использовании вместе с векторами серий рТТ (Durocher et al., 2002). Таким образом, гены dAb клонировали в модифицированный вектор рТТ5 (рДОМ38) с целью создания вектора, экспрессирующего слияние с Fc (см. фиг. 21).

Супернатант от трансфицированных клеток собирали на 5-е сутки после трансфекции, осветляли центрифугированием и фильтровали через 0,2 мкм фильтр. Слитые белки dAb-Fc очищали путем захвата на смоле Protein-A streamline (GE Healthcare). Белок элюировали с колонки в 10 мМ цитрате натрия, рН 3, с последующим добавлением 1 М цитрата натрия, рН 6, для достижения конечного содержания цитрата натрия 100 мМ (рН 6).

Молекулы dAb-Fc тестировали в отношении периода полувыведения *in vivo* на крысах в целевой дозе 5 мг/кг для самок крыс Sprague-Dawley (n=3 на одну группу). Необходимо отметить, что целевая доза значительно превышает целевую концентрацию у крыс, поэтому ожидают, что различия в аффинностях между родительскими dAb и устойчивыми к трипсину dAb (см. пример 11) не будут влиять на судь-

бу молекул *in vivo*. Следовательно, ожидают, что различия в PK профилях между dAb будут отражать независимый от антигена процесс элиминации.

Образцы крови отбирали через 0,03, 1, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120 и 168 ч после введения. После образования сгустка сыворотку извлекали и затем тестировали в анализах захвата антигена hIL-1R1, TNFR1 или VEGF.

Анализы захвата антигена hIL-1R1:

покрывают с использованием 4 мкг/мл анти-hIL-1R1;

блокируют;

добавляют 500 нг/мл shIL-1R1;

добавляют образцы;

определяют с использованием анти-(Fc человека)-HRP в разведении 1:10000.

Анализы захвата антигена TNFR1:

покрывают с использованием 0,1 мкг/мл sTNFR1;

блокируют;

добавляют образцы;

определяют с использованием анти-(Fc человека)-HRP в разведении 1:10000.

Анализы захвата антигена VEGF:

покрывают с использованием 0,25 мкг/мл VEGF;

блокируют;

добавляют образцы;

определяют с использованием анти-(Fc человека)-HRP в разведении 1:10000.

Необработанные данные этих анализов преобразовывали в концентрации лекарственного средства в каждом образце сыворотки. Средние значения в мкг/мл для каждой временной точки затем анализировали в WinNonLin с использованием некомпартментного анализа (NCA). PK профили для каждой пары dAb-Fc представлены в табл. 16, в которой суммированы определенные PK параметры.

Таблица 16

ID	dAb	Период полувыведения (ч)	AUC/D (0-inf) (ч·мкг/мл)/(мг/кг)	% AUC экстраполир.
DMS1541	4-130-54	93,2	691,5	22,7
DMS1542	4-130-202	176,8	710,1	49
DMS1543	1h-131-511	140,8	1807,5	40
DMS1544	1h-131-206	158,6	2173,0	43,6
DMS1546	15-10	43,2	324,6	3,8
DMS1531	15-10-11	56,6	770,5	не опред.
DMS1545	15-26-501	12,9	89	5,1
DMS1529	15-26-593	86,2	804,7	21,0

Данные результаты ясно показывают, что, хотя PK профили для dAb-Fc пар с 4-130-54 по 1h-131-206 почти совпадают при наложении, профили для других пар широко варьируют. Данные эффекты обычно видны, когда рассматривают AUC/D: AUC/D для 15-10 составляет только 42% от AUC/D для 15-10-11. AUC/D для 15-26-501 составляет только 11% от AUC/D для 15-26-593. Эти важные различия также влияют (в меньшей степени) на периоды полувыведения: 43,2 ч против 56,6 ч соответственно для 15-10 и 15-10-11. Большее различие наблюдается для линии DOM15-26: 12,9 ч против 86,2 ч соответственно для 15-26-501 и 15-26-593. Действительно, для проведения хорошего PK анализа с использованием некомпартментного анализа необходимо использовать по меньшей мере 4 точки на графике для подгонки угла наклона линейной регрессии, и период времени, в течение которого оценивают период полувыведения, должен быть по меньшей мере в 3 раза больше, чем рассчитанный период полувыведения.

В свете биофизических свойств, описанных в разделе "Примеры" в данном изобретении, видно, что способность любого заданного dAb противостоять расщеплению трипсином коррелирует со способностью продукта слияния dAb-Fc циркулировать в течение более продолжительного периода времени в сыворотке крыс. Действительно, как показано в примерах, например, в примере 10, DOM15-10 и DOM15-26-501 представляют собой наиболее расщепляемые dAb: инкубация 25 мкг dAb в присутствии 1 мкг трипсина при 30°C в течение приблизительно 3 ч приводит к полному расщеплению. Все другие dAb в этом исследовании (независимо от того, были ли они селективированы с использованием трипсина (т.е. DOM15-10-11, DOM15-26-593, DOM4-130-202 и DOM1h-131-206) или уже обладали некоторой устойчивостью к трипсину как родительские молекулы (DOM4-130-54 и DOM1h-131-511)) имели сопоставимый PK профиль у крыс при реформатировании в молекулы dAb-Fc. Таким образом, настоящее исследование позволяет предположить, что чувствительность к протеолизу оказывает наибольшее влияние на стабильность dAb *in vivo* в случае, когда такие dAb обладают очень низкой устойчивостью к протеолизу. Оно также показывает, что, при достижении определенного уровня, дальнейшее возрастание устойчивости к расщеплению трипсином (например, DOM4-130-206 по сравнению с DOM4-130-54) существенно

не увеличивает способность молекулы dAb-Fc дополнительно снижать скорость элиминации *in vivo*.

В трех случаях селекция в присутствии трипсина приводила к получению новых молекул с повышенной термостабильностью (определенной по температуре плавления): DOM4-130-202, DOM1h-131-206 и DOM15-26-593. PK исследования показывают, что - в соответствии с представленным набором данных - температура плавления не является адекватным параметром для объяснения наблюдаемых PK профилей: действительно, DOM15-10 имеет более высокую T_m , чем DOM15-10-11, однако быстрее выводится из кровотока, чем DOM15-10-11. В другом случае, два dAb из линии DOM4-130 имеют заметно различающиеся T_m (на 10°C), однако демонстрируют почти идентичную стабильность *in vivo* при формировании в молекулы dAb-Fc. Следует отметить, что температуру плавления саму по себе не исключают в качестве ключевого параметра для предсказания стабильности *in vivo*. Так получилось, что в соответствии с представленным набором данных большие различия в T_m (от 54°C и выше) не оказывают значительного влияния на судьбу dAb *in vivo*. Это не исключает возможности того, что при температуре плавления ниже 54°C стабильность dAb *in vivo* будет коррелировать с термостабильностью или, возможно, и с термостабильностью, и с устойчивостью к протеазам.

Пример 13.

Селекции DOM10-53-474 в присутствии трипсина

Стабильность очищенного DOM10-53-474 в присутствии трипсина

DOM10-53-474 представляет собой доменное антители, которое связывается с IL-13 с высокой эффективностью. Для оценки стабильности этого dAb в присутствии трипсина очищенное dAb переваривали трипсином в течение увеличивающихся периодов времени и наносили на гель для исследования любой возможной деградации белка. 25 мкл очищенного DOM10-53-474 в концентрации 1 мг/мл инкубировали с 1 мкл трипсина с чистотой "для секвенирования" в концентрации 1 мг/мл при 30°C, что соответствовало молекулярному соотношению dAb:трипсин 25:1. dAb инкубировали с трипсином в течение 1, 4 и 24 ч, и протеазную активность нейтрализовали путем добавления 4 мкл полного набора ингибиторов протеаз от Roche с последующей инкубацией на льду. Образец, соответствующий моменту времени 0, готовили путем добавления ингибиторов протеаз к dAb без добавления трипсина. 2 мкл образца затем анализировали посредством электрофореза с использованием Labchip в соответствии с инструкциями производителя.

На фиг. 22 показаны результаты гель-электрофореза DOM10-53-474, инкубированного с трипсином в течение увеличивающихся периодов времени. Для сравнения, одно из стабильных в присутствии трипсина dAb, DOM15-26-593, также обрабатывали трипсином, как описано выше, и анализировали параллельно. Как видно на фигуре, DOM15-26-593 выглядит стабильным даже через 24 ч инкубации с трипсином. Однако DOM10-53-474 расщепляется в некоторой степени через 24 ч, но выглядит стабильным во временные точки 1 ч и 4 ч. Эти данные позволяют предположить, что DOM10-53-474 устойчив к расщеплению трипсином в некоторой степени, но не настолько стабилен, как наиболее стабильные в присутствии трипсина dAb DOM15-26-593.

Стабильность экспонируемого на фаге DOM10-53-474 в присутствии трипсина

Для оценки стабильности экспонируемого на фаге DOM10-53-474 в присутствии трипсина, ген, кодирующий DOM10-53-474, клонировали в рDOM33 по сайтам Sal/Not (фиг. 50) и фаг получали в соответствии со стандартными методиками. Фаг очищали посредством ПЭГ-преципитации, ресуспендировали в PBS и титровали.

Для оценки устойчивости к трипсину экспонируемые на фагах dAb инкубировали с трипсином в течение различных периодов времени. После инкубации с трипсином определяли стабильность посредством анализа титрованием после инфицирования клеток *E.coli* TG1, находящихся в экспоненциальной фазе роста.

100 мкл фага инкубировали в присутствии 100 мкг/мл трипсина в течение 1, 2, 4 ч и в течение ночи при 37°C в инкубаторе при встряхивании. Активность трипсина блокировали полным набором ингибиторов протеаз от Roche ($\times 2$), затем фаг разбавляли в 2% Marvell в PBS, инкубировали с 10 нМ биотинилированного IL-13 в течение 1 ч при комнатной температуре. Добавляли покрытые стрептавидином гранулы (Dynabeds M-280 (Invitrogen)), предварительно заблокированные в течение 1 ч при комнатной температуре с использованием 2% Marvell в PBS, и смесь затем инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Все стадии инкубации с Dynabeds осуществляли на вращающемся диске. Несвязавшийся фаг отмывали путем промывки гранул восемь раз 1 мл 0,1% Tween-20 в PBS. Связавшийся фаг элюировали, используя 0,5 мл 0,1 М глицина, pH 2,2, и нейтрализовали 100 мкл 1 М трис-HCl, pH 8,0. Элюированный фаг использовали для инфицирования клеток TG1, находящихся в экспоненциальной фазе роста (1 ч при 37°C), и высевали на чашки с тетрациклином. Чашки инкубировали в течение ночи при 37°C и осуществляли подсчет колоний. Титры выхода фага после переваривания трипсином суммированы в табл. 17. Титры фага уменьшались при инкубации с трипсином в течение увеличивающихся периодов времени. Через 24 ч инкубации все фаги переварились.

Таблица 17

Титры продуктов селекции в присутствии трипсина, проведенной на экспонируемом на фаге родительском DOM10-53-474

Длительность инкубации с трипсином	Концентрация трипсина	Титр
Контроль без трипсина	-	3×10^7
1 ч	100 мкг/мл	1×10^7
2 ч	100 мкг/мл	7×10^6
4 ч	100 мкг/мл	5×10^6
В течение ночи	100 мкг/мл	0

Селекция dAb, более устойчивых к трипсину

Для селекции dAb, которые более устойчивы к расщеплению трипсином, в ген, кодирующий DOM10-53-474, вводили случайные мутации посредством ПЦР с использованием набора Stratagene Mutazyme II, биотинилированных праймеров и 5-50 пг матрицы для 50 мкл реакционной смеси. После переваривания с использованием Sall и NotI вставки очищали от непереваренных продуктов, используя покрытые стрептавидином гранулы, и лигировали в pDOM33 по соответствующим сайтам. Клетки E.coli TB1 трансформировали очищенной смесью для лигирования, получая в результате допускающую ошибки библиотеку DOM10-53-474. Размер библиотеки составлял $1,9 \times 10^9$, а частота аминокислотных мутаций составляла 1,3.

Три раунда селекции осуществляли с использованием этой библиотеки для селекции dAb с улучшенной устойчивостью к протеазам. Первый раунд селекции осуществляли только с антигеном без обработки трипсином для очистки библиотеки с целью удаления клонов, которые больше не связывались с антигеном с высокой аффинностью. Селекцию осуществляли в присутствии 10 нМ IL-13. Выходы после первого раунда составляли 2×10^9 по сравнению с исходным количеством фага 6×10^{10} , что указывает на то, что большая часть библиотеки связывается с антигеном с высокой аффинностью.

Второй и третий раунды селекции осуществляли в присутствии 1 нМ биотинилированного IL-13. Перед пэннингом на IL-13 фаг инкубировали с 100 мкг/мл трипсина при 37°C в шейкере (250 об/мин). Во втором раунде селекции инкубацию с трипсином осуществляли в течение 1 ч или при комнатной температуре, или при 37°C. Выходы после 2-го раунда селекции представлены в табл. 18.

Таблица 18

Титры выхода фага после второго раунда селекции

Обработка трипсином	Титр
Без обработки	1×10^8
1 ч, комнатная температура	5×10^7
1 ч, 37°C	2×10^7

Выходы фага, полученные во 2-ом раунде селекции с обработкой трипсином в течение 1 ч при 37°C, использовали в качестве исходного количества для 3-го раунда селекции. В 3-ем раунде селекции фаг обрабатывали 100 мкг/мл трипсина, но в течение более длительных периодов времени: 2 ч при 37°C, 4 ч при 37°C, в течение ночи при комнатной температуре или в течение ночи при 37°C. Титры выхода после 3-го раунда селекции суммированы в табл. 19.

Таблица 19

Титры выхода фага после третьего раунда селекции

Обработка трипсином	Титр
Без трипсина	$1,3 \times 10^8$
2 ч при 37°C	$1,9 \times 10^7$
4 ч при 37°C	2×10^6
В течение ночи при комнатной температуре	4×10^7
В течение ночи при 37°C	$2,1 \times 10^6$

Для оценки разнообразия последовательностей осуществляли секвенирование некоторых клонов из каждого выхода селекции после раундов 1, 2 и 3. После первого раунда селекции без обработки трипсином 50% продуктов селекции имели последовательность родительского DOM10-53-474. После 2-го раунда селекции процент родительской последовательности увеличивался до 75%. После 3-го раунда селекции процент родительской последовательности увеличивался до 80%.

Эти данные показывают, что DOM10-53-474 уже устойчив к расщеплению трипсином, и из этих селекций с использованием трипсина может быть отобрано не так много новых клонов. На фиг. 22 показано, что когда трипсином переваривали очищенный белок, тогда DOM10-53-474 не переваривался полностью даже после обработки трипсином в течение ночи. Однако для того чтобы определить, имеются ли в продуктах селекции какие-либо новые клоны, которые более устойчивы к трипсину, чем DOM10-53-474,

продукт 3-й селекции, где фаг обрабатывали трипсином в течение ночи при 37°C, субклонировали в pDOM5. Затем секвенировали сто клонов для поиска устойчивых к трипсину клонов. Среди ста проанализированных клонов только 26 клонов имели новые последовательности, однако ни один из этих клонов не имел мутаций в сайтах расщепления трипсином (лизин или аргинин), что позволяет предположить, что эти клоны не являются более устойчивыми к трипсину, чем DOM10-53-474.

Пример 14.

Улучшения хранения и биофизических свойств, вводимые в основные dAb DOM0101 (анти-TNFR1), посредством селекции фагов в присутствии трипсина

Для улучшения устойчивости к протеазам основной молекулы DOM1h-131-511 осуществляли селекцию фагов в присутствии трипсина, как описано ранее. В соответствии с данным способом получали несколько клонов с улучшенной стабильностью в присутствии трипсина по сравнению с родительской молекулой DOM1h-131-511. Два клон, DOM1h-131-202 и DOM1h-131-206, отобрали для дальнейшей характеристики, поскольку они продемонстрировали наиболее значительное улучшение к действию трипсина. Дальнейшие исследования, которые изложены ниже, показали, что вместе с улучшенной устойчивостью к действию трипсина имеются и другие благоприятные эффекты, главным образом в отношении стабильности молекул к сдвиговой деформации и тепловому стрессу. Эти два параметра являются главными в увеличении стабильности при хранении и длительности хранения биофармацевтических продуктов.

Продуцирование основных dAb DOM0101 в *Pichia pastoris*

Гены, кодирующие первичную аминокислотную последовательность трех основных молекул, использовали для продуцирования секретируемого белка в *Pichia pastoris*. Три синтетических гена (DOM1h-131-511, DOM1h-131-202 и DOM1h-131-206) клонировали в экспрессирующий вектор pPIC-Zα и затем использовали для трансформации двух штаммов *Pichia*, X33 и KM71H. Трансформированные клетки высевали на чашки с возрастающей концентрацией зеоцина (100, 300, 600 и 900 мкг/мл) для селекции клонов с множественными интегратами. Некоторые клоны затем подвергали скринингу в 2-л колбах для идентификации клеточных линий с высоким уровнем экспрессии. Клоны с наилучшим уровнем экспрессии затем использовали для получения материала в 5-л ферментаторах.

Очистка белка и характеристика материала

Для получения материала высокого качества с целью его характеристики и дальнейших исследований стабильности был разработан следующий способ очистки с использованием смолы с индукцией заряда смешанной модальности (Capto MMC) в качестве первичной стадии захвата с последующей анионообменной хроматографией (Q Sepharose). Без какой-либо значительной оптимизации это позволило осуществить извлечение приблизительно 70% экспрессированного dAb с чистотой приблизительно 95%. Данный материал характеризовали в отношении идентичности, используя масс-спектрометрию с электрораспылением, аминоконцевое секвенирование и изоэлектрическое фокусирование, а также анализировали чистоту, используя SDS-PAGE и SEC (гель-фильтрацию).

Идентичность белков

Анализ аминоконцевой последовательности первых пяти остатков каждого белка дал ожидаемый результат (EVQLL..). Масс-спектрометрию осуществляли на образцах белков, в которых была произведена замена буфера на 50:50 H₂O:ацетонитрил, содержащий 0,1% ледяной уксусной кислоты, с использованием C4 Zip-tips (Millipore). Измеренная масса каждого из трех белков находилась в пределах 0,5 Да от теоретической массы на основании первичной аминокислотной последовательности (рассчитанной с использованием средних масс) с учетом разницы масс -2, получаемой в результате образования внутренней дисульфидной связи. IEF использовали для идентификации белков на основании их pI, которые различались для каждого белка.

Чистота белков

Эти три белка наносили на невозстанавливающие SDS-PAGE гели в количествах 1 мкг и 10 мкг в двух повторностях. Во всех случаях наблюдали одну полосу.

Для демонстрации уровней чистоты также осуществляли гель-фильтрацию. При проведении гель-фильтрации (SEC) на колонку G2000 SWXL TOSOH наносили по 100 мкг каждого белка при скорости потока 0,5 мл/мин. Использовали подвижную фазу PBS/10% этанола. Процентное содержание мономеров измеряли по площади под кривой (см. фиг. 23).

Сравнение стабильности DOM1h-131-511, -202 и -206

Оценка стабильности в присутствии протеаз

Стабильность DOM1h-131-511, DOM1h-131-202 и DOM1h-131-206 в присутствии протеаз оценивали посредством BiAcoge™-анализа остаточной связывающей активности после предварительной инкубации в течение определенных периодов времени с избытком протеаз. Приблизительно 1400 RU биотинилированного TNFR1 наносили на чип со стрептавидином (SA). 250 нМ DOM1h-131-511, DOM1h-131-202 и DOM1h-131-206 инкубировали либо только с PBS, либо с 100 мкг/мл трипсина, эластазы или лейкозима в течение 1, 3 и 24 ч при 30°C. Реакцию останавливали путем добавления коктейля ингибиторов протеаз. Затем dAb/протеазные смеси пропускали через чип, покрытый TNFR1, вычитая сигнал ячейки срав-

нения. Поверхность чипа регенерировали перед каждым циклом инъекции, используя 10 мкл 0,1 М глицина, pH 2,2. Фракцию DOM1h-131-511, DOM1h-131-202 и DOM1h-131-206, связавшихся с TNFR1 человека (за 10 с), предварительно инкубированных с протеазами, определяли относительно dAb, связавшегося в отсутствие протеаз. ВІАсоге™-анализы осуществляли при 25°C. Данные ниже получали из трех независимых экспериментов. Гистограмма показывает средние значения, а планки погрешностей указывают на стандартное отклонение результатов (фиг. 24).

Обнаружили, что DOM1h-131-202 и DOM1h-131-206 показали более высокую устойчивость к протеолитическому расщеплению трипсином, эластазой или лейкоцимом по сравнению с DOM1h-131-511. Различие между DOM1h-131-202 и DOM1h-131-206 по сравнению с DOM1h-131-511 наиболее ярко выражено после инкубации в течение 1 ч с трипсином и 3 ч с эластазой или лейкоцимом. Имеется тенденция к тому, что DOM1h-131-206 будет обладать несколько большей стабильностью по сравнению с DOM1h-131-202 в большинстве тестируемых условий.

Термостабильность dAb, определенная посредством DSC

Для определения того, при каком pH основные молекулы обладали наибольшей стабильностью, использовали дифференциальный сканирующий калориметр (DSC) для измерения температур плавления (T_m) каждого dAb в буфере Бриттона-Робинсона. Поскольку буфер Бриттона-Робинсона изготовлен из трех буферных систем (40 мМ каждой из кислот: уксусной, фосфорной и борной), то в одном и том же растворе можно получать pH в диапазоне от 3 до 10. Теоретическую величину pI определяли из первичной аминокислотной последовательности белков. На основании данных DSC обнаружили, что pH, при котором dAb имеют самую высокую внутреннюю термостабильность, составляет: pH 7 для DOM1h-131-202, pH 7-7,5 для DOM1h-131-206 и pH 7,5 для DOM1h-131-511. Во всех последующих исследованиях нагрузок и стабильности для каждого dAb использовали следующие значения pH: для DOM1h-131-202 и DOM1h-131-206 (GSK1995057A) pH 7,0, а для DOM1h-131-511 pH 7,5 в буфере Бриттона-Робинсона. Результаты суммированы в табл. 20.

Таблица 20

Краткий обзор значений pH и T_m для DOM1-131-202, DOM1h-131-206 и DOM1h-131-511, как определено посредством DSC в буфере Бриттона-Робинсона при концентрации 1 мг/мл. Температура изменялась со скоростью 180°C/ч

dAb	pH, который дает наибольшую внутреннюю термостабильность	T_m (°C) dAb при данном pH
DOM1h-131-202	7,0	68,6
DOM1h-131-206	7,0-7,5	65,8
DOM1h-131-511	7,5	58,0

Тестирование термостабильности в течение двух недель

Способность белка выдерживать повышенные температуры в течение длительных периодов времени обычно является хорошим показателем его стабильности. В этих условиях белок может подвергаться различным физическим процессам, таким как агрегация или химическая модификация. dAb (в концентрации 1 мг/мл) инкубировали при 37 и 50°C в течение 14 суток в буфере Бриттона-Робинсона. Для того чтобы определить, сколько мономера осталось в растворе после 14 суток, использовали SEC (фиг. 25).

Из фиг. 25 можно видеть, что и DOM1h-131-202, и DOM1h-131-206 значительно более стабильны, чем DOM1h-131-511, к тепловому стрессу. Воздействие на белки повышенных температур, таких как 37 и 50°C, обычно используют для получения указания относительно продолжительности срока хранения лекарственных средств. Эти повышенные температуры используют для ускорения обычных процессов, связанных с длительным хранением при комнатной температуре, таких как дезамидирование, окисление или агрегация. Уровень образования агрегатов в растворе также можно контролировать с использованием SEC (фиг. 26A-I). После 14 суток при 37°C потеря DOM1h-131-511 из раствора может происходить вследствие как осаждения, так и образования агрегатов более высокого порядка, как определено посредством SEC (фиг. 26B). Значительно меньшая потеря белка также наблюдалась для DOM1h-131-202 и DOM1h-131-206 при 37°C после 14 суток с очень незначительным, или по существу без него, увеличением образования агрегатов, особенно в случае DOM1h-131-206 (фиг. 26H). При 50°C различие между молекулами становится еще более выраженным, причем DOM1h-131-206 демонстрирует лучшую стабильность при повышенной температуре, чем DOM1h-131-202 через 14 суток, что свидетельствует о значительно сниженном образовании агрегатов с более высокой молекулярной массой (фиг. 26). Относительно $t=0$, DOM1h-131-206 демонстрирует лишь небольшое увеличение образования агрегатов через 14 суток (фиг. 26I), в то время как DOM1h-131-511 почти полностью выпадает в осадок из раствора (фиг. 26C).

Это показывает, что изменения, вводимые в dAb посредством селекции с использованием трипсина, например улучшенная термостабильность, значительно улучшили стабильность белка при хранении при 37 и 50°C. Очевидно, что и DOM1h-131-202, и в большей степени DOM1h-131-206 обладают улучшенной стабильностью в растворе и меньшей тенденцией к образованию агрегатов при повышенных температурах, которые могут непосредственно объяснить улучшенную стабильность при длительном хранении при более релевантных температурах, таких как 4°C и комнатная температура.

Образцы, соответствующие временным точкам 24 ч, 48 ч, 7 суток и 14 суток эксперимента с тепловым стрессом, затем анализировали посредством IEF для того, чтобы посмотреть, подвергались ли белки каким-либо биофизическим изменениям, которые могли бы повлиять на общий заряд белка (фиг. 27).

Кроме того, и DOM1h-131-202, и DOM1h-131-206 не показывают никаких существенных изменений при 37°C по сравнению с DOM1h-131-511. Для DOM1h-131-511 слабая вторая полоса появляется через 24 ч при 37°C. Полагают, что образование этой дополнительной полосы происходит вследствие димеризации данного белка, экранирующей таким образом заряд и дающей две популяции молекул. При 50°C различие между молекулами становится более выраженным, DOM1h-131-206 явно не демонстрирует никаких существенных изменений при повышенной температуре, тогда как DOM1h-131-202 демонстрирует некоторые признаки модификации через 24 ч. Большая часть DOM1h-131-511 теряется в результате осаждения через 48 ч в буфере Бриттона-Робинсона.

Временные точки T=0, 7 и 14 сутки при 50°C анализировали в RBA с TNFR-1 для определения функциональности белка после воздействия высоких температур (фиг. 28). В настоящее время этот анализ не является таким чувствительным, как SEC или IEF, при обнаружении едва заметных изменений в молекуле под действием стресса, но он может быть использован для того, чтобы показать, что dAb все же может связываться с антигеном.

Смещение кривой влево для DOM1h-131-511 отражает тот факт, что большая часть dAb потеряна вследствие осаждения. Материал, который остается в растворе, все еще способен связываться с антигеном. Как показано на фиг. 25, большая часть как DOM1h-131-202, так и DOM1h-131-206 способна оставаться в растворе даже после 14 суток. Данные RBA показывают, что весь растворимый белок является все еще функциональным и способен связываться с TNFR1.

Тестирование стабильности при хранении высоких концентраций белков

Осуществляли эксперименты с целью исследования стабильности при хранении при 4°C при очень высоких концентрациях белков, чтобы посмотреть, как каждая молекула функционировала в этих условиях. Все основные dAb концентрировали в центрифужных концентраторах Vivaspin (отсечение 5 кДа) в буфере Бриттона-Робинсона при их наиболее стабильном pH, до концентрации приблизительно 100 мг/мл. Затем образцы в концентрации приблизительно 100 мг/мл оставляли при 4°C на 7 суток и после этого анализировали посредством SEC, чтобы посмотреть, появились ли какие-либо другие физические изменения в образцах в процессе хранения при высоких концентрациях (фиг. 29). Образцы разбавляли до приблизительно 1 мг/мл, после чего анализировали на SEC колонке в 1xPBS/10% этанола (об./об.).

Из SEC кривых можно видеть, что ни DOM1h-131-202, ни DOM1h-131-206 не демонстрируют какого-либо существенного увеличения образования агрегатов через 7 суток, в то время как для DOM1h-131-511 наблюдается уменьшение концентрации мономера приблизительно на 2%.

Доставка основных dAb с помощью небулайзеров

Для токсикологических и клинических исследований на ранних стадиях dAb будут приготавливаться в виде жидкости и доставляться посредством распылительного устройства. В зависимости от устройства (например, ультразвукового, струйного или на основе технологии вибрирующего сита) dAb будет испытывать некоторый сдвиг и тепловой стресс по мере его распыления с образованием аэрозоля с частицами определенного размера. Поскольку и DOM1h-131-202 и -206 имеют более высокую T_m и демонстрируют значительно улучшенную стабильность к тепловому стрессу по сравнению с DOM1h-131-511, все dAb тестировали в двух распылительных устройствах, чтобы понять, как они реагируют на сдвиг/тепловой стресс, индуцируемые в процессе распыления. Как белок из распыляемого аэрозоля, так и оставшееся dAb в устройстве (т.е. в колпачке) затем анализировали посредством SEC для определения степени агрегации, происходящей во время этого процесса.

Все молекулы тестировали в буфере Бриттона-Робинсона при их наиболее стабильном pH. dAb тестировали как в устройстве E-flow Rapid (на основе технологии вибрирующего сита), так и в Pagi LC+ (струйный небулайзер) со временем работы 3,5 мин при концентрации белка 5 мг/мл и распределением частиц по размеру, определенному с использованием Malvern Spraytek. Результаты представлены на фиг. 30. Для хорошей доставки и распределения в глубоких отделах легких идеальный размер частиц составляет менее 5 мкм. Все dAb дают сравнимые уровни размеров частиц, которые составляли менее 5 мкм в буфере Бриттона-Робинсона. Концентрацию dAb в колпачке устройства определяли с помощью измерений A_{280} до и после распыления (данные не показаны). Обнаружили, что концентрация белка не изменялась существенно, что указывает на то, что ни белок, ни разбавитель не распыляются предпочтительно в процессе доставки.

Образцы dAb, распыленные в буфере Бриттона-Робинсона, анализировали посредством SEC для определения того, подвергся ли белок каким-либо физическим изменениям в процессе доставки. На фиг. 31 показано относительное процентное изменение как в колпачке, так и в аэрозоле, как определено посредством SEC. Можно видеть, что и DOM1h-131-202, и DOM1h-131-206 претерпевают относительно небольшие изменения в концентрации мономера относительно DOM1h-131-511. Это демонстрирует, что как DOM1h-131-202, так и DOM1h-131-206, обладающие улучшенными T_m , имеют меньшую предрасположенность к образованию агрегатов в процессе распыления.

На фиг. 32 показаны фактические SEC кривые для DOM1h-131-206 и DOM1h-131-511 в буфере

Бриттона-Робинсона после распыления и продемонстрировано, что относительная потеря мономера (фиг. 31) происходит вследствие образования димеров. Это снова дает дополнительное подтверждающее доказательство для теории, согласно которой более высокая термостабильность, демонстрируемая DOM1h-131-202 и DOM1h-131-206, может предотвращать существенную агрегацию даже в неоптимизированном препаративном буфере.

Для токсикологических исследований и оценки безвредности необходимо обеспечить доставку dAb животному при значительно более высоких уровнях, чем терапевтические дозы, даваемые пациентам. Этого можно достичь только путем использования значительно более высоких концентраций белка и/или посредством доставки dAb в течение пролонгированного периода времени. Поскольку уже было показано, что DOM1h-131-511 образует агрегаты при распылении в концентрации 5 мг/мл в течение 3,5 мин, то DOM1h-131-206 тестировали в концентрации 40 мг/мл в PBS и распыляли, используя Pari LC+ в течение до 1 ч включительно. Образцы из колпачка и аэрозоля отбирали в моменты времени на протяжении всего исследования, чтобы посмотреть, вызывает ли пролонгированное распыление агрегацию dAb вследствие сдвига или теплового стресса, как определяли с помощью SEC и концентрации белка (измерения $A_{280 \text{ нм}}$). В табл. 21 показана концентрация белка dAb как в колпачке, так и в аэрозоле, определенная по A_{280} .

Таблица 21

Измеренная концентрация белка DOM1h-131-206, определенная по величинам поглощения при A_{280} для колпачка и аэрозоля во время распыления dAb в концентрации приблизительно 40 мг/мл с использованием Pari LC+. С учетом ошибок при разведении и погрешности прибора концентрация образца не изменяется после распыления dAb в течение 1 ч

Время (мин)	Образец из колпачка (мг/мл)	Образец из аэрозоля (мг/мл)
1	43,8	43,4
29	44,5	43,5
59	44,6	44,1

Из табл. 21 можно видеть, что концентрация белка существенно не изменялась во время анализа, демонстрируя отсутствие значительной потери белка вследствие агрегации. На фиг. 33 показано, что в течение 1 ч распыления DOM1h-131-206 не образует каких-либо агрегатов более высокого порядка, таких как димеры, как определено посредством SEC. Это ясно демонстрирует, что улучшенные биофизические свойства, которые введены в молекулу посредством селекции с использованием трипсина, существенно увеличивают устойчивость dAb к сдвигу и тепловому стрессу и что это может непосредственно коррелировать с увеличением срока годности при хранении и со способностью распылять белок таким образом, чтобы не образовывались агрегаты более высокого порядка.

Состояние основных dAb в растворе

Поскольку основным путем деградации для всех трех основных dAb, по-видимому, является самоассоциация, приводящая сначала к димеризации, затем к дальнейшей агрегации и в конечном счете к осаждению, эти три основные молекулы исследовали посредством аналитического ультрацентрифугирования (AUC) для определения степени самоассоциации. Белки исследовали с помощью двух способов: седиментационного равновесия и скорости седиментации.

Для способа седиментационного равновесия эти три образца анализировали в трех различных концентрациях, варьирующих от 0,5 до 5 мг/мл, исследуя эффекты центрифугирования при трех различных скоростях вращения ротора. Этим способом определили, что DOM1h-131-511 является стабильным димером (26,1-34,4 кДа), DOM1h-131-202 представляет собой равновесие мономер/димер (22,7-27,8 кДа) с относительно стабильным димерным состоянием в измеренных концентрациях с $K_d=1,3$ мкМ, а DOM1h-131-206 предпочтительно является мономерным (15,4-17,9 кДа) с K_d для ассоциации мономера в димер, равной 360 мкМ.

В способе седиментационного равновесия все образцы продемонстрировали некоторую степень диссоциации при разбавлении. Согласно полученным результатам, представленным на фиг. 34, коэффициент седиментации, измеренный для DOM1h-131-511, является показателем агрегатов более высокого порядка, а смещение пика при разведении указывает на диссоциацию этих агрегатов. Агрегация и диссоциация белка компенсируют друг друга, что может создавать впечатление присутствия стабильного димера, как наблюдали при седиментационном равновесии. Коэффициенты седиментации, измеренные для DOM1h-131-202, являются показателем быстрого динамического равновесия, и поэтому пики мономера и димера не могут быть отделены друг от друга, давая единственный пик с более высоким коэффициентом седиментации, чем соответствующий массе образца. Этот результат согласуется с результатом, полученным способом седиментационного равновесия, а измеренная константа диссоциации равна 1 мкМ. Было установлено, что DOM1h-131-206, имея значение коэффициента седиментации 1,9 s (единиц Сведберга), в большей степени представляет собой мономер, чем другие два образца (2,5 s). Эти данные хорошо согласуются с данными способа седиментационного равновесия. При тех концентрациях, при ко-

торых производили измерения, т.е. при концентрациях приблизительно в 10 раз меньше K_d , равной 360 мкМ, образец предпочтительно является мономером.

Пример 15.

Повышение эффективности dAb DOM15-26-593

Пример повышения эффективности dAb DOM15-26-593 в анализе связывания с рецептором VEGFR2 по сравнению с родительским DOM15-26 представлен на фиг. 40. В этом анализе способность потенциального ингибитора предупреждать связывание VEGF с VEGFR2 измеряют в планшетном анализе. В этом анализе химерную конструкцию VEGFR2-FC наносят на 96-луночный планшет для ELISA и к ней добавляют заданное количество VEGF, который предварительно инкубировали с серией разведений тестируемого dAb. После отмывки несвязавшегося белка определяют количество VEGF, связавшегося с рецептором, используя антитело против VEGF, уровень которого определяют колориметрически. График зависимости "доза-ответ" строят в виде процента ингибирования связывания VEGF в зависимости от концентрации тестируемого вещества. Таким образом, эффективный ингибитор представляет собой такой ингибитор, который в низких концентрациях демонстрирует существенное блокирование связывания лиганда.

Эффективность и период полувыведения слияний с Fc

Терапевтический потенциал VEGF-блокады в лечении опухолей реализуется уже в течение более 30 лет. Хроническая природа рака диктует, что биофармацевтические продукты должны иметь длительный период полувыведения из сыворотки для опосредования их эффектов, и это не согласуется с быстрым клиренсом свободных dAb из кровотока посредством почечной фильтрации. Для оценки применимости dAb к VEGF в качестве антиангиогенных средств для лечения рака основные доменные антитела форматовывели в виде слияний с человеческим Fc IgG1 дикого типа через гибридный линкер с тем, чтобы создать бивалентную молекулу с периодом полувыведения из сыворотки, увеличенным благодаря использованию FcRn-опосредованных путей утилизации антител.

В этом формате Fc-слияния эффективность основного, селектированного с использованием трипсина dAb, DOM15-26-593, сравнивали с исходным родительским dAb (DOM15-26) и чувствительным к трипсину dAb (DOM15-26-501), используя анализ, описанный выше. Результаты представлены ниже в табл. 22.

Таблица 22

Характеристики эффективности (RBA) и периода полувыведения основных молекул на основе DOM15-26 в формате Fc-слияния

dAb	Fc	Эффективность (нМ)	T1/2b (ч)
DOM15-26	hlgG1	0,506	Не опред.
DOM15-26-501	hlgG1	0,323	12,9
DOM15-26-593	hlgG1	0,033	84,6

Из этих результатов можно видеть, что в формате димерного слияния с Fc аффинность и эффективность повышены относительно свободных dAb благодаря эффекту авидности. Очевидно, что увеличение эффективности, полученное для DOM15-26-593 благодаря селекции с использованием трипсина, поддерживается и даже еще более выражено в этом Fc-формате. Кроме того, улучшения термостабильности и стабильности к протеазам объясняют глубокие изменения фармакокинетического поведения данных молекул *in vivo*. Увеличение периода полувыведения (см. фиг. 41) для DOM15-26-593 по сравнению с DOM15-26-501, вероятно, является прямым следствием повышенной стабильности dAb, делающей его более устойчивым к процессам расщепления, которые протекают в эндосомальном компартменте. Поэтому также следует ожидать, что dAb с повышенной стабильностью к протеазам, способны сохраняться в течение более длительного времени и в других биологических компартментах, таких как сыворотка, поверхности слизистых оболочек и компартменты различных тканей, где протеолиз представляет собой активный процесс, вовлеченный в метаболизм биологических молекул.

Фармакокинетические профили клиренса

Фармакокинетические профили клиренса DOM15-26-593 и DOM15-26-501 измеряли после в/в введения DOM15-26-593 и DOM15-26-501 3 крысам в концентрациях 5 мг/кг. Затем измеряли уровни DOM15-26-593 и DOM15-26-501 в сыворотке, используя стандартный ELISA-анализ прямого связывания с VEGF и антитело против Fc человека, поэтому определяли только интактное лекарственное средство в образцах сыворотки. Полный фармакокинетический профиль показан ниже в табл. 23.

Таблица 23

Краткий обзор фармакокинетических параметров слияний DOM15-26 и DOM15-26-593 с Fc у крыс

dAb	Период полувыведения (ч)	Сmax (кг/мл)	AUC (0-inf) (ч*мкг/мл)	Выведение (мл/ч/кг)
DOM15-26-501	12,9	91,4	445,1	11,8
DOM15-26-593	84,6	101,8	3810	1,3

Из этих результатов видно, что DOM15-26-593 имеет значительно улучшенный фармакокинетиче-

ский профиль, например, с увеличенным периодом полувыведения и сниженной скоростью клиренса.

Значительно улучшенные эффективность и фармакокинетические свойства DOM15-26-593 привели к анализу различных других биофизических свойств данного соединения.

Свойства в растворе: анализ посредством SEC-MALLS и AUC

Эксперименты с DOM15-26-593 осуществляли следующим образом.

DOM15-26-593 ведет себя как мономер в растворе при концентрациях до 2,5 мг/мл включительно с рассчитанной молекулярной массой 78-81 кДа, согласующейся с рассчитанной массой интактной молекулы приблизительно 76 кДа (фиг. 42a и 42b).

Свойства, связанные с температурой плавления: анализ посредством DSC

Эксперименты с DOM15-26-593 осуществляли следующим образом.

Повышенная термостабильность dAb, селективного с использованием трипсина (65°C; фиг. 43, средняя панель), сохраняется в Fc-слиянии (64,5°C; фиг. 43, верхняя панель). Для сравнения показана T_m-кривая для dAb DOM15-26-501 (52°C, фиг. 43, нижняя панель).

Стабильность к замораживанию-оттаиванию, тепловому стрессу и компонентам сыворотки

Эксперименты с DOM15-26-593 осуществляли следующим образом.

Свойства стабильности dAb DOM15-26-593 означают, что данное dAb DOM15-26-593 может быть подвергнуто физическому и биологическому стрессу с минимальным влиянием на его способность связываться с VEGF (фиг. 44-47 (A и B)). Например, данную молекулу можно неоднократно размораживать из замороженного состояния в жидком азоте (-196°C) до температуры тела (37°C) (10 циклов) без потери связывающей активности, как определено посредством ELISA (фиг. 44). Эта обработка также не приводила к каким-либо заметным изменениям в агрегированном состоянии молекул, как оценивали посредством традиционной гель-фильтрации (фиг. 45). Другие тесты продемонстрировали, что молекула может быть помещена в диапазон различных температур от -80 до 55°C лишь с незначительным падением антигенсвязывающей активности через 168 ч и только при самой высокой температуре инкубации (фиг. 46). Кроме того, инкубация с сывороткой человека или яванского макака при 37°C в течение 14 суток не вызывала никакой потери антигенсвязывающей способности (фиг. 47A и 47B), как определено посредством связывания VEGF в ELISA.

Эффективность в анализе связывания с рецептором VEGFR2 и

в анализе с использованием клеток HUVEC

Описанные выше анализы связывания с рецептором осуществляли следующим образом.

Описанный выше анализ связывания с рецептором использовали для оценки эффективности Fc-слияний (фиг. 48). Обнаружили, что dAb DOM15-26-593 обладает повышенной эффективностью в этом анализе, в котором устанавливают способность dAb блокировать связывание VEGF с VEGFR2 *in vitro*. Кроме того, эффективность DMS1529 была продемонстрирована в анализе с HUVEC (эндотелиальные клетки пупочной вены человека), в котором измеряют способность антагонистов VEGF блокировать VEGF-стимулированную пролиферацию клеток HUVEC. Количество клеток определяют в конце фиксированного периода инкубации с заданным количеством VEGF и варьирующим количеством тестируемого продукта. Чем больше эффективность антагониста, тем меньше наблюдаемая клеточная пролиферация (фиг. 49).

В этом абзаце приведена нуклеотидная последовательность DOM1h-131-511.

Нуклеотидная последовательность DOM1h-131-511:

```
GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
TCSTGTGCAG CCTCCGGATT CACSTTTGCG CATGAGACGA TGGTGTGGGT CCGCCAGGCT
CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCACAT ATTCCCCGGG TTGGTCAGGA TCCCTTCTAC
GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCAGGACA ATTCCAAGAA CACGCTATAT
CTGCAAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACAGCGGTAT ATTACTGTGC GCTGCTTCCT
AAGAGGGGGC STTGGTTTGA CTA CTACTGGGGT CAGGGAACCC TGGTACCCGT CTCGAGC
```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Иммуноглобулиновый единичный переменный домен против рецептора TNF α 1 типа (TNFR1; p55), содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности DOM1h-131-206 (представленной на фиг. 3).

2. Иммуноглобулиновый единичный переменный домен по п.1, содержащий аспарагиновую кислоту в положении 53, где нумерация соответствует нумерации по Кабату.

3. Иммуноглобулиновый единичный переменный домен по п.1 или 2, содержащий гистидин в положении 91, где нумерация соответствует нумерации по Кабату.

4. Иммуноглобулиновый единичный переменный домен против рецептора TNF α 1 типа (TNFR1; p55) по п.1, содержащий аминокислотную последовательность, которая идентична аминокислотной последовательности DOM1h-131-206 (представленной на фиг. 3).

5. Иммуноглобулиновый единичный переменный домен против рецептора TNF α 1 типа (TNFR1; p55) по п.4, кодируемый последовательностью, которая идентична нуклеотидной последовательности DOM1h-131-206 (представленной на фиг. 19).

6. Иммуноглобулиновый единичный переменный домен по п.1, устойчивый к протеазе, содержащий сайт связывания рецептора TNF α 1 типа (TNFR1; p55), где переменный домен устойчив к протеазе при инкубации с:

(1) концентрацией протеазы (с) по меньшей мере 10 мкг/мл при 37°C в течение промежутка времени (t) по меньшей мере 1 ч или

(2) концентрацией протеазы (с') по меньшей мере 40 мкг/мл при 30°C в течение промежутка времени (t) по меньшей мере 1 ч;

где переменный домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности DOM1h-131-206 (представленной на фиг. 3).

7. Переменный домен по п.6, где протеаза выбрана из трипсина, эластазы, лейкозима и панкреатина.

8. Антагонист рецептора TNF α 1 типа (TNFR1; p55), содержащий иммуноглобулиновый единичный переменный домен против TNFR1 по любому из пп.1-7.

9. Антагонист по п.8, содержащий первый и второй иммуноглобулиновые единичные переменные домены, где каждый переменный домен представляет собой домен по любому из пп.1-5.

10. Антагонист по п.8 или 9, где антагонист содержит мономер указанного единичного переменного домена или гомодимер указанного единичного переменного домена, где указанный переменный домен идентичен аминокислотной последовательности DOM1h-131-206 (представленной на фиг. 3).

11. Антагонист рецептора TNF α 1 типа (TNFR1; p55), имеющий последовательность CDR1, которая по меньшей мере на 99% идентична последовательности CDR1 из DOM1h-131-206 (представленной на фиг. 3), последовательность CDR2, которая по меньшей мере на 99% идентична последовательности CDR2 из DOM1h-131-206, и последовательность CDR3, которая по меньшей мере на 99% идентична последовательности CDR3 из DOM1h-131-206.

12. Антагонист рецептора TNF α 1 типа (TNFR1; p55) по п.11, содержащий иммуноглобулиновый единичный переменный домен, содержащий последовательность CDR1, CDR2 и CDR3 из DOM1h-131-206 (представленную на фиг. 3).

13. Антагонист TNFR1 по любому из пп.8-12 для пероральной доставки, доставки в желудочно-кишечный тракт или легочной доставки.

14. Антагонист TNFR1 по любому из пп.8-12 для лечения и/или профилактики воспалительного состояния.

15. Антагонист TNFR1 по п.14, где указанное воспалительное состояние выбрано из легочного заболевания, псориаза, артрита и воспалительного заболевания кишечника.

16. Антагонист TNFR1 по любому из пп.8-12 для лечения и/или профилактики респираторного заболевания.

17. Антагонист TNFR1 по п.16, где указанное респираторное заболевание выбрано из воспаления легких, хронического обструктивного заболевания легких (ХОЗЛ), астмы, пневмонии, муковисцидоза, интерстициального легочного заболевания, аллергии и легочного воспаления.

18. Обладающий двойной специфичностью лиганд, содержащий переменный домен по любому из пп.1-7.

19. Выделенная или рекомбинантная нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид, содержащий иммуноглобулиновый единичный переменный домен по любому из пп.1-7.

20. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.19.

21. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.19 или вектор по п.20.

22. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуноглобулиновый единичный переменный домен по любому из пп.1-7 или антагонист по любому из пп.8-12 и фармацевтически приемлемый носитель, эксципиент или разбавитель.

23. Иммуноглобулиновый единичный переменный домен по любому из пп.1-7, содержащий константный домен антитела.

24. Антагонист по любому из пп.8-12, содержащий константный домен антитела.

Лидерная последовательность GAS

M L F K S L S K L A T A A A 5101
 TA ATG TTA TTT AAA TCA TTA TCA AAA TTA GCA ACC GCA GCA GCA

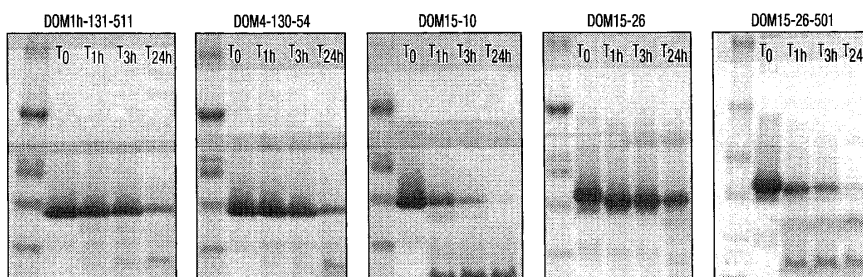
САЙТ МНОЖЕСТВЕННОГО КЛОНИРОВАНИЯ

F F A G V A T A A A A
 TTT TTT GCA GGC GTG GCA ACA GCG TCG ACA CA CTGCAG GAG GCG GCC GCA
 Sall PstI NotI

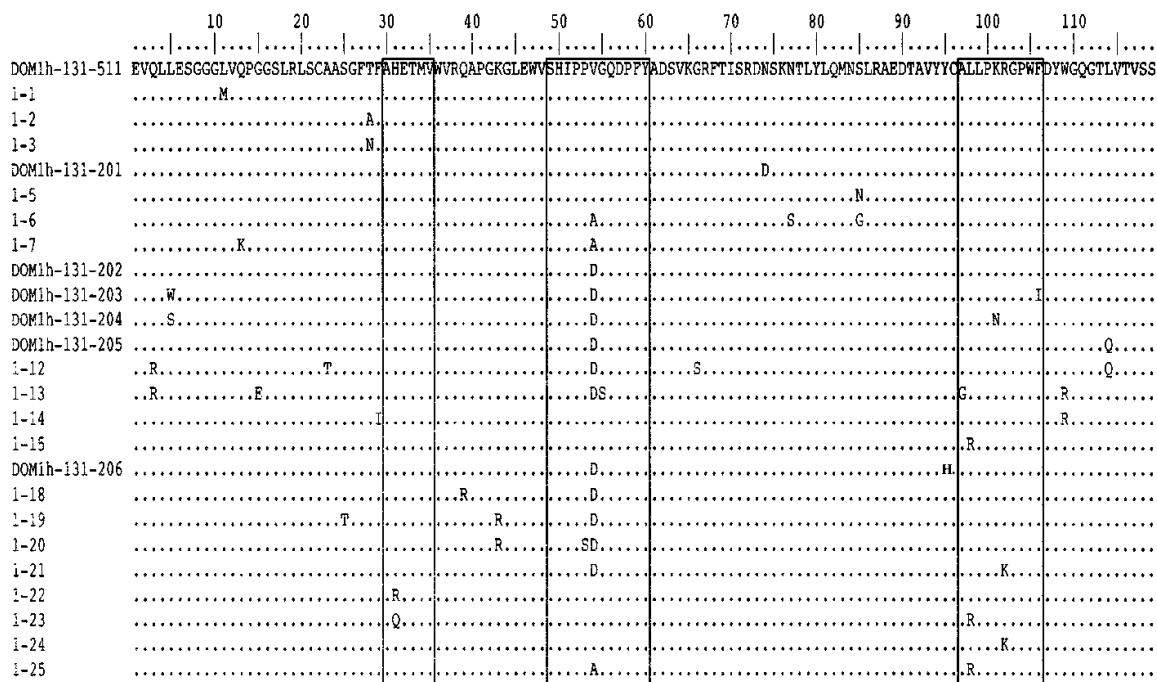
Последовательность гена III

E T V E S -
 GAA ACT GTT GAA CGT ---

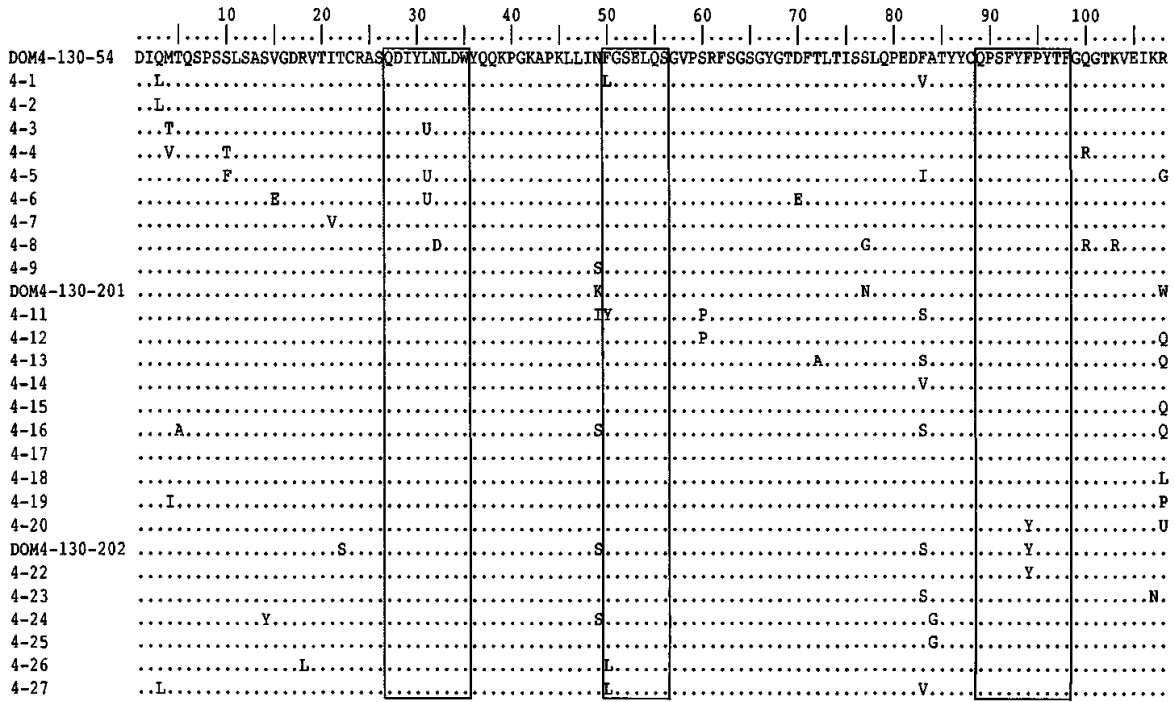
Фиг. 1



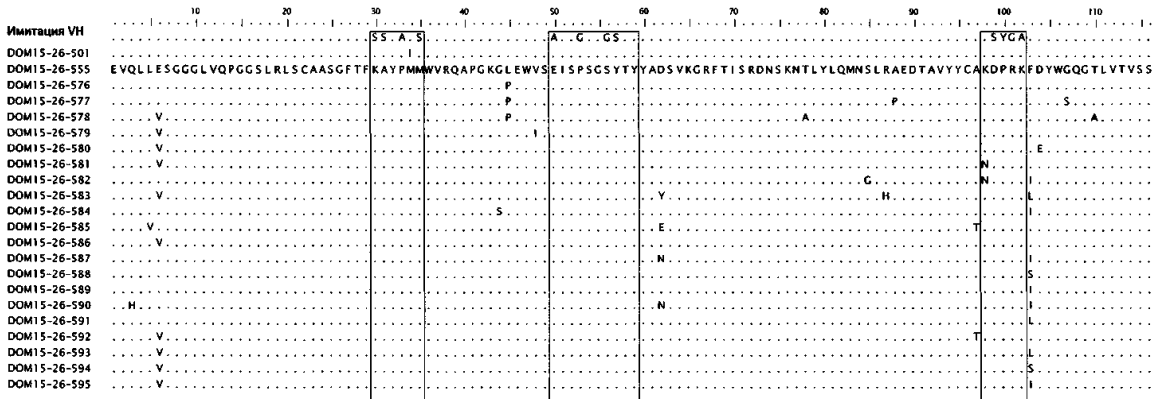
Фиг. 2



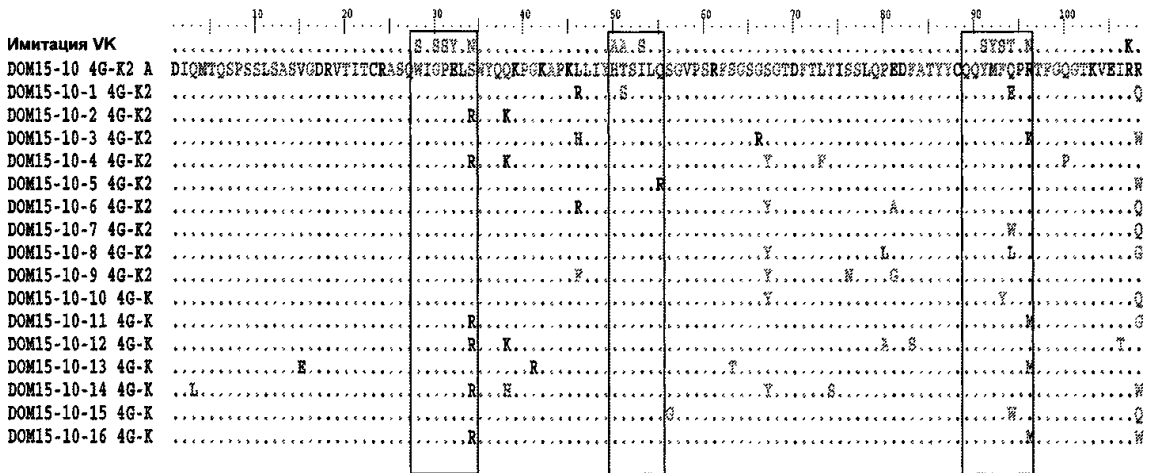
Фиг. 3



Фиг. 4

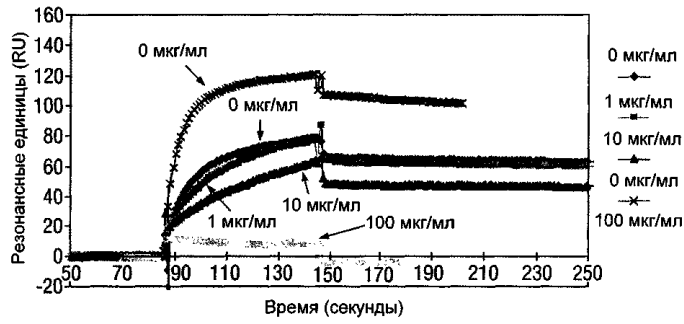


Фиг. 5



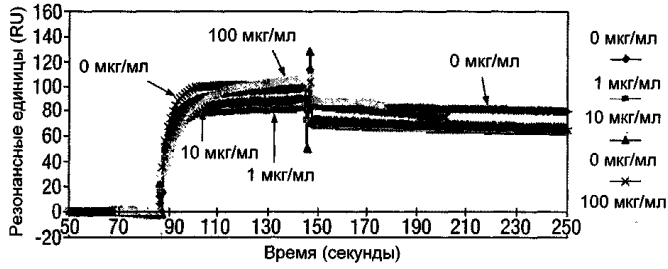
Фиг. 6

DOM1h-131-511
100 мкг/мл трипсин - 1 ч



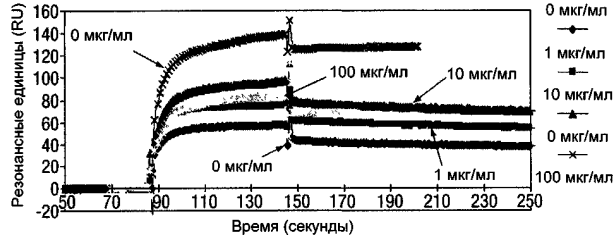
Фиг. 7А

DOM1h-131-203
100 мкг/мл трипсин - 1 ч



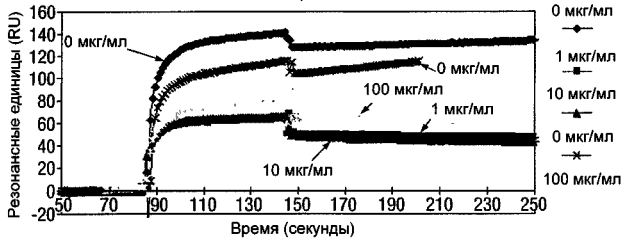
Фиг. 7В

DOM1h1-131-204
100 мкг/мл трипсин - 1 ч

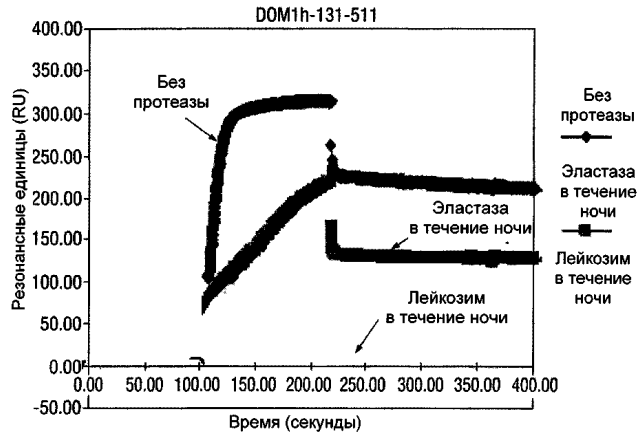


Фиг. 7С

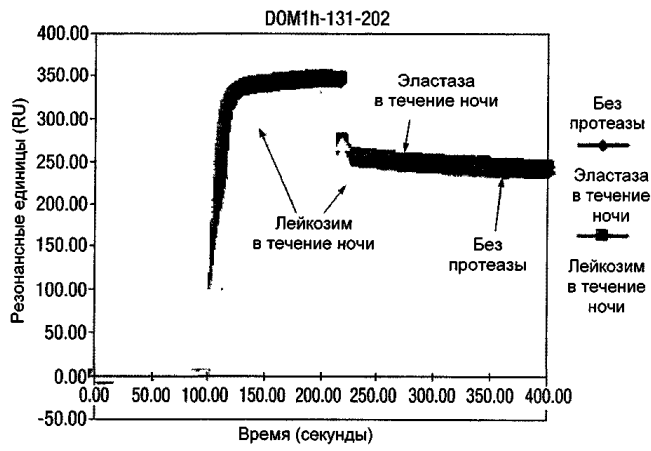
DOM1h1-131-206
100 мкг/мл трипсин - 1 ч



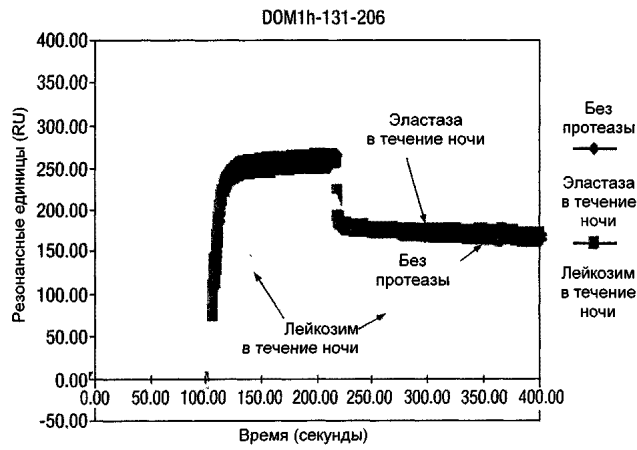
Фиг. 7D



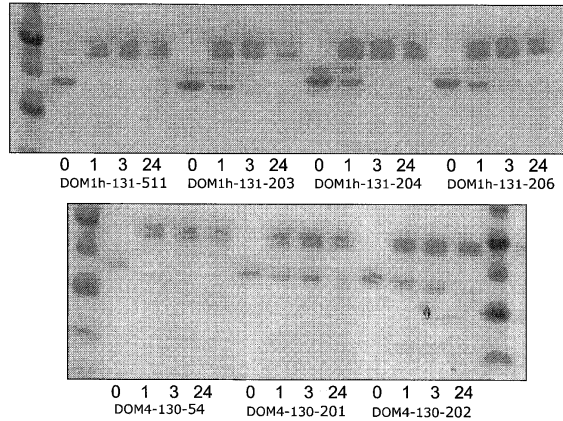
Фиг. 8А



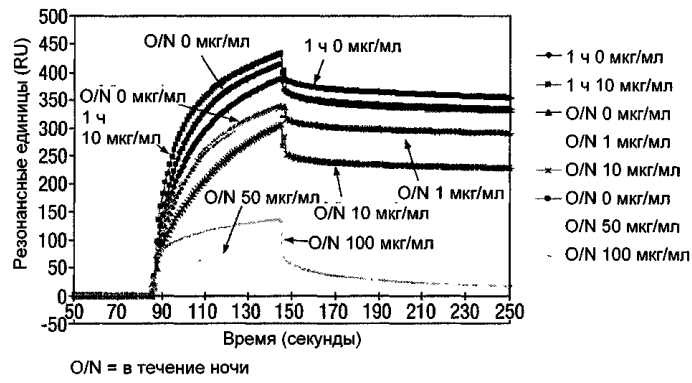
Фиг. 8В



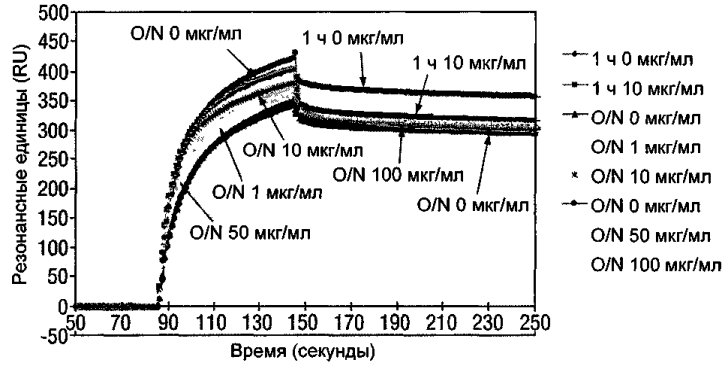
Фиг. 8С



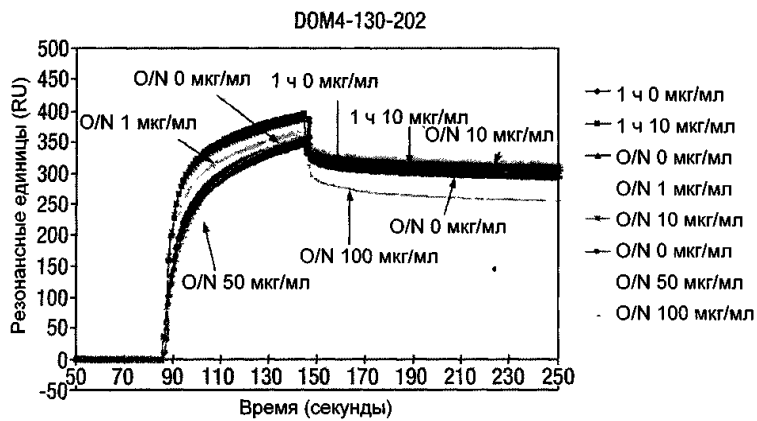
Фиг. 9



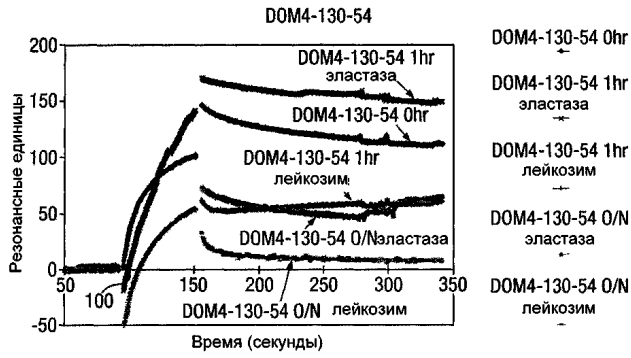
Фиг. 10А



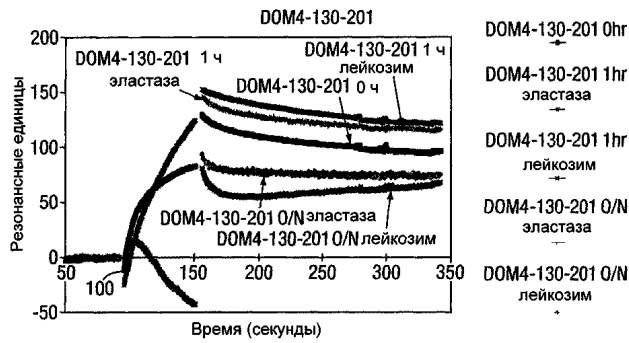
Фиг. 10В



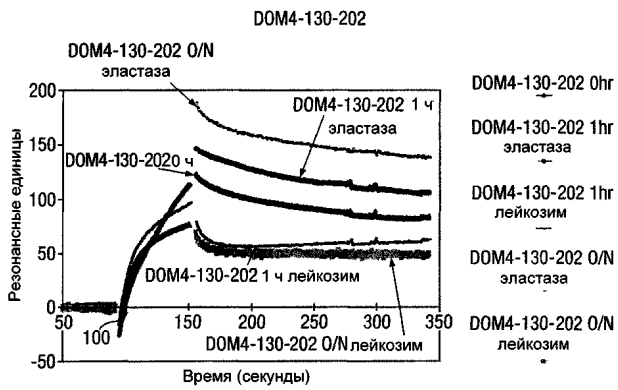
Фиг. 10С



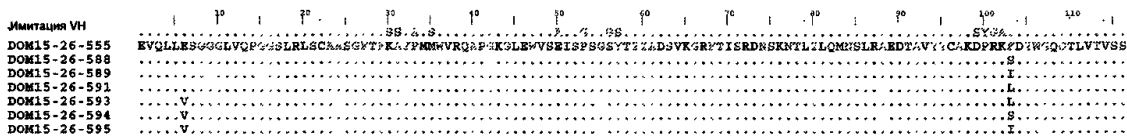
Фиг. 11А



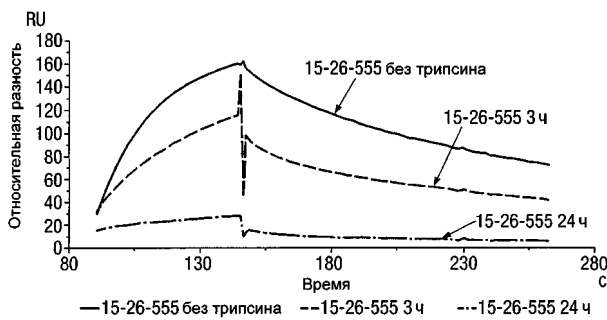
Фиг. 11В



Фиг. 11С

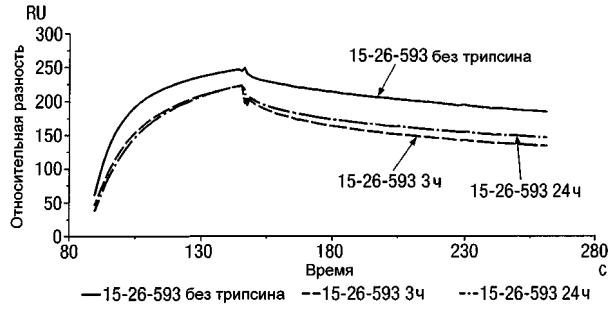


Фиг. 12



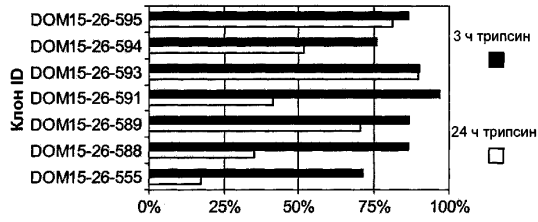
Фиг. 13А

018723



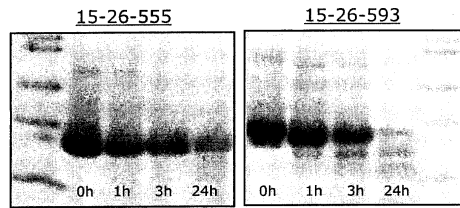
Фиг. 13В

Влияние обработки трипсином на связывание основных вариантов DOM15-26-555с hVEGF



Способность (%) связываться с антигеном после обработки трипсином

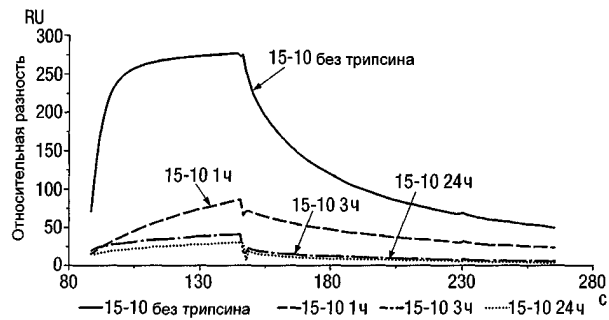
Фиг. 14



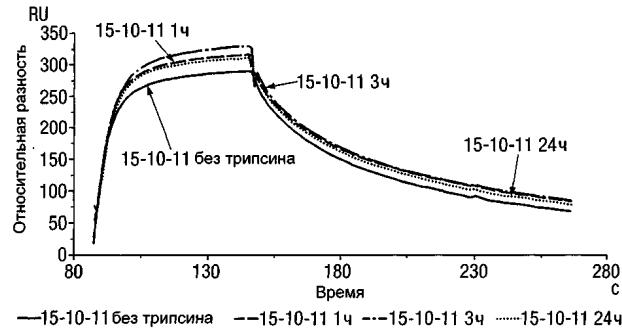
Фиг. 15

Имитация VK 30 30 40 50 60 70 80 90 100
 DOM15-10 4G S.SSY.N AA.S SYST.N K.
 DOM15-10-11 DIQMTQSPFSLASVQDRVTITCRASQWIGPELSNYQQKPKAPKLLIYHTSILQSGVPSRFRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYMFQPRTFGQGTKVEIRR R M G

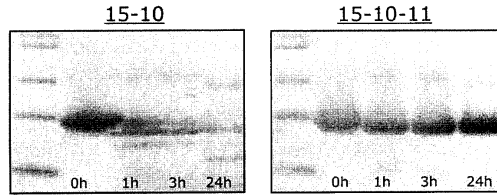
Фиг. 16



Фиг. 17А



Фиг. 17В



Фиг. 18

Последовательности, происходящие из DOM1h-131-511

>1-1

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCATGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTCACTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
 AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
 GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATTAATCTGTGCGTGTCTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTG
 ACTACTGGGGTCAAGGAACCTGGTCAACCGTCTCGAGCG

>1-2

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTGCGCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG
 AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
 GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGAGCCGAGGACACAGCGGTATTAATCTGTGCGTGTCTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTG
 ACTACTGGGGTCAAGGAACCTGGTCAACCGTCTCGAGCG

>1-3

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTCACTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
 AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
 GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATTAATCTGTGCGTGTCTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTG
 ACTACTGGGGTCAAGGAACCTGGTCAACCGTCTCGAGCG

>DOM1h-131-201

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTCACTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
 AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
 GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGAGATCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATTAATCTGTGCGTGTCTCCTAAGAGGGGGCCTTGTTTG
 ACTACTGGGGTCAAGGAACCTGGTCAACCGTCTCGAGCG

Фиг. 19А

>1-5

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
 AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTATGCAGACTCCGTG
 AAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAACCT
 GCGCGCCGAGGACACAGCGGTATTAATCTGTGCGCTGCTTCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTGAC
 TACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>1-6

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCCCCAGGG
 AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCCCGGCTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCG
 TGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAGCACGCTATATCTGCAAATGAACGG
 CCTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATTAATCTGTGCGCTGCTTCTAAGAGGGGGCCTTGGTTT
 GACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>1-7

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAAAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCTGGGA
 AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCCCGGCTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
 GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATTAATCTGTGCGCTGCTTCTAAGAGGGGGCCTTGGTTT
 ACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>DOM1h-131-202

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCCCCAGGG
 AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCCCGGACGGTCAAGATCCCTTCTACGCAGACTCCG
 TGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATTAATCTGTGCGCTGCTTCTAAGAGGGGGCCTTGGTTT
 ACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

Фиг. 19В

>DOM1h-131-203

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
 AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
 GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATTAATCTGTGCGCTGCTTCTAAGAGGGGGCCTTGGATTG
 ACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>DOM1h-131-204

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
 AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCCCAGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
 GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATTAATCTGTGCGCTGCTTCTAATAGGGGGCCTTGGTTT
 ACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>DOM1h-131-205

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
 AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
 GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATTAATCTGTGCGCTGCTTCTAAGAGGGGGCCTTGGTTT
 ACTACTGGGGTCAGGGAACCCAGGTACCGTCTCGAGCG

>1-12

GAGGTGCGGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTACAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
 AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
 GAAGAGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTATATCTGAGATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATTAATCTGTGCGCTGCTTCTAAGAGGGGGCCTTGGTTT
 ACTACTGGGGTCAGGGAACCCAGGTACCGTCTCGAGCG

Фиг. 19С

>1-13

GAGGTGCGGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGAGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
 AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCCCGGATAGCCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
 GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGGGCTGCTTCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
 ACTACAGGGGTACAGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>1-14

GAGGTGACAGTCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCATTTGCGCATGAAACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
 AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
 GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGTCTTCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
 ACTACCGGGGTACAGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGCG

>1-15

GAGGTGACAGTCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
 AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCCCGGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
 AAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGCCT
 GCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGGCTTCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTGAC
 TACTGGGGTACAGGAACCTTGGTCACCGTCTCGAGCG

>DOM1h-131-206

GAGGTGACAGTCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGACACAGGG
 AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCG
 TGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGTCTTCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
 ACTACTGGGGTACAGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGC

Фиг. 19D

>1-18

GAGGTGACAGTCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG
 AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCG
 TGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGTCTTCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
 ACTACTGGGGTACAGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGC

>1-19

GAGGTGACAGTCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCACCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG
 AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCG
 TGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGTCTTCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
 ACTACTGGGGTACAGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGC

>1-20

GAGGTGACAGTCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
 GGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCTCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
 GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGTCTTCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
 ACTACTGGGGTACAGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGC

>1-21

GAGGTGACAGTCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
 AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCCCGGATGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
 GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATATTACTGTGCGTCTTCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
 ACTACTGGGGTACAGGAACCTGGTCACCGTCTCGAGC

Фиг. 19E

>1-22

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCGTGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG
 AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCGCGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
 GAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATTAATCTGTGCGCTGCTTCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
 ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>1-23

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCAAGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGG
 AAGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCGCGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
 GAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATTAATCTGTGCGCGCTTCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
 ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>1-24

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
 AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCGCGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
 GAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATTAATCTGTGCGCGCTTCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
 ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>1-25

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTCTCC
 TGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTGCGCATGAGACGATGGTGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGA
 AGGGTCTAGAGTGGGTCTCACATATCCCGCGTTGGTCAGGATCCCTTCTACGCAGACTCCGT
 GAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGCGACAATCCAAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGC
 CTGCGTGCCGAGGACACAGCGGTATTAATCTGTGCGCGCTTCTAAGAGGGGGCCTTGGTTTG
 ACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Фиг. 19F

Последовательности, происходящие из DOM4-130-54

>4-1

GACATCCTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCACTT
 GCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAAACAGGGAAAGCCCCCT
 AAGCTCCTGATCAATTTGGTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGGA
 TATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATGTCGCTACGTACTACTGT
 CAACCGTCTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-2

GACATCCTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCACTT
 GCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAAACAGGGAAAGCCCCCT
 AAGCTCCTGATCAATTTGGTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCATCACGTTTCAGTGGCAGCGGA
 TATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTGCTACGTACTACTGT
 CAACCGTCTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-3

GACATCCAGACGACCCAGTCTCCGTCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCACT
 TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCAGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAAACAGGGAAAGCCCC
 TAAGCTCCTGATCAATTTGGTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
 ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTGCTACGTACTACTGT
 TCAACCGTCTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG
 GGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-4

GACATCCAGGTGACCCAGTCTCCATCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCACT
 TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAAACAGGGAAAGCCCC
 TAAGCTCCTGATCAACTTTGGTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
 ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTGCTACGTACTACTGT
 TCAACCGTCTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGCCGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGG

>4-5

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTTCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAACATCACTT
 GCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCAGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAAACAGGGAAAGCCCCCT
 AAGCTCCTGATCAATTTGGTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGGA
 TACGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATATCGCTACGTACTACTGT
 CAACCGTCTTTTACTTCCCTTATACGTTTGGCCGAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAGGGG

Фиг. 19G

>4-6

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTGCGCATCTGAAGGAGACCGTGTACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGCCCC
TAAGTCTCTGATCAATTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGAATTCACCTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGACTTCGCTACGTACTIONG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGCAAGGGACCAAGGTGAAATCAAACGGG

>4-7

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTGTCATCTGTAGGAGACCGTGTACCCTCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGCCCC
TAAGTCTCTGATCAATTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTCCGCTACGTACTIONG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGCAAGGGACCAAGGTGAAATCAAACGGG

>4-8

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTGTCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGGATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGCCCC
TAAGTCTCTGATCAATTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCGGTCTGCAACCTGAAGATTTCCGCTACGTACTIONG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGCGGAGGGACCAAGGTGAAATCAAACGGG

>4-9

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTGTCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGCCCC
TAAGTCTCTGATCAGTTTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTCCGCTACGTACTIONG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGCAAGGGACCAAGGTGAAATCAAACGGG

>DOM4-130-201

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTGTCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGCCCC
TAAGTCTCTGATCAAAATTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAATCTGCAACCTGAAGATTTCCGCTACGTACTIONG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGCAAGGGACCAAGGTGAAATCAAATGGG

Фиг. 19H

>4-11

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTGTCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGCCCC
TAAGTCTCTGATCAATTTATGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCACCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTCCGCTACGTACTIONG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGCAAGGGACCAAGGTGAAATCAAACGGG

>4-12

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTGTCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATATACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGCCCC
TAAGTCTCTGATCAATTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCACCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTCCGCTACGTACTIONG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGCAAGGGACCAAGGTGAAATCAAACAGG

>4-13

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTGTCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGCCCC
TAAGTCTCTGATCAATTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCCGCTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTCCGCTACGTACTIONG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCATATACGTTCCGCAAGGGACCAAGGTGAAATCAAACAGG

>4-14

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTGTCATCTGTAGGAGACCGTGTCACTATCACTT
GCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGCCCC
AAGTCTCTGATCAATTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATGTCCGCTACGTACTIONG
CAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGCAAGGGACCAAGGTGAAATCAAACGGG

>4-15

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTGTCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCACT
TGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGCCCC
TAAGTCTCTGATCAATTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGG
ATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGACTTCGCTACGTACTIONG
TCAACCGTCTTTTTACTTCCCATATACGTTTGGCAAGGGACCAAGGTGAAATCAAACAGG

Фиг. 19I

>4-16

GACATCCAAATGGCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCAC
 TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
 CCTAAGCTCCTGATCAGTTTTGGTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
 TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCGGCTACGTA
 ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGAAATCAAACAG
 G

>4-17

GACATCCAGATGACCCAGTACCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCAC
 TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
 CCTAAGCTCCTGATCAATTTGGTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
 TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCGGCTACGTA
 ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGAAATCAAACCG
 G

>4-18

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCAC
 TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
 CCTAAGCTCCTGATCAATTTGGTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
 TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCGGCTACGTA
 ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGAAATCAAACCG

>4-19

GACATCCAGATAACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCAC
 TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
 CCTAAGCTCCTGATCAATTTGGTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
 TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCGGCTACGTA
 ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGAAATCAAACCG

>4-20

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCAC
 TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
 CCTAAGCTCCTGATCAATTTGGTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
 TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCGGCTACGTA
 ACTGTCAACCGTCTTTTTACTACCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGAAATCAAACAG

Фиг. 19J

>DOM4-130-202

GACATCCAGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCTC
 TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
 CCTAAGCTCCTGATCAGTTTTGGTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCTCACGTTTCAGTGGCAG
 TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCGGCTACGTA
 ACTGTCAACCGTCTTTTTACTACCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGAAATCAAACCG

>4-22

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCAC
 TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
 CCTAAGCTCCTGATCAATTTGGTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
 TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCGGCTACGTA
 ACTGTCAACCGTCTTTTTACTACCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGAAATCAAACCG

>4-23

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCAC
 TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
 CCTAAGCTCCTGATCAATTTGGTCCGAGTTGCAAAGTGGAGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
 TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCGGCTACGTA
 ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGAAATCAATCGG

>4-24

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATATGTAGGAGACCGTGTACCATCAC
 TTGCCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
 CCTAAGCTCCTGATCAGTTTTGGTCCGAGTTGCAAAGTGGAGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
 TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCGGTACGTA
 ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGAAATCAAACCG

>4-25

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCATCAC
 TTGTCGGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCC
 CCTAAGCTCCTGATCAATTTGGTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
 TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTCGGTACGTA
 ACTGTCAACCGTCTTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGGTGAAATCAAACCG

Фиг. 19K

>4-26

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCGCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCTTGTACCCATCAC
 TTGCCGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCC
 CCTAAGCTCCTGATCAATTTAGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
 TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTGCTACGTA
 ACTGTCAACCGTCTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGT

>4-27

GACATCCTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACCCATCAC
 TTGCCGGCAAGTCAGGATATTTACCTGAATTTAGACTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGGCC
 CCTAAGCTCCTGATCAATTTGGTTCCGAGTTGCAAAGTGGTGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAG
 TGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATGTGCTACGTA
 ACTGTCAACCGTCTTTTACTTCCCTTATACGTTCCGCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGG

Фиг. 19L

>DOM15-26-555

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCCGCTTCCGGTTCTTATACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCAACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-576

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCCAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCCGCTTCCGGTTCTTATACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCAACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-578

GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCCAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCCGCTTCCGGTTCTTATACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCAACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-579

GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCCGCTTCCGGTTCTTATACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCAACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-580

GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCCGCTTCCGGTTCTTATACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
 CGGAAGTTTGAATACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCAACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-581

GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCCGCTTCCGGTTCTTATACATACTAC
 GCGGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAATGATCCT
 CGGAAGTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCAACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-582

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACATTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCCGCTTCCGGTTCTTATACATACTAC
 GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTTCCAAGAACACGCTGTAT
 CTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAATGATCCT
 CGGAAGATTGACTACTGGGGTCAGGGAACCTGGTCAACCGTCTCGAGC

Фиг. 20A

>DOM15-26-583
GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTGCGCTTCGGGTCTTATACATACTAC
GCATACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCATGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGTTAGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-584
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCAGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCTGCCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGAGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTGCGCTTCGGGTCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACAATCTCCCGGACAATCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGATTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-585
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTGCGCTTCGGGTCTTATACATACTAC
GCAGAGTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTACGAAAGATCCT
CGGAAGTTTACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-586
GAGGTGCAGTTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTGCGCTTCGGGTCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGTTTACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-587
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTGCGCTTCGGGTCTTATACATACTAC
GCATACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGATTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-588
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTGCGCTTCGGGTCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGTCTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-589
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTCACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTCGCGCTTCGGGTCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAATGAACAGCCTGCCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGATTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

Фиг. 20В

>DOM15-26-590
GAGGTGCATCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
GCAAACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGATTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-591
GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGTTAGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-592
GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGTTAGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-26-593
GAGGTGCAGCTGTTGGTGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGCGTCTC
TCCTGTGCAGCCTCCGGATTACCTTTAAGGCTTATCCGATGATGTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGGAAGGGTCTAGAGTGGGTCTCAGAGATTTCGCCTTCGGGTTCTTATACATACTAC
GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACAATTCCAAGAACACGCTGTAT
CTGCAAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACCGCGGTATATTACTGTGCGAAAGATCCT
CGGAAGTTAGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCGAGC

>DOM15-10
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAAC
ATCACTTGCCGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACTCCATTTTGCAAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAATCAGACGG

>DOM15-10-1
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAAC
ATCACTTGCCGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATCATTCTGTTTGCAAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAATCAGACAG

>DOM15-10-2
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCAAC
ATCACTTGCCGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACTCCATTTTGCAAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTTCGGCCAA

Фиг. 20С

>DOM15-10-3
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCTAAGCACCTGATCTATCATAACGTCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTAGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAAGACGTTCCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAATCAGATGG

>DOM15-10-4
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGAGTTAAGATGGTACCAGAAGAAACCA
GGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATCATAACGTCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTTTACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTCCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAATTAGACGG

>DOM15-10-5
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATCATAACGTCATTTTGCGAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTCCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAATCAGATGG

>DOM15-10-6
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCTAAGCGCCTGATCTATCATAACGTCATTTTACAGAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GCAGATTTTGCAACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTCCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAATCAGACAG

>DOM15-10-7
GACATCCAGATGACCCAGTCCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATCATAACGTCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTTGGCCTAGGACGTTCCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAATCAGACAA

>DOM15-10-8
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCCGCATCTGTAGGAGACCGTGTACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATCATAACGTCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACTT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCGCCTAGGACGTTCCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAATCAGAGGG

>DOM15-10-9
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCTAAGTTCCCTGATCTATCATAACGTCATTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAACAGTCTGCAACCT
GGAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTCCGGCCAA

Фиг. 20D

>DOM15-10-10
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTATCAGCCTAGGACGTTCCGGCCAA
GGGACCAAGGTGAAATCAGACAG

>DOM15-10-11
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGATGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTATGACGTTCCGGCCAA
GGGACCAAGGTGAAATCAGAGGG

>DOM15-10-12
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGATGGTACCAGAAGAAACCA
GGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAAGCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTCCGGCCAA
GGGACCAAGGTGAAACCCAGACGG

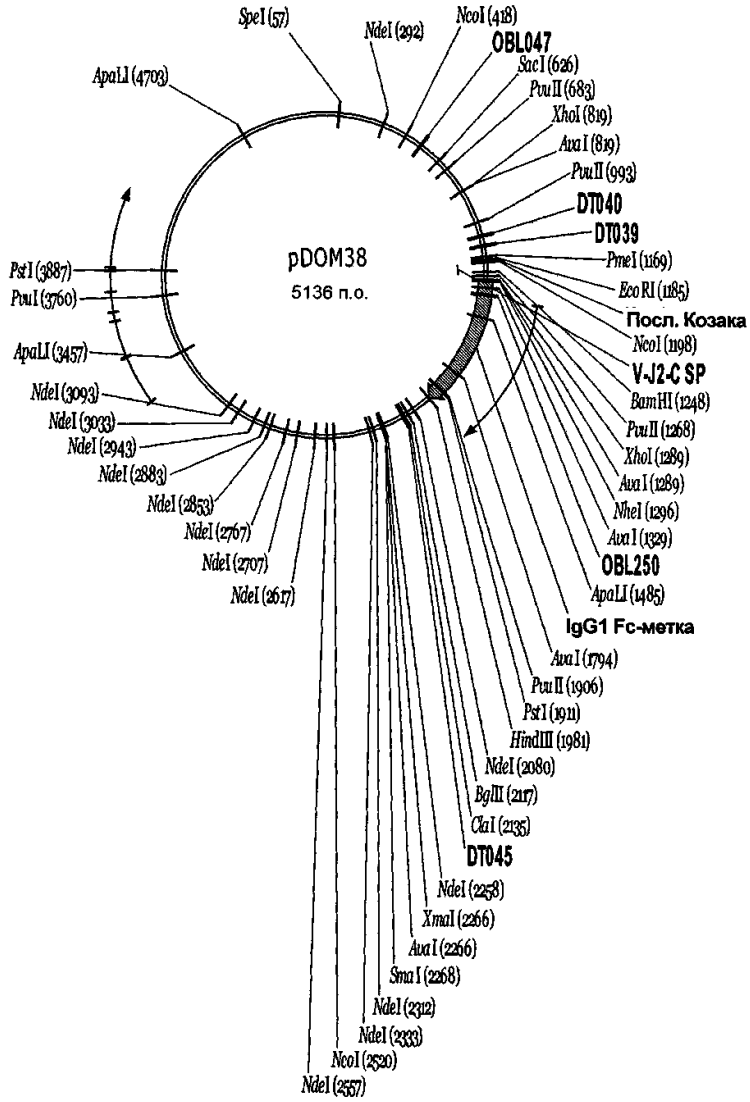
>DOM15-10-13
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGAAGGAGACCGTGTACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
CGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTATGACGTTCCGGCCAA
GGGACCAAGGTGAAATCAGACGG

>DOM15-10-14
GACATCCTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTACGTTGGTACCAGCATAAACCA
GGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATATGGGACAGATTTCACTCTCTCCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTAGGACGTTCCGGCCAA
GGGACCAAGGTGAAATCAGATGG

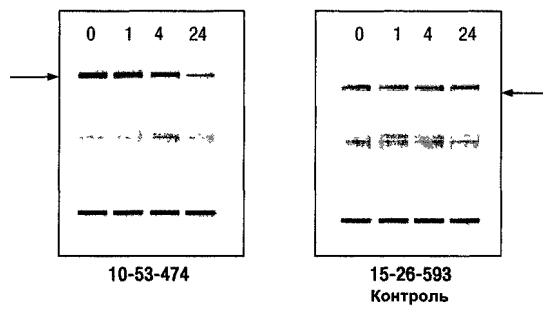
>DOM15-10-15
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTAAGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCAAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAGGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTGGCCTAGGACGTTCCGGCCAA
GGGACCAAGGTGAAATCAGACAG

>DOM15-10-16
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTACC
ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGTCCGGAGTTACGTTGGTACCAGCAGAAACCA
GGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATCATACGTCCATTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGTATATGTTTCAGCCTATGACGTTCCGGCCAA

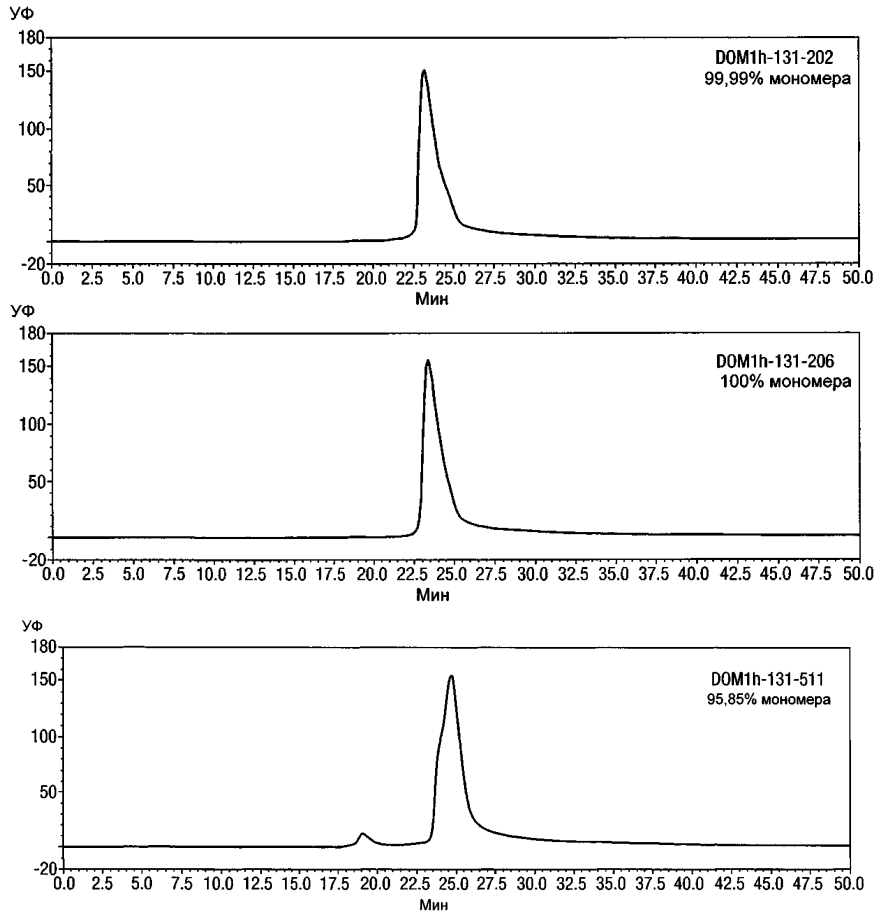
Фиг. 20Е



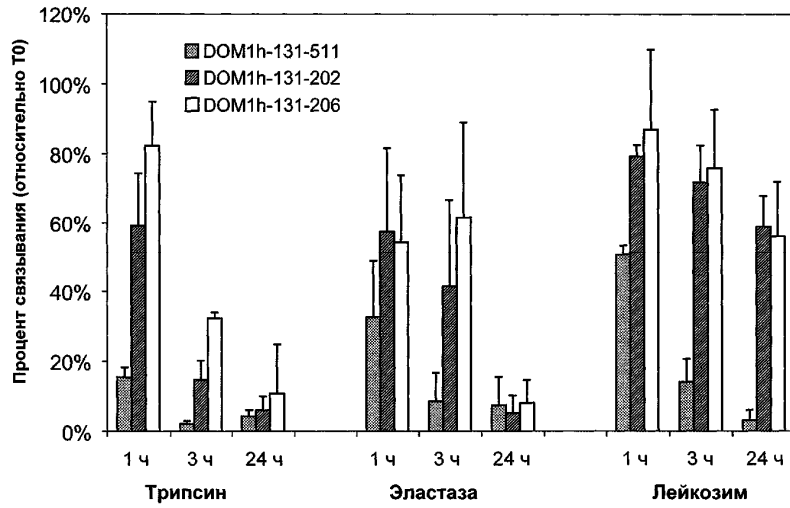
Фиг. 21



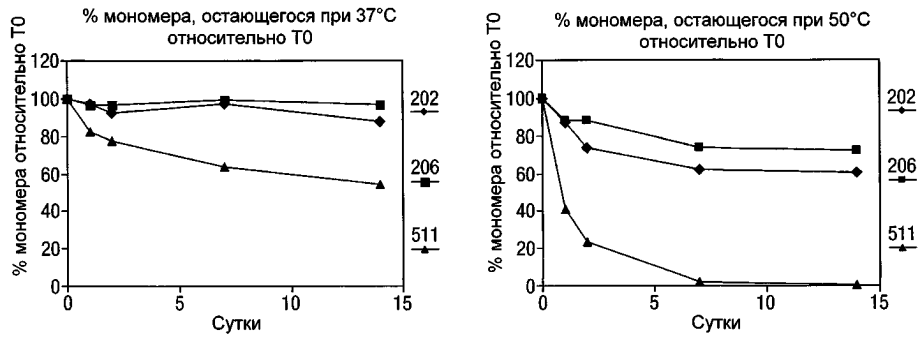
Фиг. 22



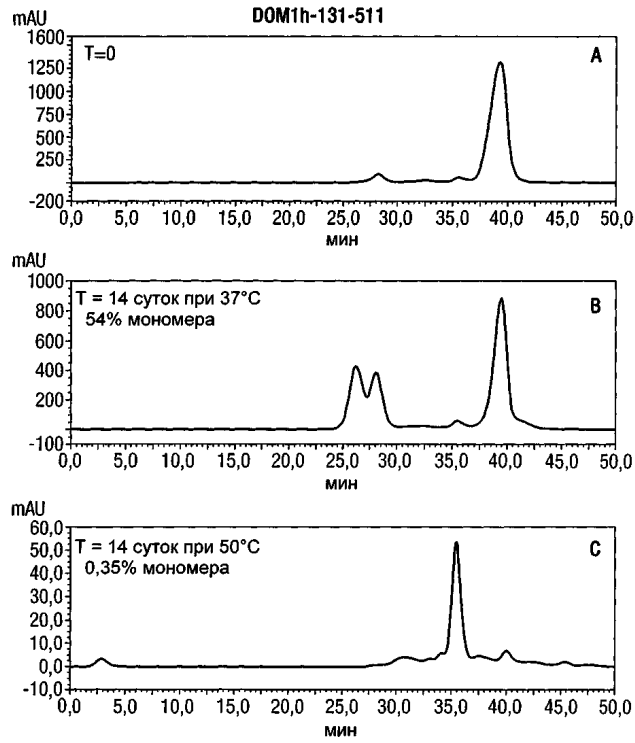
Фиг. 23



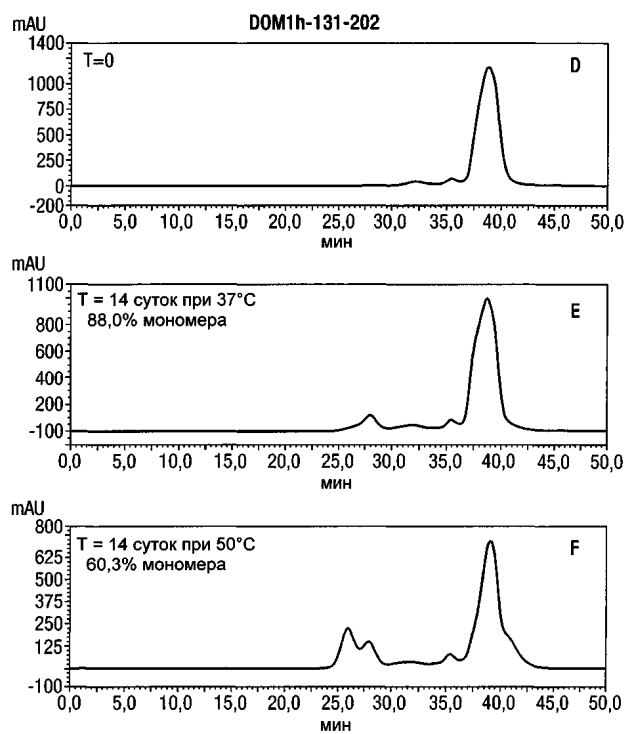
Фиг. 24



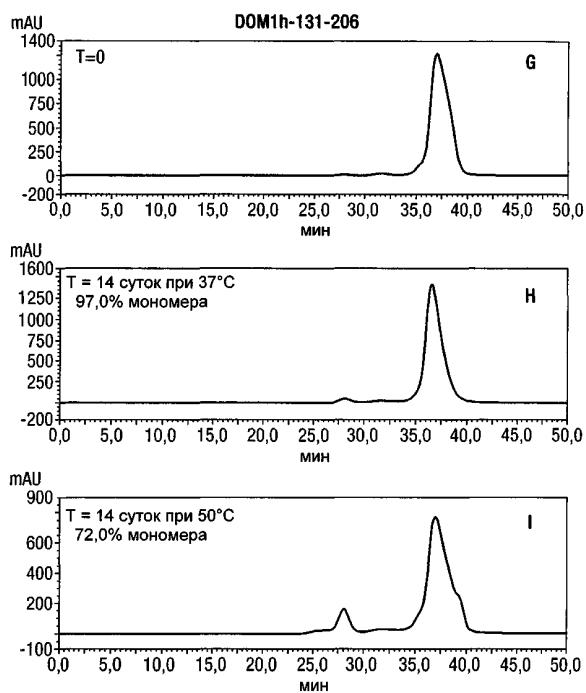
Фиг. 25



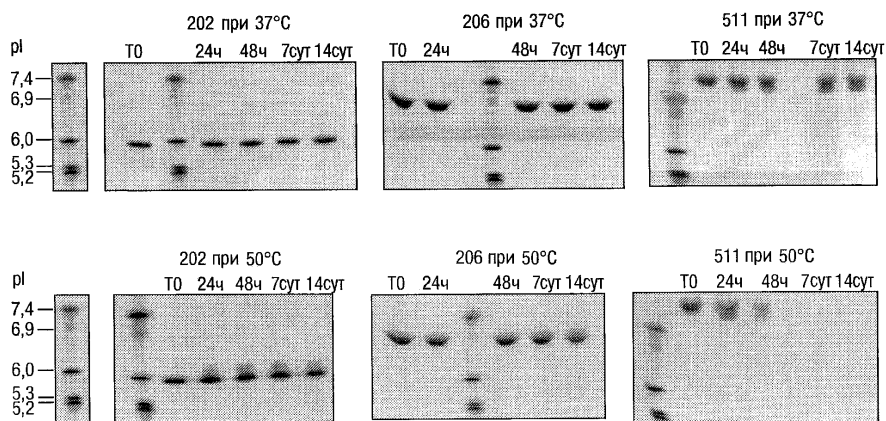
Фиг. 26



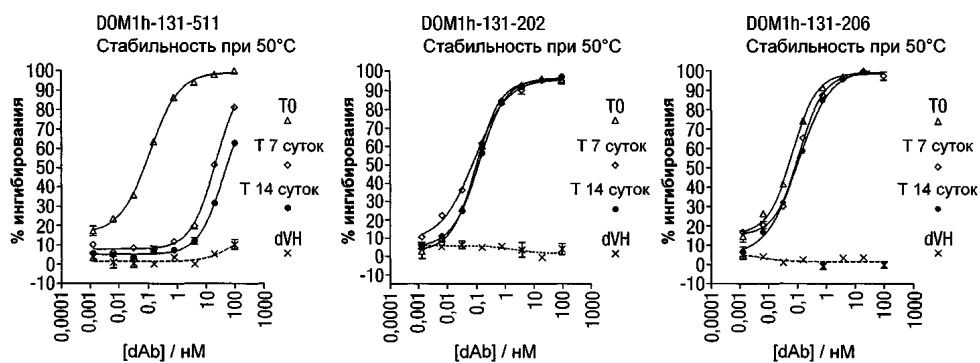
Фиг. 26 (продолжение I)



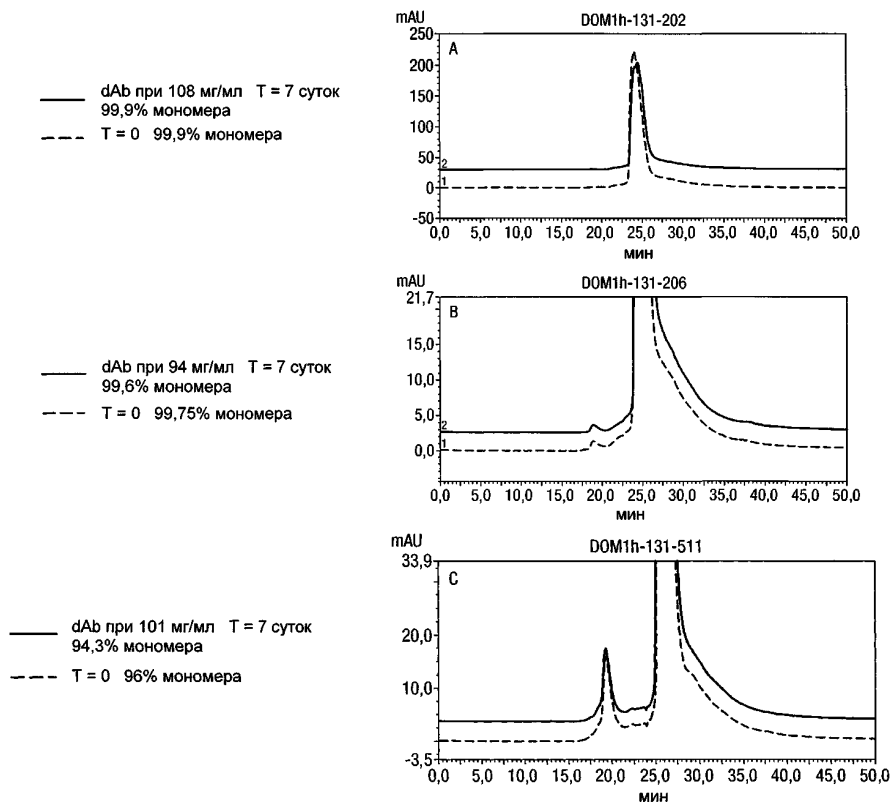
Фиг. 26 (продолжение II)



Фиг. 27

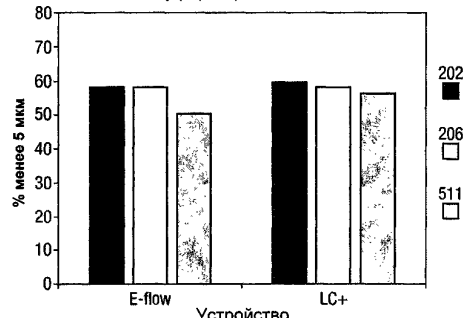


Фиг. 28



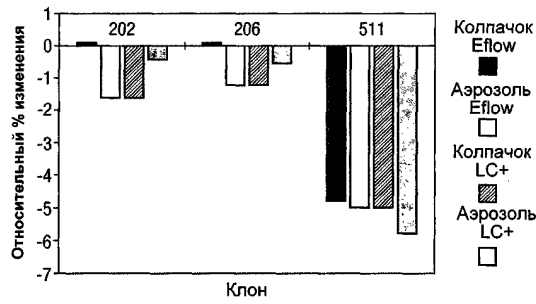
Фиг. 29

Тестирование с использованием небулайзеров в буфере Бриттона-Робинсона

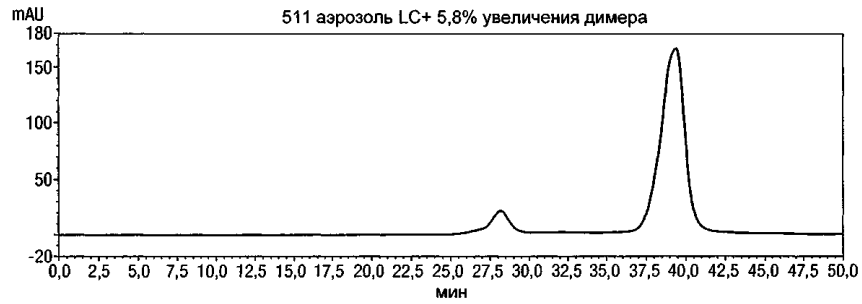
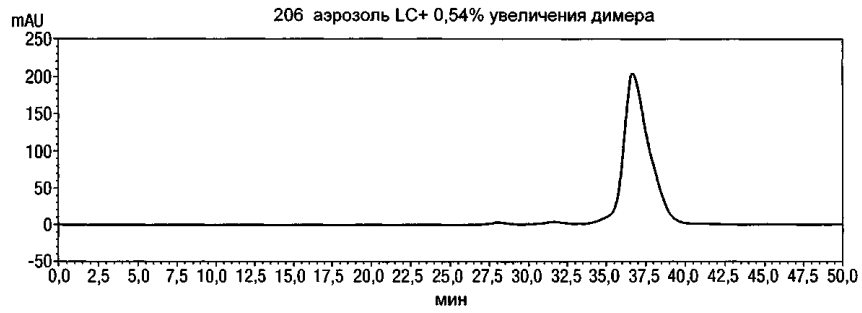


Фиг. 30

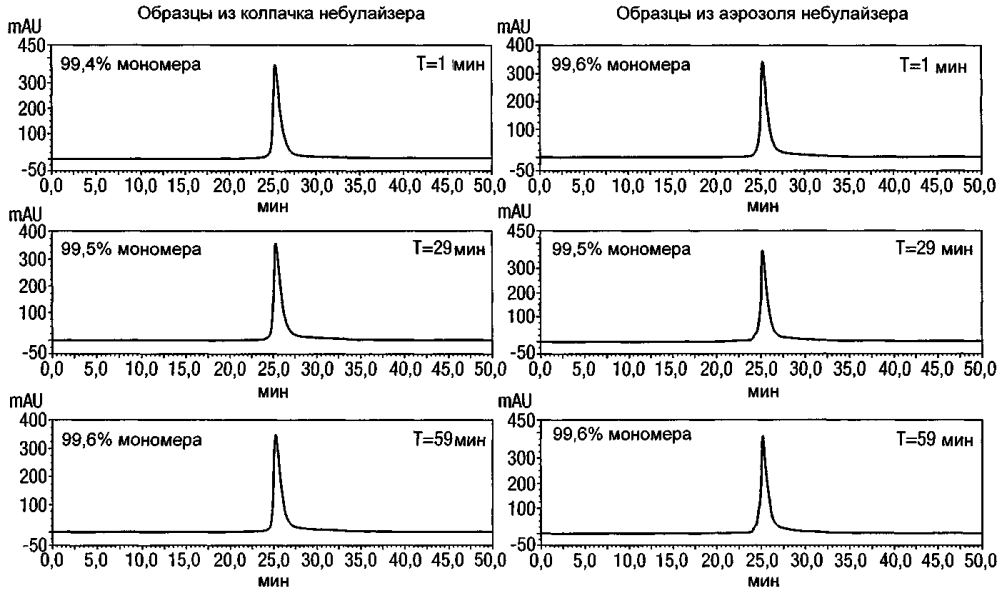
% изменения содержания мономера



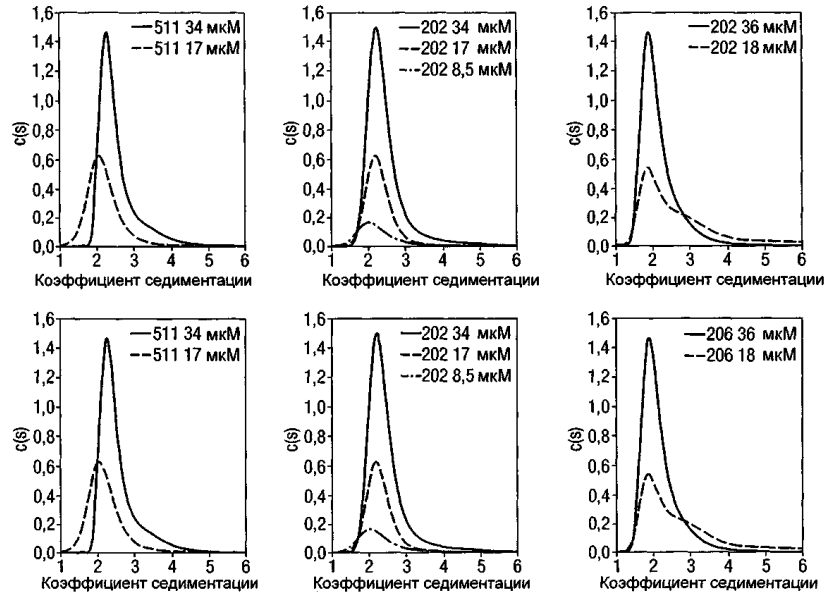
Фиг. 31



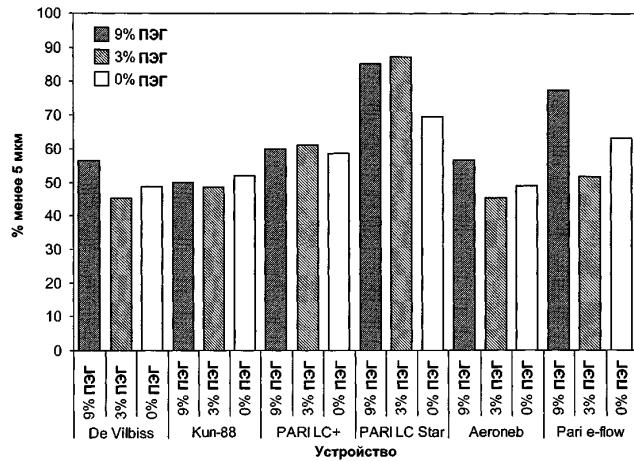
Фиг. 32



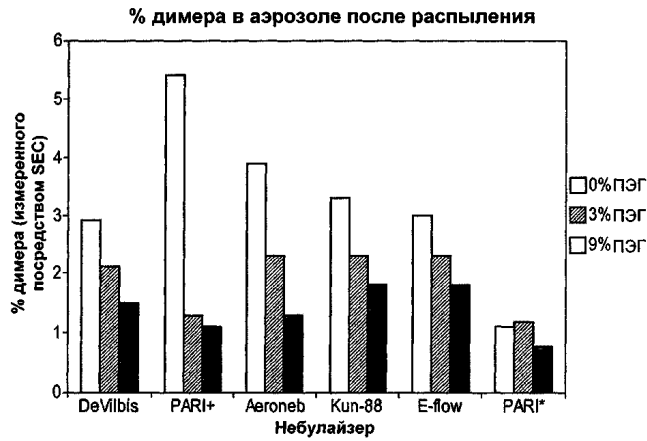
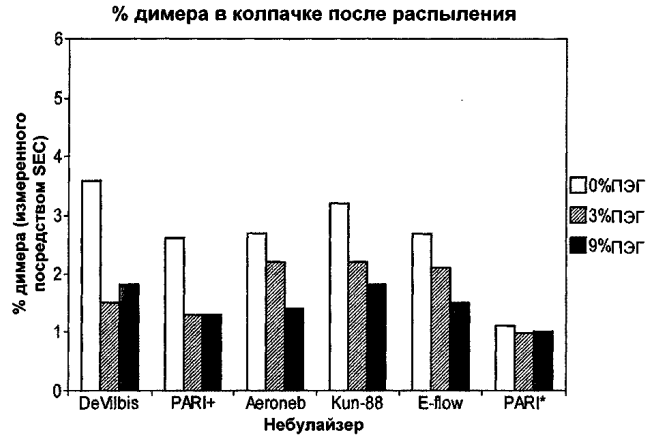
Фиг. 33



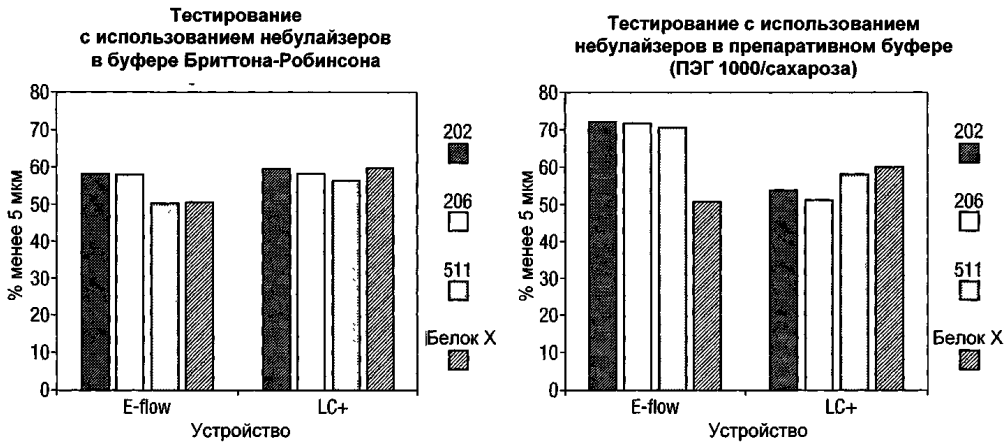
Фиг. 34



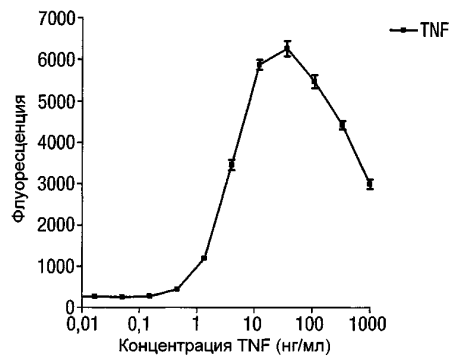
Фиг. 35



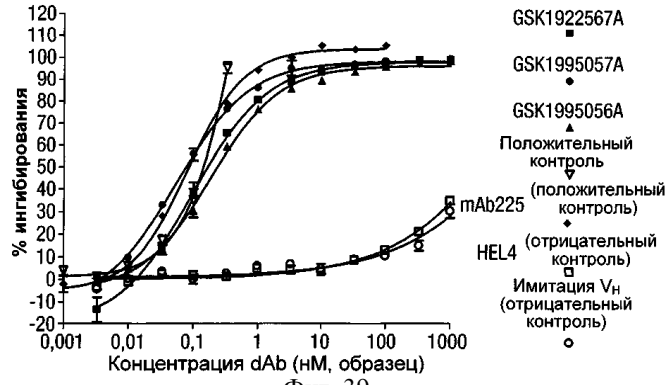
Фиг. 36



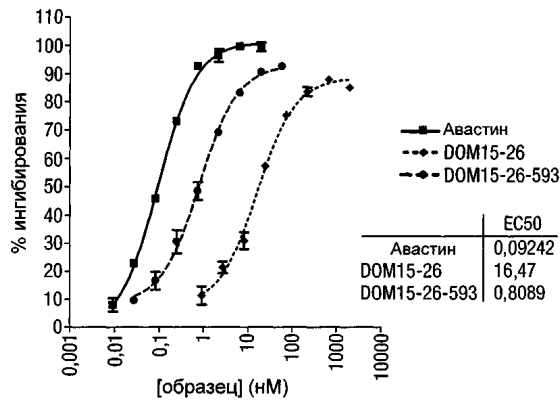
Фиг. 37



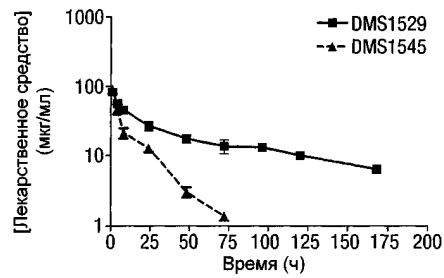
Фиг. 38



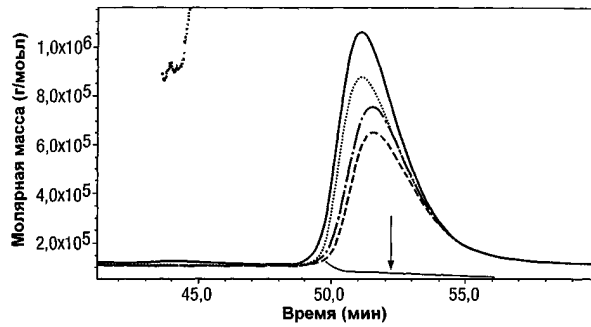
Фиг. 39



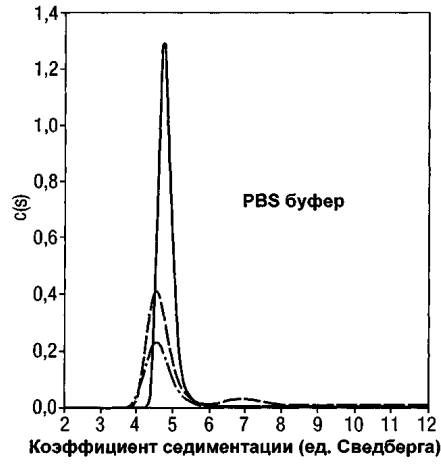
Фиг. 40



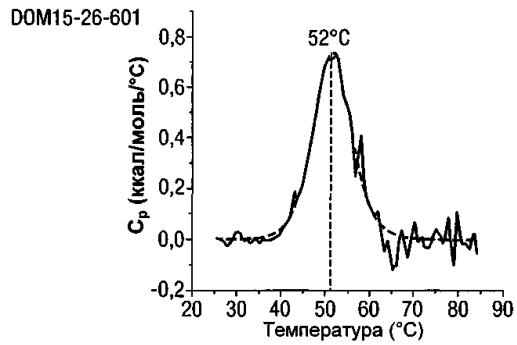
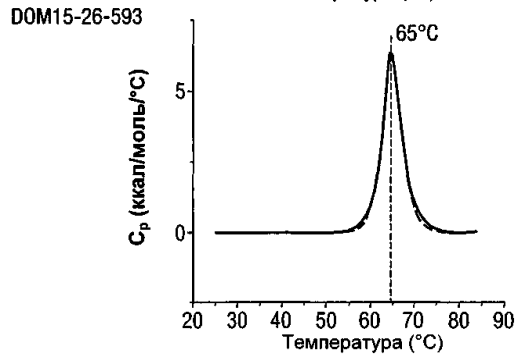
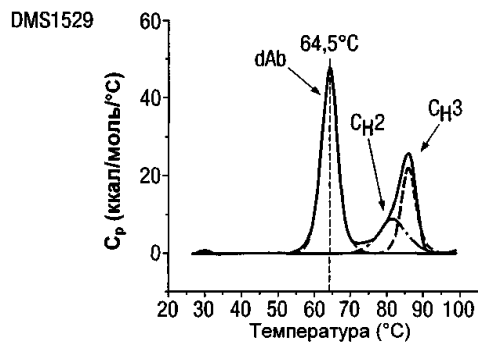
Фиг. 41



Фиг. 42а

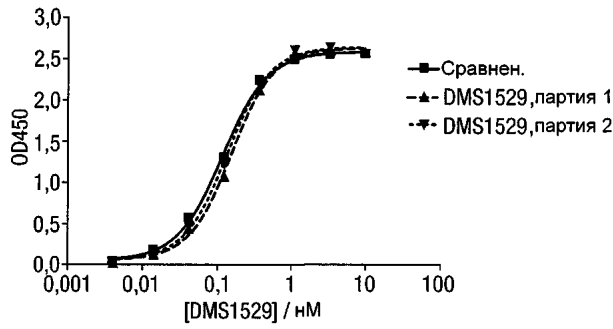


Фиг. 42b



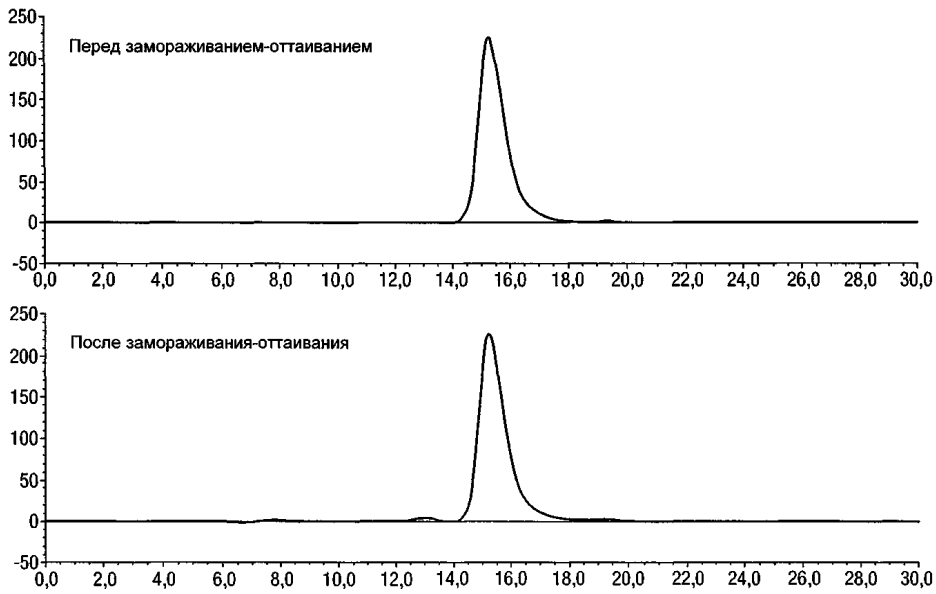
Фиг. 43

018723

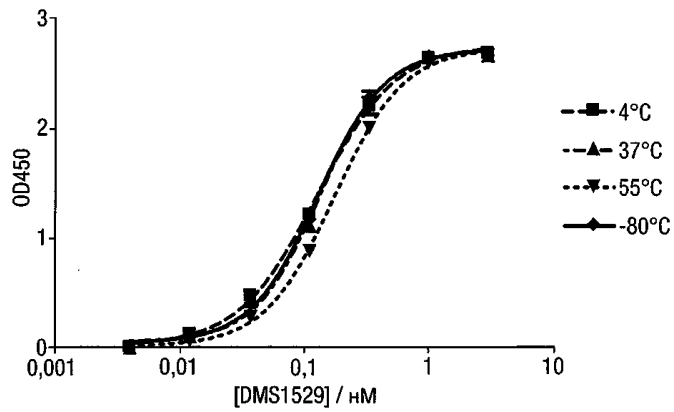


	Сравнен.	DMS1529, партия 1	DMS1529, партия 2
EC50	0,1167	0,1539	0,1358

Фиг. 44

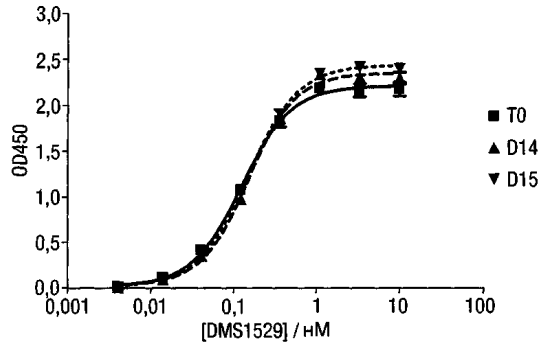


Фиг. 45



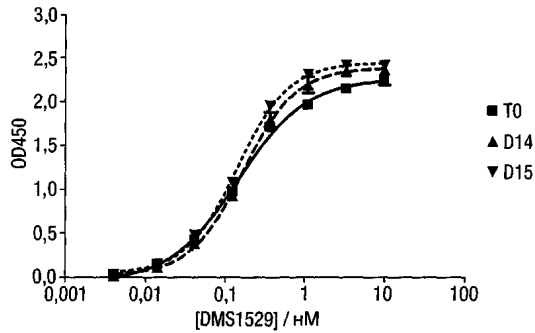
	4°C	37°C	55°C	-80°C
EC50	0,1269	0,1334	0,1748	0,1288

Фиг. 46



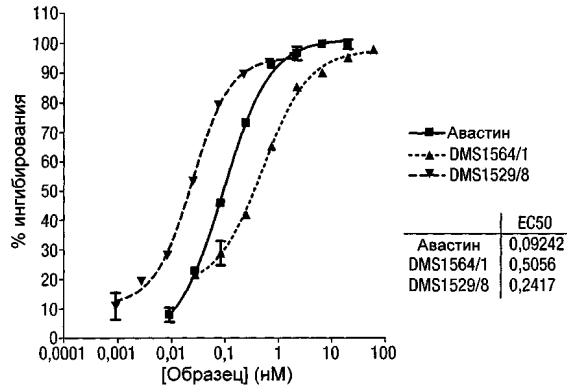
	T0	D14	D15
EC50	0,1253	0,1520	0,1495

Фиг. 47А



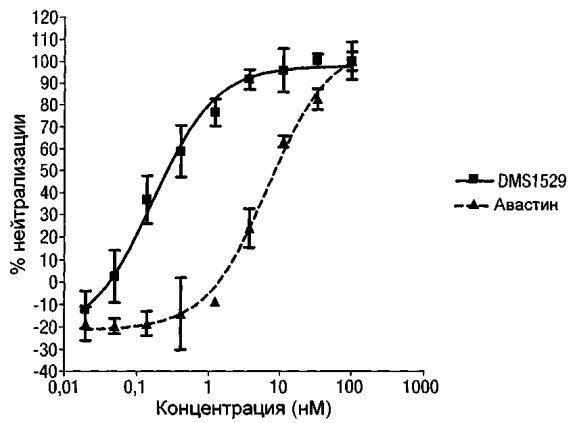
	T0	D14	D15
EC50	0,1453	0,1681	0,1422

Фиг. 47В

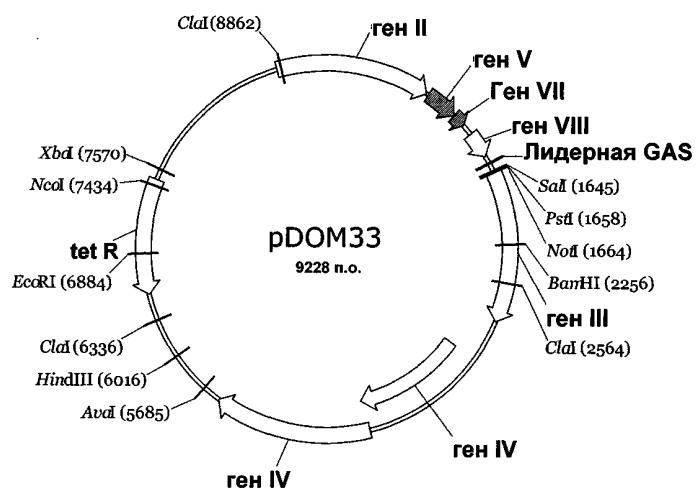


	EC50
Авастин	0,09242
DMS1564/1	0,5056
DMS1529/8	0,2417

Фиг. 48



Фиг. 49



Фиг. 50

Нумерация по Kabat	5	10	15	20	25	30	35
DOM7h-1	D I Q M T Q S P F S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W						
DOM7h-10	D I Q M T Q S P F S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W						
DOM7h-11	D I Q M T Q S P F S S L S A S V G D R V T I T C R A S R P I G T T L S W						
DOM7h-12	D I Q M T Q S P F S S L S A S V G D R V T I T C R A S K Y I G S Q L N W						
DOM7h-13	D I Q M T Q S P F S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q P I Y K Y L S W						
DOM7h-14	D I Q M T Q S P F S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q M I G S Q L S W						
DOM7h-2	D I Q M T Q S P F S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q K I A T Y L N W						
DOM7h-3	D I Q M T Q S P F S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q W I D T G L A W						
DOM7h-4	D I Q M T Q S P F S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q H I Y S W L A W						
DOM7h-5	D I Q M T Q S P F S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W						
DOM7h-7	D I Q M T Q S P F S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W						
DOM7h-8	D I Q M T Q S P F S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W						
DOM7h-9	D I Q M T Q S P F S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q H I G L W L S W						
Нумерация по Kabat	40	45	50	55	60	65	70
DOM7h-1	Y Q Q K F G K A P K L L I Y R M S F L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7h-10	Y Q Q K F G K A P K L L I Y R M S F L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7h-11	Y Q Q K F G K A P K L L I M P S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7h-12	Y Q Q K F G K A P K L L I A M A E V L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7h-13	Y Q Q K F G K A P K L L I Y M A S Y L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7h-14	Y Q Q K F G K A P K L L I M R S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7h-2	Y Q Q K F G K A P K L L I Y R S S L Q S A V P S R F S G S G S G T V						
DOM7h-3	Y Q Q K F G K A P K L L I Y M V S L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7h-4	Y Q Q K F G K A P K L L I Y M A S L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7h-5	Y Q Q K F G K A P T L L I Y R L S Y L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7h-7	Y Q Q K F G K A P K L L I Y R M S Q L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7h-8	Y Q Q K F G K A P K L L I Y R M S F L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7h-9	Y Q Q K F G K A P K L L I Y R S S L L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
Нумерация по Kabat	75	80	85	90	95	100	105
DOM7h-1	Y T L T I S S L Q F E D F A T Y Y C Q Q T Y T V P R T F G Q G T K V E						
DOM7h-10	Y T L T I S S L Q F E D F A T Y Y C Q Q T Y T S I P R T F G Q G T K V E						
DOM7h-11	Y T L T I S S L Q F E D F A T Y Y C A Q A O T H P R T F G Q G T K V E						
DOM7h-12	Y T L T I S S L Q F E D F A T Y Y C K Q G A A S P R T F G Q G T K V E						
DOM7h-13	Y T L T I S S L Q F E D F A T Y Y C Q Q N A K L P R T F G Q G T K V E						
DOM7h-14	Y T L T I S S L Q F E D F A T Y Y C A Q G A A L P R T F G Q G T K V E						
DOM7h-2	Y T L T I S S L Q F K D F A T Y Y C Q Q T I A V P R T F G Q G T K V E						
DOM7h-3	Y T L T I S S L Q F E D F A T Y Y C Q Q Y M Q S P R T F G Q G T K V E						
DOM7h-4	Y T L T I S S L Q F E D F A T Y Y C Q Q V I G D P R T F G Q G T K V E						
DOM7h-6	Y T L T I S S L Q F E D F A T Y Y C Q Q T Y M V P R T F G Q G T K V E						
DOM7h-7	Y T L T I S S L Q F E D F A T Y Y C Q Q T F A V P R T F G Q G T K V E						
DOM7h-8	Y T L T I S S L Q F E D F A T Y Y C Q Q T I E V P R T F G Q G T K V E						
DOM7h-9	Y T L T I S S L Q F E D F A T Y Y C Q Q K Y N L P Y T S G Q G T K V E						
Нумерация по Kabat							
DOM7h-1	Г К Q						
DOM7h-10	Г К R						
DOM7h-11	Г К R						
DOM7h-12	Г К R						
DOM7h-13	Г К R						
DOM7h-14	Г К R						
DOM7h-2	Г К R						
DOM7h-3	Г К R						
DOM7h-4	Г К R						
DOM7h-6	Г К R						
DOM7h-7	Г К R						
DOM7h-8	Г К R						
DOM7h-9	Г К R						

Фиг. 51a

Нумерация по Kabat	5	10	15	20	25	30	35																												
<u>DOM7m-12</u>	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	F	R	H	L	K	W
<u>DOM7m-16</u>	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	I	K	H	L	K	W
<u>DOM7m-26</u>	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	Y	Y	H	L	K	W
Нумерация по Kabat	40	45	50	55	60	65	70																												
<u>DOM7m-12</u>	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	R	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D
<u>DOM7m-16</u>	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	G	A	S	R	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D
<u>DOM7m-26</u>	Y	Q	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D
Нумерация по Kabat	75	80	85	90	95	100	105																												
<u>DOM7m-12</u>	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	V	A	L	Y	P	K	T	F	G	Q	G	T	K	V	E
<u>DOM7m-16</u>	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	G	A	R	W	P	O	T	F	G	Q	G	T	K	V	E
<u>DOM7m-26</u>	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	V	R	K	V	P	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E
Нумерация по Kabat																																			
<u>DOM7m-12</u>	I	K	R																																
<u>DOM7m-16</u>	I	K	R																																
<u>DOM7m-26</u>	I	K	R																																

Фиг. 51a (продолжение I)

Нумерация по Kabat	5	10	15	20	25	30	35
DOM7r-1	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q Y I G R Y L R W						
DOM7r-13	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q H I E R H L R W						
DOM7r-14	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q H I E R H L R W						
DOM7r-15	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I G R H L R W						
DOM7r-16	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q K I Y K H L R W						
DOM7r-17	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q K I Y K H L R W						
DOM7r-18	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q W I Y K S L G W						
DOM7r-19	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q W I Y R H L R W						
DOM7r-3	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q Y I G R Y L R W						
DOM7r-4	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q W I G R Y L R W						
DOM7r-7	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q Y I G R Y L R W						
DOM7r-5	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q Y I S R Q L R W						
DOM7r-8	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q W I E R Q L R W						
Нумерация по Kabat	40	45	50	55	60	65	70
DOM7r-1	T Q Q K P Q K A P K L L I Y D S S V L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7r-13	T Q Q K P Q K A P K L L I Y Q A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7r-14	T Q Q K P Q K A P K L L I Y Q A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7r-15	T Q Q K P Q A A P K L L I Y X T S M L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7r-16	T Q Q K P Q K A P K L L I Y M S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7r-17	T Q Q K P Q K A P K L L I Y M T S I L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7r-18	T Q Q K P Q K A P K L L I Y Q S S L L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7r-19	T Q Q K P Q K A P K L L I Y D A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7r-3	T Q Q K P Q K A P K L L I Y D S S V L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7r-4	T Q Q K P Q K A P K L L I Y N G S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7r-7	T Q Q K P Q K A P K L L I Y D S S V L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7r-5	T Q Q K P Q K A P K L L I Y T A S I L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
Нумерация по Kabat	75	80	85	90	95	100	105
DOM7r-1	F Y L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q K Y L P F Y T F G Q G T K V E						
DOM7r-13	F Y L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q K Y L P F Y T F G Q G T K V E						
DOM7r-14	F Y L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q K Y L P F Y T F G Q G T K V E						
DOM7r-15	F Y L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y S O W P H I T F G Q G T K V E						
DOM7r-16	F Y L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q K Y L S F Y T F G Q G T K V E						
DOM7r-17	F Y L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q K W E A P Y T F G Q G T K V E						
DOM7r-18	F Y L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q I H G M P H I T F G Q G T K V E						
DOM7r-19	F Y L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q T E M F P K I T F G Q G T K V E						
DOM7r-3	F Y L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q A Y M Q F Y T F G Q G T K V E						
DOM7r-4	F Y L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q K Y L Q P Y T F G Q G T K V E						
DOM7r-2	F Y L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q K Y S E F Y T F G Q G T K V E						
DOM7r-5	F Y L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q K Y I T F Y T F G Q G T K V E						
DOM7r-8	F Y L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q T F S K P S T F G Q G T K V E						
Нумерация по Kabat	110	115	120	125	130	135	140
DOM7r-1	I K R						
DOM7r-13	I K R						
DOM7r-14	I K R						
DOM7r-15	I K R						
DOM7r-16	I K R						
DOM7r-17	I K R						
DOM7r-18	I K R						
DOM7r-19	I K R						
DOM7r-3	I K R						
DOM7r-4	I K R						
DOM7r-7	I K R						
DOM7r-5	V K R						
DOM7r-8	I K R						

Фиг. 51a (продолжение II)

Нумерация по Kabat	5	10	15	20	25	30	35							
<u>DOM7h-23</u>	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSLR	L	SCAA	S	GFTF	Y	DYNM	S
<u>DOM7h-21</u>	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSLR	L	SCAA	S	GFTF	D	LYDM	S
<u>DOM7h-22</u>	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSLR	L	SCAA	S	GFTF	S	KYWM	S
<u>DOM7h-24</u>	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSLR	L	SCAA	S	GFTF	H	RYSM	S
<u>DOM7h-25</u>	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSLR	L	SCAA	S	GFTF	W	KYNM	A
<u>DOM7h-26</u>	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSLR	L	SCTA	S	GFTF	D	EYNM	S
<u>DOM7h-27</u>	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSLR	L	SCAA	S	GFTF	S	DYRM	S
<u>DOM7h-30</u>	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSLR	L	SCAA	S	GFTF	R	TYTM	A
<u>DOM7h-31</u>	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSLR	L	SCAA	S	GFTF	R	PTNM	S

Нумерация по Kabat	40	45	50	54	59	64	69							
<u>DOM7h-23</u>	WVRO	A	PGKG	L	EWVS	T	IHTG	G	VITY	Y	ADSV	K	GRFT	I
<u>DOM7h-21</u>	WVRO	A	PGKG	L	EWVS	S	IYNS	G	VRTY	Y	ADSV	K	GRFT	I
<u>DOM7h-22</u>	WVRO	A	PGKG	L	EWVS	S	IDFM	G	PHTY	Y	ADSV	K	GRFT	I
<u>DOM7h-24</u>	WVRO	A	PGKG	L	EWVS	T	ILPG	G	DVEY	Y	ADSV	K	GRFT	I
<u>DOM7h-25</u>	WVRO	A	PGKG	L	EWVS	T	ILGE	G	QNTY	Y	ADSV	K	GRFT	I
<u>DOM7h-26</u>	WVRO	A	PGKG	L	EWVS	T	ILPH	G	DRTY	Y	ADSV	K	GRFT	I
<u>DOM7h-27</u>	WVRO	A	PGKG	L	EWVS	T	IISN	G	KFTY	Y	ADSV	K	GRFT	I
<u>DOM7h-30</u>	WVRO	A	PGKG	L	EWVS	S	ITSS	G	SSTY	Y	ADSV	K	GRFT	I
<u>DOM7h-31</u>	WVRO	A	PGKG	L	EWVS	T	ITGT	G	AATY	Y	ADSV	K	GRFT	I

Нумерация по Kabat	74	79	82b	86	91	96	100a							
<u>DOM7h-23</u>	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAD	D	TAVY	Y	CAKQ	N	PSYQ	-
<u>DOM7h-21</u>	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAD	D	TAVY	Y	CAKQ	N	QSYH	W
<u>DOM7h-22</u>	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAD	D	TAVY	Y	CAKQ	R	TSML	P
<u>DOM7h-24</u>	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAD	D	TAVY	Y	CAKQ	T	PDYM	-
<u>DOM7h-25</u>	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAD	D	TAVY	Y	CAKT	M	DXK	-
<u>DOM7h-26</u>	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAD	D	TAVY	Y	CAKQ	D	FLYR	-
<u>DOM7h-27</u>	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAD	D	TAVY	Y	CAKQ	D	WMYM	-
<u>DOM7h-30</u>	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAD	D	TAVY	Y	CARV	N	SLYK	-
<u>DOM7h-31</u>	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAD	D	TAVY	Y	CAKQ	N	SRYR	F

Нумерация по Kabat	100o	105	110				
<u>DOM7h-23</u>	---	F	DYWG	Q	GTLV	T	VSS
<u>DOM7h-21</u>	D---	F	DYWG	Q	GTLV	T	VSS
<u>DOM7h-22</u>	MKGK	F	DYWG	Q	GTLV	T	VSS
<u>DOM7h-24</u>	---	F	DYWG	Q	GTLV	T	VSS
<u>DOM7h-25</u>	---	F	DYWG	Q	GTLV	T	VSS
<u>DOM7h-26</u>	---	F	DYWG	Q	GTLV	T	VSS
<u>DOM7h-27</u>	---	F	DYWG	Q	GTLV	T	VSS
<u>DOM7h-30</u>	---	F	DYWG	Q	GTLV	T	VSS
<u>DOM7h-31</u>	---	D	YWGQ	G	TLVT	V	SSX

Фиг. 51a (продолжение III)

Нумерация по Kabat	5	10	15	20	25	30	35
<u>DOM7r-20</u>	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAASGPTFWPYTM S
<u>DOM7r-27</u>	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAASGPTFWPYTM S
<u>DOM7r-28</u>	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAASGPTFMAYQM A
<u>DOM7r-21</u>	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAASGPTFWPYTM S
<u>DOM7r-25</u>	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAASGPTFWPYTM S
<u>DOM7r-22</u>	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAASGPTFWPYTM S
<u>DOM7r-23</u>	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAASGPTFWPYTM S
<u>DOM7r-24</u>	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAASGPTFWPYTM S
<u>DOM7r-26</u>	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAASGPTFWPYTM S
<u>DOM7r-29</u>	EVQL	L	ESGG	G	LVQP	G	GSRLRLSCAASGPTFKDYDM T
Нумерация по Kabat	40	45	50	54	59	64	69
<u>DOM7r-20</u>	WVRQ	A	PKKG	L	EWVS	T	ISPPGSTTY YADSVKGRFT I
<u>DOM7r-27</u>	WVRQ	A	PKKG	L	EWVS	T	ISPPGSTTY YADSVKGRFT I
<u>DOM7r-28</u>	WVRQ	A	PKKG	L	EWVS	T	YHQTG ESTY YADSVKGRFT I
<u>DOM7r-21</u>	WVRQ	A	PKKG	L	EWVS	T	ISPPGSTTY YADSVKGRFT I
<u>DOM7r-25</u>	WVRQ	A	PKKG	L	EWVS	T	ISPPGSTTY YADSVKGRFT I
<u>DOM7r-22</u>	WVRQ	A	PKKG	L	EWVS	T	ISPPGSTTY YADSVKGRFT I
<u>DOM7r-23</u>	WVRQ	A	PKKG	L	EWVS	T	ISPPGSTTY YADSVKGRFT I
<u>DOM7r-24</u>	WVRQ	A	PKKG	L	EWVS	T	ISPPGSTTY YADSVKGRFT I
<u>DOM7r-26</u>	WVRQ	A	PKKG	L	EWVS	T	ISPPGSTTY YADSVKGRFT I
<u>DOM7r-29</u>	WVRQ	A	PKKG	L	EWVS	M	ISSGLWTTY YADSVKGRFT I
Нумерация по Kabat	74	79	82b	86	91	96	100a
<u>DOM7r-20</u>	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVY YCAKGGKDF -
<u>DOM7r-27</u>	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVY YCAKSDVLKT G
<u>DOM7r-28</u>	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVY YCAKVE SMRF Y
<u>DOM7r-21</u>	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVY YCAKGMLEPF -
<u>DOM7r-25</u>	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVY YCAKKTGPFSS Y
<u>DOM7r-22</u>	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVY YCAKKL SNGF -
<u>DOM7r-23</u>	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVY YCAKVYKDNT F
<u>DOM7r-24</u>	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVY YCAKNTGGKF F
<u>DOM7r-26</u>	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVY YCAKRTENRG V
<u>DOM7r-29</u>	SRDN	S	KNTL	Y	LQMN	S	LRAEDTAVY YCAKGFRLPF R
Нумерация по Kabat	100	105	110				
<u>DOM7r-20</u>	---	D	YWGQ	G	TLVT	V	SSX
<u>DOM7r-27</u>	---	D	YWGQ	G	TLVT	V	SSX
<u>DOM7r-28</u>	---	D	YWGQ	G	TLVT	V	SSX
<u>DOM7r-21</u>	---	D	YWGQ	G	TLVT	V	SSX
<u>DOM7r-25</u>	---	D	YWGQ	G	TLVT	V	SSX
<u>DOM7r-22</u>	---	D	YWGQ	G	TLVT	V	SSX
<u>DOM7r-23</u>	---	D	YWGQ	G	TLVT	V	SSX
<u>DOM7r-24</u>	---	D	YWGQ	G	TLVT	V	SSX
<u>DOM7r-26</u>	---	D	YWGQ	G	TLVT	V	SSX
<u>DOM7r-29</u>	---	D	YWGQ	G	TLVT	V	SSX

Фиг. 51a (продолжение IV)

dAb 2, 4, 7, 41

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASPLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTYSVPPTFGQGTKVEIKR

dAb 38, 54

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYRASPLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTYRIPPTFGQGTKVEIKR

dAb 46, 47, 52, 56

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSIKSLKWKYQQKPGKAPKLLIYNASPLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVYWPVPTFGQGTKVEIKR

dAb 13, 15

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSIYYHLKWKYQQKPGKAPKLLIYKSTLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVRKVPRTFGQGTKVEIKR

dAb 30, 35

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSIIRYLKWKYQQKPGKAPKLLIYQASVPLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGLYPPITFGQGTKVEIKR

dAb 19,

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSIYNWLKWKYQQKPGKAPKLLIYRASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQNVVPIPTFGQGTKVEIKR

dAb22

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSILWHLRWYQQKPGKAPKLLIYHASLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSAVYPTFGQGTKVEIKR

dAb23

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSIYRYLAWYQQKPGKAPKLLIYHASHLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQRLLYPTFGQGTKVEIKR

dAb24

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSIYHLAWYQQKPGKAPKLLIYPASLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQRARWPRTFGQGTKVEIKR

dAb31

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSIWHLNWKYQQKPGKAPKLLIYRASRLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVARVPRTFGQGTKVEIKR

dAb33

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSIYRYLRWKYQQKPGKAPKLLIYKASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYVGYPTFGQGTKVEIKR

dAb34

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSILKYLKWKYQQKPGKAPKLLIYNASHLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQTYYPTFGQGTKVEIKR

dAb53

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSILRYLRWKYQQKPGKAPKLLIYKASWLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQLYYPQTFGQGTKVEIKR

dAb11

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQSILRSLKWKYQQKPGKAPKLLIYAASRLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVYWPATFGQGTKVEIKR

Фиг. 51a (продолжение V)

dAb12

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQSI FRHLK WYQQKPGKAPKLLIYAASRLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQVALYPKTFGQGTKVEIKR

dAb17

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQSIRKYL R WYQQKPGKAPKLLIYTASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQLFWPRTFGQGTKVEIKR

dAb18

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQSIRRYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQLFYPKTFGQGTKVEIKR

dAb16, 21

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQSI IKHLK WYQQKPGKAPKLLIYGASRLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQGARWPQTFGQGTKVEIKR

dAb25, 26

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQSIYYHLK WYQQKPGKAPKLLIYKASTLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQVRKVPRTFGQGTKVEIKR

dAb27

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQSIYKHLK WYQQKPGKAPKLLIYNASHLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQVG RYPKTFGQGTKVEIKR

dAb55

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQSI F KSLK WYQQKPGKAPKLLIYNASYLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQVVYWPVTFGQGTKVEIKR

dAb 8, 10

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFWVYQMDWVRQAPGKGLEWVSSISAFGAKTL
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKLSGKFDYWGQGLTVTVSS

dAb 36

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFWSYQMTWVRQAPGKGLEWVSSISFSGSSTL
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKGRDHNYS LFDYWGQGLTVTVSS

Фиг. 51a (продолжение VI)

>DOM7h-1

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAGC AGCTATTTAA ATTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCGG AATTCCTTTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCC
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACGTATACTG TTCCTCCTAC GTTGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACAG

>DOM7h-10

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCACCTCC CTGTCCGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAGC AGCTATTTAA ATTGGTATCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCGG AATTCCTTTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGGTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACTTATTCGA TTCCTCCTAC GTTGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-11

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCG TCCGATTGGG ACGACGTAA GTTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTGGTTT GGTTCCTGGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTGCGCAG GCTGGGACGC ATCCTACGAC GTTGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-12

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTAA GTATATTGGT TCGCAGTAA ATTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCGCTTGG GCGTCCGTTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCTCAG GGTGCTGCGT CGCCTCGGAC GTTGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-13

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTTATTAT CGGTATTAT CGTGGTATCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGTCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT GCGTCTTATT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CATGCTCATT TGCCTCGTAC GTTGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

Фиг. 51b

>DOM7h-14

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTGGG TCTCAGTTAT CTTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCATGTGG CGTTCCTCGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT

GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTGCTCAG GGTGCGGCGT TGCCTAGGAC GTTGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

Фиг. 51b (продолжение I)

>DOM7h-2

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAAC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAAGATTGCT ACTTATTTAA ATTGGTATCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGTCCT GATCTATAGG TCTTCCTCTT TGCAAAGCGC GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGACAGTT TTCACACTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACGTATGCTG TTCCTCCTAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-3

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAAC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTGAT ACTGGGTTAG CGTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAGGTCCT GATCTATAAT GTGTCCAGGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATTGGGGTA GTCCTACGAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-4

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAAC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGAGATTAT TCGTGGTTAG CGTGGTACCA GCAGAGACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGTCCT GATCTATAAT GCTTCCCATF TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GTGATTGGTG ATCCTGTTAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-6

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAAC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAGC AGCTATTTAA ATTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTACGTCCT GATCTATCGG TTGTCCGTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACTTATAATG TTCCTCCTAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7h-7

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAAC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAGC AGCTATCTAA ATTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGTCCT GATCTATAGG AATCCCAGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACTTTTGGGG TTCCTCCTAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAGATCAA ACGG

Фиг. 51b (продолжение II)

>DOM7h-8

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAAC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTAGC AGCTATTTAA ATTGGTATCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGTCCT GATCTATCGG AATCCCCCTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACGTATAGGG TGCCCTCCTAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

Фиг. 51b (продолжение III)

>DOM7h-9

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAAC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GCATATTGGG TTGTGGTTAC ATTGGTATCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAGG TCTTCCTTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AAGTATAATT TGCCTTATAC GTCCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7m-12

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAAC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTTTT CGGCATTTAA AGTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGCG GCATCCCGTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GTTGGCTGT ATCCTAAGAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7m-16

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAAC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTATT AAGCATTTAA AGTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGGT GCATCCCGTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GGGGCTCGGT GGCCTCAGAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7m-26

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAAC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGCATTTAT TATCATTTAA AGTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAG GCATCCACGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG GTTCGGAAGG TGCCTCGGAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-1

GACATCCAGA CGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAAC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTATATTGGT AGGTATTTAC GTTGGTATCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT TCTTCCTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CGTTATCGTA TGCCTTATAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAGGG TAGAAATCAA ACGG

Фиг. 51b (продолжение IV)

>DOM7r-13

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAAC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GCATATTCAT AGGGAGTTAA GGTGGTATCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCAG GCGTCCCGTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AAGTATCTGC CTCCTTATAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

Фиг. 51b (продолжение V)

>DOM7r-14

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAAC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GCATATTCAT AGGGAGTTAA GGTGGTATCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCAG GCGTCCCGTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CGTTATAGGG TGCCTTATAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-15

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAAC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAGTATTGGG CGGAGGTTAA AGTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGGACAGCCC CTAGGCTCCT GATCTATCGT ACGTCCCTGGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACGTCCGAGT GGCCTCATACT GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-16

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAAC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAAGATTTAT AAGAATTTAC GTTGGTATCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT TCTTCCATTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AGGTATCTGT CGCCTTATAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-17

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAAC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GAAGATTTAT AATAATTTAA GGTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT ACTTCCATTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CGATGGCGTG CGCCTTATAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-18

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAAC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTTAT AAGTCGTTAG GGTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATCAG TCTTCTTTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG TATCATCAGA TGCCTCGGAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

Фиг. 51b (продолжение VI)

>DOM7r-19

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTATCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCAAC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTTAT AGGCATTTAA GGTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT GCGTCCAGGT TGCAAAGTGG GGTCCCAACA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACTCATAATC CTCCTAAGAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

Фиг. 51b (продолжение VII)

>DOM7r-3

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTATATTGGT AGGTATTTAC GTTGGTATCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT TCTTCCGTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AGGTATATGC AGCCTTTTAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-4

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCCGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTGGT CGGTATTTAC GGTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATAAT GGGTCCAGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CGGTATCTTC AGCCTTATAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

>DOM7r-7

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTATATTGGT AGGTATTTAC GTTGGTATCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGAT TCTTCCGTGT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG CGTTATTCTT CGCCTTATAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA GCGG

>DOM7r-5

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTATATTTTG CGTCAGTTAA GGTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAGGCTCCT GATCTATGGG GCGTCCGTTT TGCAAAGCGG GATCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG AGGTATATTA CTCCTTATAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAAGTCAA ACGG

>DOM7r-8

GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA CCGTGTCCACC
 ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GTGGATTTCAT AGGCAGTTAA AGTGGTACCA GCAGAAACCA
 GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATTAT GCTTCCATTT TGCAAAGTGG GGTCCCATCA
 CGTTTCAGTG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG TCTGCAACCT
 GAAGATTTTG CTACGTACTA CTGTCAACAG ACGTTTCTA AGCCTTCTAC GTTCGGCCAA
 GGGACCAAGG TGGAAATCAA ACGG

Фиг. 51b (продолжение VIII)

>DOM7h-23

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACSTTTTAT GATTATAATA TGTCTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTACGCATA CGGGTGGGGT TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTA CTGTGC GAAACAGAAT
 CCTTCTTATC AGTTTGA CTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC

Фиг. 51b (продолжение IX)

>DOM7h-21

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTGAT CTTTATGATA TGTCGTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCG ATTGTAAATT CGGGTGTAG GACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACTTAAT
 CAGAGTTATC ATTGGGATTT TGACTACTGG GGTACAGGAA CCCTGGTAC CGTCTCGAGC

>DOM7h-22

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCG AAGTATGGA TGTCGTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCT ATTGATTTTA TGGGTCCGCA TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGGAGG
 ACGTCGATGT TGCCGATGAA GGGGAAGTTT GACTACTGGG GTCAGGGAAC CCTGGTCCAC
 GTCTCGAGC

>DOM7h-24

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCA CGTTATTCGA TGTCTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTGCTCG GTGGTGATGT TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACAGAGC
 CTTGATTATA TGTTTGAATA CTGGGGTCAG GGAACCTGG TCACCGTCTC GAGC

>DOM7h-25

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG AAGTATAATA TGGCGTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTCTTGGTG AGGGTAATAA TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAACGATG
 GATTATAAGT TTGACTACTG GGTCAGGGA ACCCTGGTCA CCGTCTCGAG C

>DOM7h-26

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTACAG CCTCCGGATT CACCTTTGAT GAGTATAATA TGTCGTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTCTGCCGC ATGGTGATCG GACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAACAGGAT
 CCTTTGATA GGTTTGAATA CTGGGGTCAG GGAACCTGG TCACCGTCTC GAGC

Фиг. 51b (продолжение X)

>DOM7h-27

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCG GATTATCGGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTATTTTCA ATGGTAAGTT TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACAGGAT
 TGGATGTATA TGTTTACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC

>DOM7h-30

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCG ACGTATACTA TGGCTTGGGT CCGCCAGGCC
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCATCG ATTACTAGTA GTGGTTCTTC TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGTGAAT
 TCTTTGTATA AGTTTACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGC

>DOM7h-31

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTCG CCGACTAATA TGTCGTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTACTGGTA CTGGTGCTGC GACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAACAGAAT
 TCTCGTTATA GGTTTACTA CTGGGGTCAG GGAACCCTGG TCACCGTCTC GAGCG

>DOM7r-20

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTCCGCCG TTGGTTCGAC TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGGGGG
 AAGGATTTT ACTACTGGGG TCAGGGAACC CTGGTCACCG TCTCGAGCG

>DOM7r-27

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTCCGCCG TTGGTTCGAC TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGTGAAT
 GTTCTTAAGA CCGGTCTGGA TGGTTTTGAC TACTGGGGTC AGGGAACCCT GGTACCGTCTC
 TCGAGCG

Фиг. 51b (продолжение XI)

>DOM7r-28

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTATG GCGTATCAGA TGGCTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACT ATTCATCAGA CCGGTTTTTC TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGTGCCT
 TCTATGCGTC CTTATAAGTT TGACTACTGG GGTCAAGGAA CCCTGGTTCAC CGTCTCGAGC
 G

>DOM7r-21

GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTCCGCCG TTGGTTCGAC TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCCGCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGTGAAT
 CTTGAGCCGT TTGACTACTG GGGTCAGGGA ACCCTGGTCA CCGTCTCGAG CG

Фиг. 51b (продолжение XII)

>DOM7r-25
 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTCCGCCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCC GCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAAGACG
 GGTCCGTCGT CGTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCTGG TCACCCTCTC GAGCG

>DOM7r-22
 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGT TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTCCGCCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCC GCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAT ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAAGCTT
 AGTAATGGTT TTAGTACTG GGGTCAGGGA ACCCTGGTCA CCGTCTCGAG CG

>DOM7r-23
 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTCCGCCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCC GCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGTGGTT
 AAGGATAATA CGTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCTGG TCACCCTCTC GAGCG

>DOM7r-24
 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTCCGCCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATT TCCC GCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAATACT
 GGGGGTAAGC AGTTGACTA CTGGGGTCAG GGAACCTGG TCACCCTCTC GAGCG

>DOM7r-26
 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTTGG CCGTATACGA TGAGTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAACG ATTTCCGCCGT TTGGTTCGAC TACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATT TCCC GCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAAATACT
 GAGAAATAGG GGGTTTCTTT TGA TACTG GGT CAGGAA CCCTGGT CAC CGTCTCGAGC
 G

Фиг. 51b (продолжение XIII)

>DOM7r-29
 GAGGTGCAGC TGTTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC CTGGGGGGTC CCTGCGTCTC
 TCCTGTGCAG CCTCCGGATT CACCTTTAAG GATTATGATA TGA TTTGGGT CCGCCAGGCT
 CCAGGGAAGG GTCTAGAGTG GGTCTCAATG ATTTCTTCGT CCGGTCTTTG GACATACTAC
 GCAGACTCCG TGAAGGGCCG GTTCACCATC TCCC GCGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTAT
 CTGCAAATGA ACAGCCTGCG TGCCGAGGAC ACCGCGGTAT ATTACTGTGC GAAAGGTTTT
 AGGCTGTTTT CTCGGACTTT TGA TACTG GGT CAGGAA CCCTGGT CAC CGTCTCGAGC
 G

Фиг. 51b (продолжение XIV)

Перечень последовательностей

<110> Домантис Лимитед
Йесперс, Лорен
Пупека, Мальгорзата
Томлинсон, Айан
Эневер, Кэролин

<120> ПОЛИПЕПТИДЫ, ВАРИАБЕЛЬНЫЕ ДОМЕНЫ АНТИТЕЛ И АНТАГОНИСТЫ

<130> D0056

<150> US 60/933,632
<151> 2007-06-06

<150> GB 0724331.4
<151> 2007-12-13

<160> 235

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 109
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> pDOM13

<400> 1
taatgttatt taaatcatta tcaaaattag caaccgcagc agcatttttt gcaggcgtgg 60
caacagcgtc gacacactgc aggaggcggc cgcagaaact gttgaacgt 109

<210> 2
<211> 119
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 2
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala His Glu
20 25 30
Thr Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser His Ile Pro Pro Val Gly Gln Asp Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Leu Leu Pro Lys Arg Gly Pro Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 3
<211> 108
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 3
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Tyr Leu Asn
 20 25 30
 Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Asn Phe Gly Ser Glu Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Pro Ser Phe Tyr Phe Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 4
 <211> 116
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Ala Tyr
 20 25 30
 Pro Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Glu Ile Ser Pro Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asp Pro Arg Lys Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 5
 <211> 108
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 5
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly Pro Glu
 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr His Thr Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Met Phe Gln Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Arg Arg
 100 105

<210> 6

<211> 358
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc atggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttgcg catgagacga tgggtgtgggt ccgccaggct 120
 ccaggaaggt gtctagagtg ggtctcacat attcccccg tgggtcagga tcccttctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcgggat attactgtgc gctgcttcct 300
 aagagggggc cttggtttga ctactggggt cagggaaacc tggtcaccgt ctcgagcg 358

<210> 7
 <211> 358
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cgcctttgcg catgagacga tgggtgtgggt ccgccaggct 120
 ccaggaaggt gtctagagtg ggtctcacat attcccccg tgggtcagga tcccttctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg agccgaggac acagcgggat attactgtgc gctgcttcct 300
 aagagggggc cttggtttga ctactggggt cagggaaacc tggtcaccgt ctcgagcg 358

<210> 8
 <211> 358
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt caactttgcg catgagacga tgggtgtgggt ccgccaggct 120
 ccaggaaggt gtctagagtg ggtctcacat attcccccg tgggtcagga tcccttctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcgggat attactgtgc gctgcttcct 300
 aagagggggc cttggtttga ctactggggt cagggaaacc tggtcaccgt ctcgagcg 358

<210> 9
 <211> 358
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttgcg catgagacga tgggtgtgggt ccgccaggct 120
 ccaggaaggt gtctagagtg ggtctcacat attcccccg tgggtcagga tcccttctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgacg attccaagaa cacgctatat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcgggat attactgtgc gctgcttcct 300
 aagagggggc cttggtttga ctactggggt cagggaaacc tggtcaccgt ctcgagcg 358

<210> 10
 <211> 358
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 10
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttgcg catgagacga tgggtgtgggt ccgccaggct 120
 ccaggaaggt gtctagagtg ggtctcacat attcccccg tgggtcagga tcccttctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
 ctgcaaatga acaacctgcg cgccgaggac acagcgggat attactgtgc gctgcttcct 300
 aagagggggc cttggtttga ctactggggt cagggaaacc tggtcaccgt ctcgagcg 358

<210> 11
 <211> 358
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttgcg catgagacga tgggtgtgggt ccgccaggcc 120
 ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcacat attcccccg cgggtcagga tcccttctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagag cacgctatat 240
 ctgcaaatga acggcctgcg tgccgaggac acagcgggat attactgtgc gctgcttcc 300
 aagagggggc cttggtttga ctactgggggt cagggaaacc tggtcacctg ctcgagcg 358

<210> 12
 <211> 358
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtaaagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttgcg catgagacga tgggtgtgggt ccgccaggct 120
 cctgggaagg gtctagagtg ggtctcacat attcccccg cgggtcagga tcccttctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcgggat attactgtgc gctgcttcc 300
 aagagggggc cttggtttga ctactgggggt cagggaaacc tggtcacctg ctcgagcg 358

<210> 13
 <211> 358
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttgcg catgagacga tgggtgtgggt ccgccaggcc 120
 ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcacat attcccccg acggtaagaa tcccttctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcgggat attactgtgc gctgcttcc 300
 aagagggggc cttggtttga ctactgggggt cagggaaacc tggtcacctg ctcgagcg 358

<210> 14
 <211> 358
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttgcg catgagacga tgggtgtgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcacat attcccccg atggtcagga tcccttctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcgggat attactgtgc gctgcttcc 300
 aagagggggc cttggattga ctactgggggt cagggaaacc tggtcacctg ctcgagcg 358

<210> 15
 <211> 358
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 gaggtgcagc tgtcggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttgcg catgagacga tgggtgtgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcacat attccccag atggtcagga tcccttctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcgggat attactgtgc gctgcttcc 300
 aatagggggc cttggtttga ctactgggggt cagggaaacc tggtcacctg ctcgagcg 358

<210> 16
 <211> 358
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttgcg catgagacga tgggtgaggc ccgccaggct 120
 ccaggaagg gtctagagt ggtctcacat attcccccg atggtcagga tcccttctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcggat attactgtgc gctgcttcc 300
 aagagggggc cttggtttga ctactggggt caggaaccc aggtcaccgt ctcgagcg 358

<210> 17
 <211> 358
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 gaggtgcggc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtacag cctccggatt cacctttgcg catgagacga tgggtgaggc ccgccaggct 120
 ccaggaagg gtctagagt ggtctcacat attcccccg atggtcagga tcccttctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
 ctgcagatga acagcctgcg tgccgaggac acagcgggt attactgtgc gctgcttcc 300
 aagagaaggc cttggtttga ctactggggt caggaaccc aggtcaccgt ctcgagcg 358

<210> 18
 <211> 358
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 gaggtgcggc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgaggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtcag cctccggatt cacctttgcg catgagacga tgggtgaggc ccgccaggct 120
 ccaggaagg gtctagagt ggtctcacat attcccccg atagccagga tcccttctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcgggt attactgtgc gctgcttcc 300
 aagagggggc cttggtttga ctacaggggt caggaaccc tggtcaccgt ctcgagcg 358

<210> 19
 <211> 358
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtcag cctccggatt caccattgcg catgaaacga tgggtgaggc ccgccaggct 120
 ccaggaagg gtctagagt ggtctcacat attcccccg ttggtcagga tcccttctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcgggt attactgtgc gctgcttcc 300
 aagagggggc cttggtttga ctaccggggt caggaaccc tggtcaccgt ctcgagcg 358

<210> 20
 <211> 358
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtcag cctccggatt cacctttgcg catgagacga tgggtgaggc ccgccaggct 120
 ccaggaagg gtctagagt ggtctcacat attcctccg ttggtcagga tcccttctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcgggt attactgtgc gctgcttcc 300

aagagggggc cttggtttga ctactggggg cagggaaacct tggtcaccgt ctcgagcg 358

<210> 21
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggagc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttgcg catgagacga tgggtgtgggt ccgccaggca 120
 ccagggaaag gtctagagtg ggtctcacat attcccccg atggtcagga tcccttctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcggtat attactgtgc gctgcttctc 300
 aagagggggc cttggtttga ctactggggg cagggaaacc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 22
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggagc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttgcg catgagacga tgggtgtgggt ccgccaggct 120
 ccagggaaag gtctagagtg ggtctcacat attcccccg atggtcagga tcccttctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcggtat attactgtgc gctgcttctc 300
 aagagggggc cttggtttga ctactggggg cagggaaacc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 23
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggagc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag ccaccggatt cacctttgcg catgagacga tgggtgtgggt ccgccaggct 120
 ccagggaggg gtctagagtg ggtctcacat attcccccg atggtcagga tcccttctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcggtat attactgtgc gctgcttctc 300
 aagagggggc cttggtttga ctactggggg cagggaaacc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 24
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggagc ctggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttgcg catgagacga tgggtgtgggt ccgccaggct 120
 ccagggaggg gtctagagtg ggtctcacat attccctcgg atggtcagga tcccttctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcggtat attactgtgc gctgcttctc 300
 aagagggggc cttggttcga ctactggggg cagggaaacc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 25
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggagc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttgcg catgagacga tgggtgtgggt ccgccaggct 120
 ccagggaaag gtctagagtg ggtctcacat attcccccg atggtcagga tcccttctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240

ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcgggat attactgtgc gctgcttcc 300
 aagaaggggc cttggtttga ctactggggt caggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 26
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggagc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttgcg cgtgagacga tgggtgaggc cgcaccaggc 120
 ccagggaaag gtctagagtg ggtctcacat attcccccg tgggtcagga tcccttctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcgggat attactgtgc gctgcttcc 300
 aagaaggggc cttggtttga ctactggggt caggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 27
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggagc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttgcg caagagacga tgggtgaggc cgcaccaggc 120
 ccagggaaag gtctagagtg ggtctcacat attcccccg tgggtcagga tcccttctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaagac acagcgggat attactgtgc gcgcttcc 300
 aagaaggggc cttggtttga ctactggggt caggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 28
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggagc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttgcg catgagacga tgggtgaggc cgcaccaggc 120
 ccagggaaag gtctagagtg ggtctcacat attcccccg tgggtcagga tcccttctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcgggat attactgtgc gctgcttcc 300
 aagaaggggc cttggtttga ctactggggt caggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 29
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 29
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggagc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttgcg catgagacga tgggtgaggc cgcaccaggc 120
 ccagggaaag gtctagagtg ggtctcacat attcccccg ctggtcagga tcccttctac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctatat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcgggat attactgtgc gcgcttcc 300
 aagaaggggc cttggtttga ctactggggt caggaaccc tggtcaccgt ctcgagc 357

<210> 30
 <211> 325
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 30
 gacatcctga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
 ggaagggccc ctaagctcct gatcaatctt ggttccgagt tgcaaaagtgg tgtcccatca 180

```

cgtttcagtg gcagtgata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatgtcg ctacgtacta ctgtcaaccg tctttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acggg 325

```

```

<210> 31
<211> 325
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 31
gacatcctga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt gggtccagtg tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtgata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tctttttact tcccttatac gttcggccag 300
gggaccaagg tggaaatcaa acggg 325

```

```

<210> 32
<211> 325
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 32
gacatccaga cgaccagtc tccgtcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac cagaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt gggtccagtg tgcaaagtgg tgtcccatct 180
cgtttcagtg gcagtgata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tctttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acggg 325

```

```

<210> 33
<211> 325
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 33
gacatccagg tgaccagtc tccatccacc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaacttt gggtccagtg tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtgata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tctttttact tcccttatac gttcggccga 300
gggaccaagg tggaaatcaa acggg 325

```

```

<210> 34
<211> 325
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 34
gacatccaga tgaccagtc tccatccttc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac cagaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt gggtccagtg tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtgata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatatcg ctacgtacta ctgtcaaccg tctttttact tcccttatac gtttggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa agggg 325

```

```

<210> 35
<211> 325
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 35
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtcggcat ctgaaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac cagaatttag actggtatca gcagaaacca 120

```

```

gggaaagccc ctaagctcct gatcaatfff ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtgata tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagacttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tctttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acggg 325

```

```

<210> 36
<211> 325
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 36
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
gtcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatfff ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtgata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tctttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acggg 325

```

```

<210> 37
<211> 325
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 37
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctggatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatfff ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtgata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tctttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaggg tggaaatcaa acggg 325

```

```

<210> 38
<211> 325
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 38
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcagtttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtgata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tctttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acggg 325

```

```

<210> 39
<211> 325
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 39
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaaatfff ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtgata tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tctgcaacct 240
gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tctttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa atggg 325

```

```

<210> 40
<211> 325
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 40
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60

```

```

atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcatttat ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccacca 180
cgtttcagtg gcagtgata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattccg ctacgtacta ctgtcaaccg tctttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acggg 325

```

```

<210> 41
<211> 325
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 41
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatatac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccacca 180
cgtttcagtg gcagtgata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tctttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acagg 325

```

```

<210> 42
<211> 325
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 42
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccacca 180
cgtttcagtg gcagtgata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tctttttact tccatatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acagg 325

```

```

<210> 43
<211> 325
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 43
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcact 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccacca 180
cgtttcagtg gcagtgata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatgtcg ctacgtacta ctgtcaaccg tctttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acggg 325

```

```

<210> 44
<211> 325
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 44
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccacca 180
cgtttcagtg gcagtgata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagacttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tctttttact tccatatac gtttggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acagg 325

```

```

<210> 45
<211> 325
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 45

```

```

gacatccaaa tggcccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccggtgcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttgg actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcagtttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccacagcag tctgcaacct 240
gaagattccg ctacgtacta ctgtcagccg tctttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acagg                                     325

```

```

<210> 46
<211> 325
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 46
gacatccaga tgaccagtc accatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccggtgcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggacatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccacagcag tctgcaacct 240
gaagattccg ctacgtacta ctgtcaaccg tctttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acggg                                     325

```

```

<210> 47
<211> 324
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 47
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccggtgcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccacagcag tctgcaacct 240
gaagattccg ctacgtacta ctgtcaaccg tctttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa actg                                     324

```

```

<210> 48
<211> 324
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 48
gacatccaga taaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccggtgcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccacagcag tctgcaacct 240
gaagattccg ctacgtacta ctgtcaaccg tctttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa accg                                     324

```

```

<210> 49
<211> 324
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 49
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccggtgcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccacagcag tctgcaacct 240
gaagattccg ctacgtacta ctgtcaaccg tctttttact acccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acag                                     324

```

```

<210> 50
<211> 324
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

<400> 50
gacatccaga tgacacagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atctcttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcagtttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgttccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcagcct 240
gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tctttttact acccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 51
<211> 324
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 51
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgttccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tctttttact acccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 52
<211> 324
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 52
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt ggttccgagt tgcaaagtgg agtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tctttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa tcgg 324

<210> 53
<211> 324
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 53
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat atgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcagtttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg gtacgtacta ctgtcaaccg tctttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 54
<211> 324
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 54
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaatttt ggttccgagt tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg gtacgtacta ctgtcaaccg tctttttact tcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 55
<211> 324
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 55
gacatccaga tgaccagtc tccgtcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccttgtcacc 60
atcaactggcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcaattta ggttccagat tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtgata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaaccg tcttttact tccottatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgt 324

<210> 56
<211> 324
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 56
gacatcctga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccttgtcacc 60
atcaactggcc gggcaagtca ggatatttac ctgaatttag actggtatca gcagaaacca 120
gggaaggccc ctaagctcct gatcaattta ggttccagat tgcaaagtgg tgtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtgata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatgtcg ctacgtacta ctgtcaaccg tcttttact tccottatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 57
<211> 348
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 57
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcagag atttgcctt cgggttctta tacatactac 180
gcagactccg tgaaggcccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acccggtat attactgtgc gaaagatcct 300
cggaagtttg actactgggg tcagggaaacc ctggtcaccg tctcgagc 348

<210> 58
<211> 348
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 58
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtccagagtg ggtctcagag atttgcctt cgggttctta tacatactac 180
gcagactccg tgaaggcccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acccggtat attactgtgc gaaagatcct 300
cggaagtttg actactgggg tcagggaaacc ctggtcaccg tctcgagc 348

<210> 59
<211> 348
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 59
gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtccagagtg ggtctcagag atttgcctt cgggttctta tacatactac 180
gcagactccg tgaaggcccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cgcgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acccggtat attactgtgc gaaagatcct 300
cggaagtttg actactgggg tcagggagcc ctggtcaccg tctcgagc 348

<210> 60
<211> 348
<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 60

```
gaggtgcagc tgttggtgtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagt gatctcagag atttcgcctt cgggttctta tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc aaaagatcct 300
cggaagtttg actactgggg tcaggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348
```

<210> 61

<211> 348

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 61

```
gaggtgcagc tgctgggtgtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagt ggtctcagag atttcgcctt cgggttctta tacatactat 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagatcct 300
cggaagtttg aatactgggg tcaggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348
```

<210> 62

<211> 348

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 62

```
gaggtgcagc tgttggtgtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagt ggtctcagag atttcgcctt cgggttctta tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaatgatcct 300
cggaagtttg actactgggg tcaggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348
```

<210> 63

<211> 348

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 63

```
gaggtgcagc tgttggtgtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacatttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagt ggtctcagag atttcgcctt cgggttctta tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acggcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaacgatcct 300
cggaagattg actactgggg tcaggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348
```

<210> 64

<211> 348

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 64

```
gaggtgcagc tgttggtgtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccaggaagg gtctagagt ggtctcagag atttcgcctt cgggttctta tacatactac 180
gcatactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgca tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagatcct 300
cggaagttag actactgggg tcaggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348
```

<210> 65

<211> 348

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 65

```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc cagggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgctg cctccggatt cacctttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccaggggaaga gtctagagtg ggtctcagag atttcgcctt cgggttctta tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcacaatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagatcct 300
cggaagattg actactgggg tcaggggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348

```

<210> 66

<211> 348

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 66

```

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcagag atttcgcctt cgggttctta tacatactac 180
gcagagtccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtac gaaagatcct 300
cggaagtttg actactgggg tcaggggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348

```

<210> 67

<211> 348

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 67

```

gaggtgcagt tgttgggtgc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcagag atttcgcctt cgggttctta tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatt tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagatcct 300
cggaagtttg actactgggg tcaggggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348

```

<210> 68

<211> 348

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 68

```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcagag atttcgcctt cgggttctta tacatactac 180
gcaaaactccg tgaagggctg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagatcct 300
cggaagattg actactgggg tcaggggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348

```

<210> 69

<211> 348

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 69

```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcagag atttcgcctt cgggttctta tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagatcct 300
cggaagtctg actactgggg tcaggggaacc ctggtcaccg tctcgagc 348

```

<210> 70

<211> 348
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 70
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
 ccagggaaagg gtctagagtg ggtctcagag atttcgcctt cgggttctta tacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagatcct 300
 cggaagattg actactgggg tcagggaaacc ctggtcaccg tctcgagc 348

<210> 71
 <211> 348
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 71
 gaggtgcac c tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
 ccagggaaagg gtctagagtg ggtctcagag atttcgcctt cgggttctta tacatactac 180
 gcaaaactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagatcct 300
 cggaagattg actactgggg tcagggaaacc ctggtcaccg tctcgagc 348

<210> 72
 <211> 348
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 72
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
 ccagggaaagg gtctagagtg ggtctcagag atttcgcctt cgggttctta tacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagatcct 300
 cggaagttag actactgggg tcagggaaacc ctggtcaccg tctcgagc 348

<210> 73
 <211> 348
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 73
 gaggtgcagc tgttgggtgc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
 ccagggaaagg gtctagagtg ggtctcagag atttcgcctt cgggttctta tacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtac gaaagatcct 300
 cggaagtttg actactgggg tcagggaaacc ctggtcaccg tctcgagc 348

<210> 74
 <211> 348
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 74
 gaggtgcagc tgttgggtgc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttaag gcttatccga tgatgtgggt ccgccaggct 120
 ccagggaaagg gtctagagtg ggtttcagag atttcgcctt cgggttctta tacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagatcct 300
 cggaagtttag actactgggg tcagggaaacc ctggtcaccg tctcgagc 348

<210> 75
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 75
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gtggattggt cgggagttaa gttggtacca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatcat acgtccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttc agcctaggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcag acgg 324

<210> 76
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 76
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gtggattggt cgggagttaa gttggtacca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagcgcct gatctatcat tctgccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttg agcctaggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcag acag 324

<210> 77
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 77
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
 atcacttgte gggcaagtca gtggattggt cgggagttaa gatggtacca gaagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatcat acgtccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttc agcctaggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcag acgg 324

<210> 78
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 78
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gtggattggt cgggagttaa gttggtacca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagcacct gatctatcat acgtccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttc agcctaagac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcag atgg 324

<210> 79
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 79
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gtggattggt cctgagttaa gatggtacca gaagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatcat acgtccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactttca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttc agcctaggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaattag acgg 324

<210> 80
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 80
 gacatccaga tgaaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gtggattggc cggaggttaa gttggtacca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatcat acgtccattt tgcaaatggg ggtcccatct 180
 cgtttcagtg gcagtggtgc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatthtg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttc agcctaggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcag atgg 324

<210> 81
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 81
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gtggattggc cggaggttaa gttggtacca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatcat acgtccattt tacagagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggtgc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gcagatthtg caacgtacta ctgtcaacag tatatgtttc agcctaggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcag acag 324

<210> 82
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 82
 gacatccaga tgaccagtc cccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gtggattggc cggaggttaa gttggtacca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatcat acgtccattt tgcaaatggg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggtgc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatthtg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttc ggcctaggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcag acaa 324

<210> 83
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 83
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtccgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gtggattggc cggaggttaa gttggtacca gcagaaacca 120
 gggaaagctc ctaagctcct gatctatcat acgtccattt tgcaaatggg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggtgc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatthtg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttc tgctaggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcag aggg 324

<210> 84
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 84
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gtggattggc cggaggttaa gttggtacca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagttcct gatctatcat acgtccattt tgcaaatggg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggtgc tgggacagat ttcactctca ccatcaacag tctgcaacct 240
 ggagatthtg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttc agcctaggac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcag acgg 324

<210> 85
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 85
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccggtgcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gtggattggc cggaggttaa gttggtacca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatcat acgtccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtatc agcctaggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcag acag 324

<210> 86
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 86
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccggtgcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gtggattggc cggaggttaa gatggtacca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatcat acgtccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttc agcctatgac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcag aggg 324

<210> 87
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 87
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccggtgcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gtggattggc cggaggttaa gatggtacca gaagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatcat acgtccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaagct 240
 gaagattctg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttc agcctaggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaaccag acgg 324

<210> 88
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 88
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgaaggaga ccggtgcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gtggattggc cggaggttaa gttggtacca gcagaaacca 120
 cggaaagccc ctaagctcct gatctatcat acgtccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcactg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttc agcctatgac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcag acgg 324

<210> 89
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 89
 gacatcctga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccggtgcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gtggattggc cggaggttac gttggtacca gcataaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatcat acgtccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggata tgggacagat ttcactctct ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagatttcg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttc agcctaggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcag atgg 324

<210> 90
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 90
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gtggattggt cggagttac gttggtacca gcagaaacca 120
 gggaaagccc caaagctcct gatctatcat acgtccattt tgcaagggtg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaggattttg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttt ggcctaggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcag acag 324

<210> 91
 <211> 300
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 91
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gtggattggt cggagttac gttggtacca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatcat acgtccattt tgcaagggtg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag tatatgtttc agcctatgac gttcggccaa 300

<210> 92
 <211> 22
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Gas leader sequence

<400> 92
 Met Leu Phe Lys Ser Leu Ser Lys Leu Ala Thr Ala Ala Ala Phe Phe
 1 5 10 15
 Ala Gly Val Ala Thr Ala
 20

<210> 93
 <211> 8
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Последовательность Gene III

<400> 93
 Ala Ala Ala Glu Thr Val Glu Ser
 1 5

<210> 94
 <211> 108
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<400> 94
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

018723

```

1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
                20                25                30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
                35                40                45
Tyr Arg Asn Ser Phe Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
                50                55                60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                70                75                80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Thr Val Pro Pro
                85                90                95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gln
                100                105

```

<210> 95
 <211> 108
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 95
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
                20                25                30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
                35                40                45
Tyr Arg Asn Ser Pro Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
                50                55                60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                70                75                80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Ile Pro Pro
                85                90                95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
                100                105

```

<210> 96
 <211> 108
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 96
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Pro Ile Gly Thr Thr
                20                25                30
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
                35                40                45
Trp Phe Gly Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
                50                55                60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                70                75                80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Ala Gly Thr His Pro Thr
                85                90                95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
                100                105

```

<210> 97
 <211> 108
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 97
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Lys Tyr Ile Gly Ser Gln
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Ala Trp Ala Ser Val Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Arg Gln Gly Ala Ala Ser Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 98
 <211> 108
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 98
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Phe Ile Tyr Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asn Ala Ser Tyr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Ala His Leu Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 99
 <211> 108
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 99
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly Ser Gln
 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Met Trp Arg Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly Ala Ala Leu Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 100
 <211> 108
 <212> NPPT

<213> Homo sapiens

<400> 100

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10          15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ala Thr Tyr
 20           25           30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35           40           45
Tyr Arg Ser Ser Ser Leu Gln Ser Ala Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Val Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Ala Val Pro Pro
 85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100          105

```

<210> 101

<211> 108

<212> PPT

<213> Homo sapiens

<400> 101

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10          15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Asp Thr Gly
 20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35           40           45
Tyr Asn Val Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Gly Ser Pro Thr
 85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100          105

```

<210> 102

<211> 108

<212> PPT

<213> Homo sapiens

<400> 102

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10          15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Tyr Ser Trp
 20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35           40           45
Tyr Asn Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Ile Gly Asp Pro Val
 85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100          105

```

<210> 103

<211> 108
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 103
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Thr Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Leu Ser Val Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Asn Val Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 104
 <211> 108
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 104
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Asn Ser Gln Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Phe Ala Val Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 105
 <211> 108
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 105
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Asn Ser Pro Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Arg Val Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 106
 <211> 108
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 106
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile Gly Leu Trp
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Ser Ser Leu Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Lys Tyr Asn Leu Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Ser Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 107
 <211> 108
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 107
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Phe Arg His
 20 25 30
 Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Ala Leu Tyr Pro Lys
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105
 100 105

<210> 108
 <211> 108
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 108
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ile Lys His
 20 25 30
 Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Arg Trp Pro Gln
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 109
 <211> 108
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 109
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Tyr His
 20 25 30
 Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Arg Lys Val Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 110
 <211> 108
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 110
 Asp Ile Gln Thr Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Gly Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ser Ser Val Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Arg Met Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 111
 <211> 108
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 111
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile His Arg Glu
 20 25 30
 Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gln Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Lys Tyr Leu Pro Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 112
 <211> 108
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 112
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile His Arg Glu
 20 25 30
 Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gln Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Arg Val Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 113
 <211> 108
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 113
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Arg Arg
 20 25 30
 Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ala Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Arg Thr Ser Trp Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Ser Gln Trp Pro His
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 114
 <211> 108
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 114
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Tyr Lys Asn
 20 25 30
 Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asn Ser Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Leu Ser Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 115
 <211> 108
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 115
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Tyr Asn Asn
 20 25 30
 Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asn Thr Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Trp Arg Ala Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 116
 <211> 108
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 116
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Tyr Lys Ser
 20 25 30
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gln Ser Ser Leu Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Gln Met Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 117
 <211> 108
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 117
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Tyr Arg His
 20 25 30
 Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr His Asn Pro Pro Lys
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 118
 <211> 108
 <212> PPT
 <213> Homo sapiens

<400> 118
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Gly Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ser Ser Val Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Met Gln Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 119
 <211> 108
 <212> PPT
 <213> Homo sapiens

<400> 119
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asn Gly Ser Gln Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Leu Gln Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 120
 <211> 108
 <212> PPT
 <213> Homo sapiens

<400> 120
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Gly Arg Tyr
 20 25 30

Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ser Ser Val Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Ser Ser Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 121
 <211> 108
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 121
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Arg Gln
 20 25 30
 Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Val Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Ile Thr Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys Arg
 100 105

<210> 122
 <211> 108
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 122
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile His Arg Gln
 20 25 30
 Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Tyr Ala Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Phe Ser Lys Pro Ser
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 123
 <211> 118
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 123
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Tyr Asp Tyr
 20 25 30
 Asn Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Thr His Thr Gly Gly Val Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gln Asn Pro Ser Tyr Gln Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 124
 <211> 120
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 124
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Leu Tyr
 20 25 30
 Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Val Asn Ser Gly Val Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Leu Asn Gln Ser Tyr His Trp Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 125
 <211> 123
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 125
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr
 20 25 30
 Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Asp Phe Met Gly Pro His Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Arg Thr Ser Met Leu Pro Met Lys Gly Lys Phe Asp Tyr
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 126
 <211> 118
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 126
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe His Arg Tyr
 20 25 30
 Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Leu Pro Gly Gly Asp Val Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gln Thr Pro Asp Tyr Met Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 127
 <211> 117
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 127
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Trp Lys Tyr
 20 25 30
 Asn Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Leu Gly Glu Gly Asn Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Thr Met Asp Tyr Lys Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 128
 <211> 118
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 128
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Glu Tyr
 20 25 30
 Asn Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Leu Pro His Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

018723

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gln Asp Pro Leu Tyr Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 129
<211> 118
<212> PPT
<213> Homo sapiens

<400> 129
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Arg Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Thr Ile Ile Ser Asn Gly Lys Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gln Asp Trp Met Tyr Met Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 130
<211> 118
<212> PPT
<213> Homo sapiens

<400> 130
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Thr Tyr
20 25 30
Thr Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Thr Ser Ser Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Val Asn Ser Leu Tyr Lys Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 131
<211> 119
<212> PPT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> VARIANT
<222> 119

<223> Xaa = любая аминокислота

<400> 131

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Pro Thr
 20 25 30
 Asn Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Thr Gly Thr Gly Ala Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gln Asn Ser Arg Tyr Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Xaa
 115

<210> 132

<211> 117

<212> ПРТ

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANT

<222> 117

<223> Xaa = любая аминокислота

<400> 132

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Trp Pro Tyr
 20 25 30
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Ser Pro Phe Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Gly Lys Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Xaa
 115

<210> 133

<211> 123

<212> ПРТ

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANT

<222> 123

<223> Xaa = любая аминокислота

<400> 133

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Trp Pro Tyr

```

                20                25                30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35                40                45
Ser Thr Ile Ser Pro Phe Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
      50                55                60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
      65                70                75                80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                90                95
Ala Lys Ser Asp Val Leu Lys Thr Gly Leu Asp Gly Phe Asp Tyr Trp
      100                105                110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Xaa
      115                120

```

<210> 134
 <211> 121
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 121
 <223> Xaa = Любая аминокислота

```

<400> 134
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
  1                5                10                15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Met Ala Tyr
      20                25                30
Gln Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35                40                45
Ser Thr Ile His Gln Thr Gly Phe Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
      50                55                60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
      65                70                75                80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                90                95
Ala Lys Val Arg Ser Met Arg Pro Tyr Lys Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
      100                105                110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Xaa
      115                120

```

<210> 135
 <211> 118
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 118
 <223> Xaa = Любая аминокислота

```

<400> 135
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
  1                5                10                15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Trp Pro Tyr
      20                25                30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35                40                45
Ser Thr Ile Ser Pro Phe Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
      50                55                60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

```

```

65              70              75              80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
              85              90
Ala Lys Gly Asn Leu Glu Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
              100              105              110
Val Thr Val Ser Ser Xaa
              115

```

```

<210> 136
<211> 119
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> VARIANT
<222> 119
<223> Xaa = Любая аминокислота

```

```

<400> 136
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1              5              10              15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Trp Pro Tyr
              20              25              30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
              35              40              45
Ser Thr Ile Ser Pro Phe Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
              50              55              60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
              65              70              75              80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
              85              90              95
Ala Lys Lys Thr Gly Pro Ser Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
              100              105              110
Leu Val Thr Val Ser Ser Xaa
              115

```

```

<210> 137
<211> 118
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

```

```

<220>
<221> VARIANT
<222> 118
<223> Xaa = Любая аминокислота

```

```

<400> 137
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1              5              10              15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Trp Pro Tyr
              20              25              30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
              35              40              45
Ser Thr Ile Ser Pro Phe Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
              50              55              60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
              65              70              75              80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
              85              90              95
Ala Lys Lys Leu Ser Asn Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
              100              105              110
Val Thr Val Ser Ser Xaa

```

115

<210> 138
 <211> 119
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 119
 <223> Xaa = Любая аминокислота

<400> 138
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Trp Pro Tyr
 20 25 30
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Ser Pro Phe Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Val Val Lys Asp Asn Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Xaa
 115

<210> 139
 <211> 119
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> VARIANT
 <222> 119
 <223> Xaa = Любая аминокислота

<400> 139
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Trp Pro Tyr
 20 25 30
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Ser Pro Phe Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Asn Thr Gly Gly Lys Gln Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser Xaa
 115

<210> 140
 <211> 121
 <212> ПРТ

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANT

<222> 121

<223> Xaa = Любая аминокислота

<400> 140

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Trp Pro Tyr
 20          25          30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35          40          45
Ser Thr Ile Ser Pro Phe Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85          90          95
Ala Lys Arg Thr Glu Asn Arg Gly Val Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100         105         110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Xaa
 115          120

```

<210> 141

<211> 121

<212> ПРТ

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANT

<222> 121

<223> Xaa = Любая аминокислота

<400> 141

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Asp Tyr
 20          25          30
Asp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35          40          45
Ser Met Ile Ser Ser Ser Gly Leu Trp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85          90          95
Ala Lys Gly Phe Arg Leu Phe Pro Arg Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100         105         110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Xaa
 115          120

```

<210> 142

<211> 108

<212> ПРТ

<213> Homo sapiens

<400> 142

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1          5          10          15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr

```

```

                20                25                30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
   35                40                45
Tyr Ala Ala Ser Pro Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
   50                55                60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
  65                70                75                80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Ser Val Pro Pro
                85                90                95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
                100                105

```

<210> 143
 <211> 108
 <212> PPT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 143
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1                5                10                15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
                20                25                30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
   35                40                45
Tyr Arg Ala Ser Pro Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
   50                55                60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
  65                70                75                80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Arg Ile Pro Pro
                85                90                95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
                100                105

```

<210> 144
 <211> 108
 <212> PPT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 144
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1                5                10                15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Phe Lys Ser
                20                25                30
Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
   35                40                45
Tyr Asn Ala Ser Tyr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
   50                55                60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
  65                70                75                80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Tyr Trp Pro Val
                85                90                95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
                100                105

```

<210> 145
 <211> 107
 <212> PPT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 145
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

```

```

      1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Tyr His
      20           25           30
Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
      35           40           45
Tyr Lys Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
      50           55           60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
      65           70           75           80
Asp Phe Ala Thr Tyr Cys Gln Gln Val Arg Lys Val Pro Arg Thr
      85           90           95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
      100           105

```

<210> 146
 <211> 108
 <212> PPT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 146
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
      1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Arg Arg Tyr
      20           25           30
Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
      35           40           45
Tyr Gln Ala Ser Val Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
      65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Leu Tyr Pro Pro Ile
      85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
      100           105

```

<210> 147
 <211> 108
 <212> PPT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 147
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
      1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Asn Trp
      20           25           30
Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
      35           40           45
Tyr Arg Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
      65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Val Val Ile Pro Arg
      85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
      100           105

```

<210> 148
 <211> 108
 <212> PPT
 <213> Homo sapiens

<400> 148
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Leu Trp His
 20 25 30
 Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr His Ala Ser Leu Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ala Val Tyr Pro Lys
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 149
 <211> 108
 <212> NPT
 <213> Homo sapiens

<400> 149
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Phe Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr His Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Leu Leu Tyr Pro Lys
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 150
 <211> 108
 <212> NPT
 <213> Homo sapiens

<400> 150
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Phe Tyr His
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Pro Ala Ser Lys Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ala Arg Trp Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 151
 <211> 108
 <212> NPT

<213> Homo sapiens

<400> 151

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ile Trp His
           20           25           30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45
Tyr Arg Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Ala Arg Val Pro Arg
           85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
           100           105

```

<210> 152

<211> 108

<212> NPPT

<213> Homo sapiens

<400> 152

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Arg Tyr
           20           25           30
Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45
Tyr Lys Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Val Gly Tyr Pro Arg
           85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
           100           105

```

<210> 153

<211> 108

<212> NPPT

<213> Homo sapiens

<400> 153

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Leu Lys Tyr
           20           25           30
Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45
Tyr Asn Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Thr Tyr Tyr Pro Ile
           85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
           100           105

```

<210> 154

<211> 108
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<400> 154
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Leu Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Trp Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Leu Tyr Tyr Pro Gln
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 155
 <211> 108
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<400> 155
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Leu Arg Ser
 20 25 30
 Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Tyr Trp Pro Ala
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 156
 <211> 108
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<400> 156
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Phe Arg His
 20 25 30
 Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Ala Leu Tyr Pro Lys
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 157
 <211> 108
 <212> NPT
 <213> Homo sapiens

<400> 157
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Arg Lys Tyr
 20 25 30
 Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Thr Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Leu Phe Trp Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 158
 <211> 108
 <212> NPT
 <213> Homo sapiens

<400> 158
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Arg Arg Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Leu Phe Tyr Pro Lys
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 159
 <211> 108
 <212> NPT
 <213> Homo sapiens

<400> 159
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ile Lys His
 20 25 30
 Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Arg Trp Pro Gln
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 160
 <211> 108
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 160
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Tyr His
 20 25 30
 Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Arg Lys Val Pro Arg
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 161
 <211> 108
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 161
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Lys His
 20 25 30
 Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asn Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Gly Arg Tyr Pro Lys
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 162
 <211> 108
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 162
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Phe Lys Ser
 20 25 30
 Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asn Ala Ser Tyr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Tyr Trp Pro Val

018723

85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 163
 <211> 116
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<400> 163
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Trp Val Tyr
 20 25 30
 Gln Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Ala Phe Gly Ala Lys Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Leu Ser Gly Lys Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 164
 <211> 120
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<400> 164
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Trp Ser Tyr
 20 25 30
 Gln Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Ser Phe Gly Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Arg Asp His Asn Tyr Ser Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 165
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 165
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
 atcaactgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtacca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatcgg aattcctttt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacc 240
 gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag acgtatactg ttctctctac gtttgccaa 300

gggaccaag tggaaatcaa acag 324

<210> 166
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 166
 gacatccaga tgaccagtc tccacctcc ctgtccgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatcgg aattcccctt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag acttattcga ttctctctac gttcggccaa 300
 gggaccaag tggaaatcaa acgg 324

<210> 167
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 167
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtgc tccgattggg acgacgttaa gttggtacca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctggttt ggttcccggt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg ctacgtacta ctgtgcgag gctgggacgc atcctacgac gttcggccaa 300
 gggaccaag tggaaatcaa acgg 324

<210> 168
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 168
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtaa gtatattggt tgcaggttaa attggtacca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatcgttgg gcgtccggtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg ctacgtacta ctgtcgtcag ggtgctgctg cgcctcggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 169
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 169
 gacattcaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gtttatttat cggtatattat cgtggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagtcc ctaagctcct gatctataat cgtcctatt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag catgctcatt tgcctcgtac gttcggccaa 300
 gggaccaag tggaaatcaa acgg 324

<210> 170
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 170
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gtggattggg tctcagttat cttggtacca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatcatgtgg cgttctcgt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagatTTTg ctacgtacta ctgtgctcag ggtgcggcgt tgcctaggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 171
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 171
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccggtgcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gaagattgct acttatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatagg tcttccctct tgcaaagcgc ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggtac tgggacagtt ttcacactca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatTTTg ctacgtacta ctgtcaacag acgtagtggtg ttctctctac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 172
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 172
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccggtgcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gtggattgat actgggttag cgtggtacca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaggctcct gatctataat gtgtccaggt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggtac tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatTTTg ctacgtacta ctgtcaacag tattggggta gtctctacgac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 173
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 173
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccggtgcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca ggagatttat tctgggttag cgtggtacca gcagagacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctataat gcttccatt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggtac tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatTTTg ctacgtacta ctgtcaacag gtgattggtg atcctgttac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 174
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 174
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccggtgcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtacca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctacgctcct gatctatcgg ttgtccgtgt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggtac tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatTTTg ctacgtacta ctgtcaacag acttataatg ttctctctac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 175
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 175
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccggtgcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatctaa attggtacca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatagg aattcccagt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

cgtttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatthttg ctacgtacta ctgtcaacag actthttgctg ttcctcctac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggagatcaa acgg 324

<210> 176
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 176
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
 atcaacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatcgg aattcccctt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgthttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatthttg ctacgtacta ctgtcaacag acgtataggg tgcctcctac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 177
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 177
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
 atcaacttgcc gggcaagtca gcataattggg ttgtggttac attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatagg tcttctctgt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgthttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatthttg ctacgtacta ctgtcaacag aagtataatt tgccttatac gtccggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 178
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 178
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
 atcaacttgcc gggcaagtca gagcattttt cggcatttaa agtggtagca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatcgg gcaccccgtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgthttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatthttg ctacgtacta ctgtcaacag gttgctctgt atcctaagac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 179
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 179
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
 atcaacttgcc gggcaagtca gagcattatt aagcatttaa agtggtagca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatcgg gcaccccgtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgthttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatthttg ctacgtacta ctgtcaacag ggggctcggg gcctcagac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 180
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 180
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
 atcaacttgcc gggcaagtca gagcattttat tatcatttaa agtggtagca gcagaaacca 120

```

gggaaagccc ctaagctcct gatctataag gcatccacgt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag gttcgggaag tgcctcggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

```

```

<210> 181
<211> 324
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 181
gacatccaga cgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtatattggt aggtatttac gttggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat tcttccgtgt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag cgttatcgta tgccttatac gttcggccaa 300
gggaccaggg tagaaatcaa acgg 324

```

```

<210> 182
<211> 324
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 182
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gcatattcat agggagttaa ggtggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatcag gcgtcccgtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag aagtatctgc ctccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

```

```

<210> 183
<211> 324
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 183
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gcatattcat agggagttaa ggtggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatcag gcgtcccgtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag cgttataggg tgccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

```

```

<210> 184
<211> 324
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 184
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagtattggg cggaggtaa agtggtacca gcagaaacca 120
ggggcagccc ctaggctcct gatctatcgt acgtcctggg tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag acgtcgcagt ggccctatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

```

```

<210> 185
<211> 324
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 185
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60

```

```

atcacttgcc gggcaagtca gaagatttat aagaatttac gttggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctataat tcttccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggtac tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag aggtatctgt cgccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

```

```

<210> 186
<211> 324
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 186
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gaagatttat aataatttaa ggtggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctataat acttccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggtac tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag cgatggcgtg cgccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

```

```

<210> 187
<211> 324
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 187
gacattcaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggatttat aagtcgtag ggtggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatcag tcttctttgt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggtac tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag tatcatcaga tgctcggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

```

```

<210> 188
<211> 324
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 188
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctatctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggatttat aggcatttaa ggtggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat gcgtccaggt tgcaaagtgg ggtcccaaca 180
cgtttcagtg gcagtggtac tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag actcataate ctctaagac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

```

```

<210> 189
<211> 324
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 189
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtatattggt aggtatttac gttggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat tcttccgtgt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggtac tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag aggtatatgc agccttttac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

```

```

<210> 190
<211> 324
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 190

```

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtccgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggatttgt cggatatttac ggtggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctataat gggtoaccagt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag cggtatcttc agccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaatcaa acgg 324

```

```

<210> 191
<211> 324
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 191
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtatatttgt aggtatttac gttggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgat tcttcctgtg tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag cgttattctt cgccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaatcaa gcgg 324

```

```

<210> 192
<211> 324
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 192
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtatatttgt cgtcagttaa ggtggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaggctcct gatctatggg cgtccctgtt tgcaaagcgg gatcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag aggtatatta ctcccttatac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaagtcaa acgg 324

```

```

<210> 193
<211> 324
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 193
gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggattcat aggcagttaa agtgggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctattat gcttccattt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag acgttttcta agccttctac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaatcaa acgg 324

```

```

<210> 194
<211> 354
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 194
gagggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttat gattataata tgtcttgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg gtctagagtg ggtctcaact attacgcata cgggtggggt tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcgggat attactgtgc gaaacagaat 300
ccttcttatac agtttgacta ctggggtcag ggaaccctgg tcaccgtctc gagg 354

```

```

<210> 195
<211> 360
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

```

<400> 195
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttgat ctttatgata tgtcgtgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcatcg attgttaatt cgggtgtag gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacttaat 300
cagagttatc attgggattt tgactactgg ggtcagggaa cctgggtcac cgtctcgagc 360

<210> 196
<211> 369
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 196
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttcg aagtattgga tgtcgtgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcatct attgatttta tgggtccgca tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaagggagg 300
acgtcgatgt tgccgatgaa ggggaagttt gactactggg gtcagggaac cctgggtcac 360
gtctcgagc 369

<210> 197
<211> 354
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 197
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttcg cgttattcga tgtcttgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcaacg attttgctg gtggtgatgt tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacagacg 300
cctgattata tgtttgacta ctgggggtcag ggaacctggt tcacctctc gage 354

<210> 198
<211> 351
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 198
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttgg aagtataata tggcgtgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcaact attcttgggt agggtaataa tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaaacgatg 300
gattataagt ttgactactg gggtcagggg accctgttca ccgtctcgag c 351

<210> 199
<211> 354
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 199
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtacag cctccggatt cacctttgat gagtataata tgtcttgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcaacg attctgcccg atggtgatcg gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaacaggat 300
cctttgtata ggtttgacta ctgggggtcag ggaacctggt tcacctctc gage 354

<210> 200
<211> 354

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 200

```

gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttcg gattatcgga tgagttgggt ccgccaggct 120
ccagggaaagg gtctagagtg ggtctcaacg attatttcga atggtaagtt tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacaggat 300
tggatgtata tgtttgacta ctggggtcag ggaaccctgg tcaccgtctc gagc 354

```

<210> 201

<211> 354

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 201

```

gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttcg acgtatacta tggcttgggt ccgccaggcc 120
ccagggaaagg gtctagagtg ggtctcatcg attactagta gtggttcttc tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaagtgaat 300
tctttgtata agtttgacta ctggggtcag ggaaccctgg tcaccgtctc gagc 354

```

<210> 202

<211> 355

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 202

```

gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttcg ccgactaata tgcctgggt ccgccaggct 120
ccagggaaagg gtctagagtg ggtctcaact attactggta ctggtgctgc gacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaacagaat 300
tctcgttata gtttgacta ctggggtcag ggaaccctgg tcaccgtctc gagcg 355

```

<210> 203

<211> 349

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 203

```

gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttcg ccgtatacga tgagttgggt ccgccaggct 120
ccagggaaagg gtctagagtg ggtctcaacg atttcgccgt ttggttcgac tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagggggg 300
aaggattttg actactgggg tcagggaaacc ctggtcaccg tctcagcgc 349

```

<210> 204

<211> 367

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 204

```

gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttcg ccgtatacga tgagttgggt ccgccaggct 120
ccagggaaagg gtctagagtg ggtctcaacg atttcgccgt ttggttcgac tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaaagtgat 300
gttcttaaga cgggtctgga tggttttgac tactggggtc agggaaacct ggtcaccgct 360
tcgagcg 367

```

<210> 205
 <211> 361
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 205
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttatg ccgatcacga tggcttgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcaact attcatcaga cgggtttttc tacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaagtgcgt 300
 tctatgcgtc cttataagtt tgactactgg ggtcagggaa ccctggtcac cgtctcgagc 360
 g 361

<210> 206
 <211> 352
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 206
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt caccttttgg ccgatcacga tgagtgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcaacg atttcgccgt ttggttcgac tacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaaggtaat 300
 cttgagccgt ttgactactg gggtcagggg accctgggtca ccgtctcgag cg 352

<210> 207
 <211> 355
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 207
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt caccttttgg ccgatcacga tgagtgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcaacg atttcgccgt ttggttcgac tacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaaaagacg 300
 ggtccgctcgt cgtttgacta ctggggtcag ggaaccctgg tcaccgtctc gagcg 355

<210> 208
 <211> 352
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 208
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggt ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt caccttttgg ccgatcacga tgagtgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcaacg atttcgccgt ttggttcgac tacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggat accgcggtat attactgtgc gaaaaagctt 300
 agtaatggtt ttgactactg gggtcagggg accctgggtca ccgtctcgag cg 352

<210> 209
 <211> 355
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 209
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt caccttttgg ccgatcacga tgagtgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg gtctagagtg ggtctcaacg atttcgccgt ttggttcgac tacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagtggtt 300

aaggataata cgtttgacta ctgggggtcag ggaaccctgg tcaccgtctc gagcg 355

<210> 210
 <211> 355
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 210
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggagc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt caccttttgg ccgatacaga tgagttgggt cgcaccaggt 120
 ccagggaagg gtctagagtg ggtctcaacg atttcgcctg ttggttcgac tacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaaaaact 300
 ggggtaagc agtttgacta ctgggggtcag ggaaccctgg tcaccgtctc gagcg 355

<210> 211
 <211> 361
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 211
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggagc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt caccttttgg ccgatacaga tgagttgggt cgcaccaggt 120
 ccagggaagg gtctagagtg ggtctcaacg atttcgcctg ttggttcgac tacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaaaggact 300
 gagaataggg gggtttcttt tgactactgg ggtcagggaa ccctgggtcac cgtctcgagc 360
 g 361

<210> 212
 <211> 361
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 212
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggagc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtctc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttaag gattatgata tgacttgggt cgcaccaggt 120
 ccagggaagg gtctagagtg ggtctcaatg atttctctgt cgggtctttg gacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagggttt 300
 aggctgtttc ctccgacttt tgactactgg ggtcagggaa ccctgggtcac cgtctcgagc 360
 g 361

<210> 213
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 213
 gaggttcaat tgttgaatc cgggtgtgga ttggttcaac ctggtgggtc tttgagattg 60
 tcctgtgctg cttccggttt tactttcgtc caccagacta tggtttgggt tagacaggct 120
 ccaggtaaag gattggaatg ggtttccac acccaccag atggtcaaga tccattctac 180
 gctgactccg ttaagggaag attcactatc tccagagaca actccaagaa cactttgtac 240
 ttgcagatga actccttgag agctgaggat actgctgttt accactgtgc tttgttgcca 300
 aagagaggac cttggtttga ttactgggga cagggaactt tggttactgt ttcttcc 357

<210> 214
 <211> 119
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<400> 214
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

```

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala His Glu
      20                25                30
Thr Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35                40                45
Ser His Ile Pro Pro Asp Gly Gln Asp Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Val
      50                55                60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
      65                70                75                80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
      85                90                95
Ala Leu Leu Pro Lys Arg Gly Pro Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
      100               105               110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115

```

```

<210> 215
<211> 357
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

```

```

<220>
<223> консенсусная

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)...(6)
<223> n = t или g

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)...(9)
<223> n = a или g

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)...(10)
<223> n = t или c

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)...(18)
<223> n = a или g

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)...(21)
<223> n = c или t

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)...(24)
<223> n = t или g

```

```

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)...(27)
<223> n = t или a

```

```

<220>

```

<221> misc_feature
<222> (30)...(30)
<223> n = а или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)...(36)
<223> n = т или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)...(39)
<223> n = а или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)...(45)
<223> n = т или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (48)...(48)
<223> n = т или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (51)...(51)
<223> n = т или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)...(52)
<223> n = т или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)...(55)
<223> n = а или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (57)...(57)
<223> n = а или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (58)...(58)
<223> n = т или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (60)...(60)
<223> n = г или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (69)...(69)
<223> n = t или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (72)...(72)
<223> n = t или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)...(78)
<223> n = t или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (81)...(81)
<223> n = t или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (84)...(84)
<223> n = t или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (87)...(87)
<223> n = с или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (90)...(90)
<223> n = t или g

<220>
<221> misc_feature
<222> (93)...(93)
<223> n = с или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (99)...(99)
<223> n = t или g

<220>
<221> misc_feature
<222> (105)...(105)
<223> n = t или g

<220>
<221> misc_feature
<222> (111)...(111)

<223> n = t или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (112)...(112)
<223> n = а или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (114)...(114)
<223> n = а или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (120)...(120)
<223> n = t или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (126)...(126)
<223> n = t или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (129)...(129)
<223> n = а или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (132)...(132)
<223> n = а или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (133)...(133)
<223> n = t или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (135)...(135)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (138)...(138)
<223> n = а или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (144)...(144)
<223> n = t или с

<220>

<221> misc_feature
<222> (147)...(147)
<223> n = с или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (150)...(150)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (156)...(156)
<223> n = а или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (159)...(159)
<223> n = а или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (168)...(168)
<223> n = а или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (174)...(174)
<223> n = а или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (183)...(183)
<223> n = т или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (192)...(192)
<223> n = т или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (198)...(198)
<223> n = а или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (199)...(199)
<223> n = а или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (201)...(201)
<223> n = а или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (207)...(207)
<223> n = t или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (214)...(214)
<223> n = а или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (216)...(216)
<223> n = а или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (222)...(222)
<223> n = с или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (234)...(234)
<223> n = t или g

<220>
<221> misc_feature
<222> (235)...(235)
<223> n = t или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (237)...(237)
<223> n = g или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (240)...(240)
<223> n = с или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (241)...(241)
<223> n = t или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (246)...(246)
<223> n = g или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (253)...(253)

<223> n = t или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (254)...(254)
<223> n = с или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (256)...(256)
<223> n = t или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (259)...(259)
<223> n = а или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (261)...(261)
<223> n = а или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (264)...(264)
<223> n = t или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (270)...(270)
<223> n = t или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (273)...(273)
<223> n = t или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (276)...(276)
<223> n = t или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (279)...(279)
<223> n = t или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (282)...(282)
<223> n = с или t

<220>

<221> misc_feature
<222> (291)...(291)
<223> n = t или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (292)...(292)
<223> n = t или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (295)...(295)
<223> n = t или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (297)...(297)
<223> n = г или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (300)...(300)
<223> n = а или t

<221> misc_feature
<222> (306)...(306)
<223> n = а или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (309)...(309)
<223> n = а или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (321)...(321)
<223> n = t или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (330)...(330)
<223> n = а или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (339)...(339)
<223> n = t или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (340)...(340)
<223> n = t или с

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (345)...(345)
 <223> n = t или с

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (348)...(348)
 <223> n = t или с

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (351)...(351)
 <223> n = t или с

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (354)...(354)
 <223> n = t или г

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (355)...(355)
 <223> n = t или а

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (356)...(356)
 <223> n = с или г

<400> 215
 gaggtncann tgttgantc ngngngngn ttggtncanc ctggnggntc nntgngnntn 60
 tcctgtgeng cntccgntt nacnttngcn cangagacna tggnttgggt nngncaggcn 120
 ccaggnaang gnntngantg ggtntcncan attcncncng atggtcanga tccnttctac 180
 gcnactccg tnaagggngg nttcacnadc tccngngaca antccaagaa cacnntntan 240
 ntgeanatga acnncntgng ngcngaggan acngcngtnt ancactgtgc nntgntnccn 300
 aagagnggnc cttggtttga ntaactggggn caggaacnn tggtnacngt ntcnnc 357

<210> 216
 <211> 366
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 216
 gagaaaagag aggttcaatt gcttgaatct ggaggagggt tggteccagcc aggagggtcc 60
 cttcgactaa gttgtgctgc cagtgggttt acgtttgctc atgaaactat ggtatgggtc 120
 cgacaggcac ctggtaaagg tcttgaatgg gttcacata tccctccaga cggtaagac 180
 ccattttacg ctgattccgt gaaaggcaga tttacaattt cacgagataa ttctaaaaac 240
 accttgact tacaatgaa ctcaattgaga gctgaggaca ctgcagtta tcaactgcgt 300
 ttactaccaaa aacgtggacc ttggtttgat tattggggcc aaggtacgtt agtgactgtt 360
 agttct 366

<210> 217
 <211> 122
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<400> 217

Glu Lys Arg Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 1 5 10 15
 Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 20 25 30
 Ala His Glu Thr Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Ser His Ile Pro Pro Asp Gly Gln Asp Pro Phe Tyr Ala
 50 55 60
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 65 70 75 80
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95
 Tyr His Cys Ala Leu Leu Pro Lys Arg Gly Pro Trp Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 218
 <211> 366
 <212> ДНК
 <213> Pichia pastoris

<400> 218
 gagaaaagag aggttcaatt gttgaaatct ggaggaggtt tgggccagcc aggagggtcc 60
 cttcgactaa gttgtgctgc cagtgggttt acgtttgctc atgaaactat ggtatgggtc 120
 cgacaggcac ctggtaaagg tcttgaatgg gttcacata tcctccaga cggtaagac 180
 ccattttacg ctgattccgt gaaaggcaga ttacaattt cacgagataa ttctaaaaac 240
 accttgtaact tacaatgaa ctcattgaga gctgaggaca ctgcagttta tcaactgcgt 300
 ttactacca aacgtggacc ttggttgat tattggggcc aaggtagctt agtgactgtt 360
 agttct 366

<210> 219
 <211> 358
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Консенсусная

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (6)...(6)
 <223> n = g или t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9)...(9)
 <223> n = g или a

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10)...(10)
 <223> n = c или t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (13)...(13)
 <223> n = t или c

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)...(15)
<223> n = г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)...(18)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)...(24)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)...(30)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)...(36)
<223> n = а или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)...(42)
<223> n = т или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)...(45)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (54)...(54)
<223> n = г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (57)...(57)
<223> n = т или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (60)...(60)
<223> n = с или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)...(61)

<223> n = t или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (62)...(62)
<223> n = с или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (63)...(63)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (69)...(69)
<223> n = а или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (73)...(73)
<223> n = т или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (74)...(74)
<223> n = с или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (75)...(75)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)...(78)
<223> n = а или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (81)...(81)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (84)...(84)
<223> n = с или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (90)...(90)
<223> n = г или т

<220>

<221> misc_feature
<222> (96)...(96)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (99)...(99)
<223> n = г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (105)...(105)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (114)...(114)
<223> n = с или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (123)...(123)
<223> n = а или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (126)...(126)
<223> n = г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (129)...(129)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (135)...(135)
<223> n = а или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (138)...(138)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (144)...(144)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (153)...(153)
<223> n = т или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (156)...(156)
<223> n = с или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (159)...(159)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (162)...(162)
<223> n = т или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (168)...(168)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (171)...(171)
<223> n = т или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (174)...(174)
<223> n = с или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (177)...(177)
<223> n = с или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (183)...(183)
<223> n = а или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (186)...(186)
<223> n = с или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (195)...(195)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (199)...(199)
<223> n = с или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (201)...(201)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (204)...(204)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (207)...(207)
<223> n = с или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (210)...(210)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (213)...(213)
<223> n = с или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (216)...(216)
<223> n = с или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (219)...(219)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (225)...(225)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (228)...(228)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (234)...(234)
<223> n = г или с

<220>
<221> misc_feature

<222> (235)...(235)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (237)...(237)
<223> n = а или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (240)...(240)
<223> n = т или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (241)...(241)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (243)...(243)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (253)...(253)
<223> n = а или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (254)...(254)
<223> n = г или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (255)...(255)
<223> n = с или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (256)...(256)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (259)...(259)
<223> n = с или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (261)...(261)
<223> n = т или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (264)...(264)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (273)...(273)
<223> n = а или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (276)...(276)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (279)...(279)
<223> n = а или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (288)...(288)
<223> n = т или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (291)...(291)
<223> n = г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (292)...(292)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (294)...(294)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (297)...(297)
<223> n = т или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (300)...(300)
<223> n = т или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (303)...(303)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (304)...(304)
<223> n = а или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (306)...(306)
<223> n = г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (309)...(309)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (321)...(321)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (324)...(324)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (330)...(330)
<223> n = т или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (333)...(333)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (336)...(336)
<223> n = а или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (339)...(339)
<223> n = с или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (340)...(340)
<223> n = с или т

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (342)...(342)
 <223> n = г или а

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (345)...(345)
 <223> n = с или г

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (348)...(348)
 <223> n = с или т

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (351)...(351)
 <223> n = с или blank

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (353)...(353)
 <223> n = с или а

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (355)...(355)
 <223> n = а или т

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (356)...(356)
 <223> n = г или т

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (358)...(358)
 <223> n = отсутствует или т

<400> 219
 gaggtncann tgntngantc tggnggaggn ttggtncagc cngnggggtc cctncgnetn 60
 nnntgtgcng ccnnnggntt nactttgcn catganacna tggnttgggt ccgncaggca 120
 ccnggnaang gtctngantg ggtntcacat atnccnccng anggtcanga nccntntac 180
 gcngantccg tgaanggcng nttnacnath tncngngana attcnaanaa cacnntntan 240
 ntncaaatga acnnntgng ngcngaggac acngcngtnt atcactgngc nntnctnccn 300
 aannngngnc cttggtttga ntantggggn canggnaenn tngtnacngt ntngnncn 358

<210> 220
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 220
 gaagtgcagc ttcttgaag tgggtggagg ctagtgcagc cagggggatc tttaaagatta 60
 tcatgcgctg ccagtggtatt tacttttgct cacgagacga tgggtctgggt gagacaagct 120

cctggaaaag gtttagagtg ggtttctcac attccacctg atggtaaga tcctttctac 180
gcagattccg tcaaaggaag atttactatc tccagagata atagtaaaaa cactttgtac 240
ctacagatga actcaactag agccgaagat accgctgtgt accactgcbc cttggtgcca 300
aagagaggtc cttggttcga ttactgggggt cagggtactc tggttacagt ctcactc 357

<210> 221
<211> 119
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 221
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala His Glu
20 25 30
Thr Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser His Ile Pro Pro Asp Gly Gln Asp Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
85 90 95
Ala Leu Leu Pro Lys Arg Gly Pro Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 222
<211> 357
<212> ДНК
<213> Pichia pastoris

<400> 222
gaagtgcagc ttcttgaaag tgggtggaggg ctagtgcagc caggggggac ttttaagatta 60
tcatgcgctg ccagtggatt tacttttgct caccagacga tggctctgggt gagacaagct 120
cctggaaaag gtttagagtg ggtttctcac attccacctg atggtaaga tcctttctac 180
gcagattccg tcaaaggaag atttactatc tccagagata atagtaaaaa cactttgtac 240
ctacagatga actcaactag agccgaagat accgctgtgt accactgcbc cttggtgcca 300
aagagaggtc cttggttcga ttactgggggt cagggtactc tggttacagt ctcactc 357

<210> 223
<211> 358
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Консенсусная

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)...(3)
<223> n = g или a

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)...(12)
<223> n = g или t

<220>

<221> misc_feature
<222> (13)...(13)
<223> n = t или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)...(15)
<223> n = г или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)...(18)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)...(19)
<223> n = t или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)...(20)
<223> n = с или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)...(24)
<223> n = г или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)...(30)
<223> n = с или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)...(31)
<223> n = t или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (33)...(33)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)...(36)
<223> n = а или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)...(42)
<223> n = t или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (48)...(48)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (51)...(51)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (52)...(52)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (54)...(54)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (55)...(55)
<223> n = с или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (57)...(57)
<223> n = т или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (58)...(58)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (60)...(60)
<223> n = с или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (63)...(63)
<223> n = с или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (66)...(66)
<223> n = т или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (69)...(69)

018723

<223> n = а или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (73)...(73)
<223> n = т или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (74)...(74)
<223> n = с или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (75)...(75)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (81)...(81)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (84)...(84)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (90)...(90)
<223> n = г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (93)...(93)
<223> n = т или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (105)...(105)
<223> n = г или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (111)...(111)
<223> n = с или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (112)...(112)
<223> n = с или а

<220>
<221> misc_feature

<222> (114)...(114)
<223> n = с или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (117)...(117)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (120)...(120)
<223> n = а или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (123)...(123)
<223> n = а или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (126)...(126)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (129)...(129)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (133)...(133)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (144)...(144)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (147)...(147)
<223> n = а или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (150)...(150)
<223> n = т или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (156)...(156)
<223> n = с или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (159)...(159)
<223> n = г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (168)...(168)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (174)...(174)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (186)...(186)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (192)...(192)
<223> n = г или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (195)...(195)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (198)...(198)
<223> n = с или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (199)...(199)
<223> n = с или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (201)...(201)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (204)...(204)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (207)...(207)

<223> n = с или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (214)...(214)
<223> n = с или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (216)...(216)
<223> n = с или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (219)...(219)
<223> n = с или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (223)...(223)
<223> n = t или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (224)...(224)
<223> n = с или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (225)...(225)
<223> n = с или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (228)...(228)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (234)...(234)
<223> n = г или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (235)...(235)
<223> n = с или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (237)...(237)
<223> n = а или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (240)...(240)
<223> n = t или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (243)...(243)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (246)...(246)
<223> n = а или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (253)...(253)
<223> n = а или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (254)...(254)
<223> n = г или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (255)...(255)
<223> n = с или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (258)...(258)
<223> n = г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (259)...(259)
<223> n = с или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (261)...(261)
<223> n = t или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (267)...(267)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (270)...(270)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (273)...(273)
<223> n = а или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (276)...(276)
<223> n = г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (279)...(279)
<223> n = а или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (282)...(282)
<223> n = т или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (288)...(288)
<223> n = т или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (291)...(291)
<223> n = г или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (292)...(292)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (295)...(295)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (297)...(297)
<223> n = т или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (300)...(300)
<223> n = т или а

<220>
<221> misc_feature

018723

<222> (306)...(306)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (309)...(309)
<223> n = г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (318)...(318)
<223> n = т или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (321)...(321)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (336)...(336)
<223> n = а или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (339)...(339)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (345)...(345)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (348)...(348)
<223> n = с или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (354)...(354)
<223> n = г или blank

<220>
<221> misc_feature
<222> (356)...(356)
<223> n = г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (358)...(358)
<223> n = отсутствует или т

<400> 223
 gangtgacg tnnngannn tggnggaggn ntngtncagc cngggggntc nntnngnntn 60
 tcntgngcng cennnggatt nacntttgen cangagacga tggnttgggt nngncangcn 120
 ccnggnaang gtntagagtg ggtntcncan attcncncng atggtcanga tcnnttctac 180
 gcagantccg tnaanggnng nttnacnadc tccngngana atnnaanaa cacnntntan 240
 ctncanatga acnnctnng ngccngangan acngcngnt ancactgngc nntgntnecn 300
 aagagnggnc cttgggtnga ntactggggt cagggnacnc tggtnacngt ctcnancn 358

<210> 224
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 224
 gaagtacaac tgctggagag cgggtggcgc ctggttcaac cgggtgggtc cctgcgcctg 60
 tcctgtgagg catctggttt caccttcgca cacgaaacca tgggtgtgggt tgcgcaagct 120
 ccgggcaaaag gcctggaatg ggtaagccac attcctccag atggccagga cccattctat 180
 gcggtattccg ttaagggctg ctttaccatt tctcgtgata actccaaaaa caccctgtac 240
 ctgcagatga actccctgag cgccgaggat actgagggtg accattgtgc gctgctgcct 300
 aaacgtggcc cgtggttcga ttactggggt caggggtactc tggtcaccgt aagcagc 357

<210> 225
 <211> 119
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<400> 225
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala His Glu
 20 25 30
 Thr Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser His Ile Pro Pro Asp Gly Gln Asp Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
 85 90 95
 Ala Leu Leu Pro Lys Arg Gly Pro Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 226
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Escherichia coli

<400> 226
 gaagtacaac tgctggagag cgggtggcgc ctggttcaac cgggtgggtc cctgcgcctg 60
 tcctgtgagg catctggttt caccttcgca cacgaaacca tgggtgtgggt tgcgcaagct 120
 ccgggcaaaag gcctggaatg ggtaagccac attcctccag atggccagga cccattctat 180
 gcggtattccg ttaagggctg ctttaccatt tctcgtgata actccaaaaa caccctgtac 240
 ctgcagatga actccctgag cgccgaggat actgagggtg accattgtgc gctgctgcct 300
 aaacgtggcc cgtggttcga ttactggggt caggggtactc tggtcaccgt aagcagc 357

<210> 227
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Консенсусная

<220>
<221> misc_feature
<222> (3)...(3)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)...(6)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)...(9)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)...(13)
<223> n = т или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (19)...(19)
<223> n = т или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (20)...(20)
<223> n = с или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (21)...(21)
<223> n = т или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)...(24)
<223> n = г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)...(27)
<223> n = а или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)...(31)
<223> n = т или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (36)...(36)
<223> n = а или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)...(39)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)...(42)
<223> n = t или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)...(45)
<223> n = г или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (48)...(48)
<223> n = г или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (57)...(57)
<223> n = t или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (60)...(60)
<223> n = с или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (69)...(69)
<223> n = а или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (72)...(72)
<223> n = с или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (75)...(75)
<223> n = с или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)...(78)
<223> n = а или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (87)...(87)
<223> n = t или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (90)...(90)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (93)...(93)
<223> n = t или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (96)...(96)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (99)...(99)
<223> n = г или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (111)...(111)
<223> n = с или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (117)...(117)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (120)...(120)
<223> n = а или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (123)...(123)
<223> n = а или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (126)...(126)
<223> n = г или с

<220>

<221> misc_feature
<222> (129)...(129)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (132)...(132)
<223> n = т или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (135)...(135)
<223> n = а или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (138)...(138)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (144)...(144)
<223> n = с или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (145)...(145)
<223> n = т или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (146)...(146)
<223> n = с или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (147)...(147)
<223> n = а или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (150)...(150)
<223> n = т или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (156)...(156)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (159)...(159)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (165)...(165)
<223> n = t или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (171)...(171)
<223> n = t или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (174)...(174)
<223> n = с или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (180)...(180)
<223> n = с или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (183)...(183)
<223> n = а или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (186)...(186)
<223> n = с или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (192)...(192)
<223> n = г или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (198)...(198)
<223> n = с или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (201)...(201)
<223> n = г или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (204)...(204)
<223> n = с или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (210)...(210)
<223> n = с или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (213)...(213)
<223> n = с или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (216)...(216)
<223> n = с или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (219)...(219)
<223> n = с или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (222)...(222)
<223> n = t или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (228)...(228)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (234)...(234)
<223> n = г или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (237)...(237)
<223> n = а или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (240)...(240)
<223> n = t или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (246)...(246)
<223> n = а или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (253)...(253)
<223> n = а или t

<220>
<221> misc_feature

<222> (254)...(254)
<223> n = г или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (261)...(261)
<223> n = т или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (270)...(270)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (273)...(273)
<223> n = а или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (279)...(279)
<223> n = а или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (282)...(282)
<223> n = т или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (285)...(285)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (297)...(297)
<223> n = т или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (303)...(303)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (304)...(304)
<223> n = а или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (306)...(306)
<223> n = г или т

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (309)...(309)
 <223> n = g или с

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (312)...(312)
 <223> n = t или g

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (318)...(318)
 <223> n = t или с

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (321)...(321)
 <223> n = с или t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (336)...(336)
 <223> n = а или t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (339)...(339)
 <223> n = с или t

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (351)...(351)
 <223> n = с или а

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (352)...(352)
 <223> n = t или а

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (353)...(353)
 <223> n = с или g

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (354)...(354)
 <223> n = g или с

<400> 227
 gangtncanc tgntggagnn ngngngnggc ntggtncanc cngngngntc cctgcnctn 60
 tctgtgng cntcngntt cacctngcn canganacna tgggtggtggt ncgccangcn 120

ccnggnaang gncngantg ggtnnnncan attcncncng atggncagga nconttctan 180
 gngantccg tnaagggncg ntnnaccatn tncngngana antccaanaa cacnctntan 240
 ctgcanatga acnncctgcg ngccgaggan acngcggntt ancantgtgc gctgctncct 300
 aannngggnc cntgggtnga ntactggggt cagggnacnc tggtcaccgt nnnnagc 357

<210> 228
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 228
 gaggttcaac tgctggaatc tgggtggtggt ctggtacaac cgggtgggttc cctgcgtctg 60
 agctgtgcag cctctgggtt caccttcgct catgagacca tggtttgggt acgccaggct 120
 ccgggtaaag gcctggagtg ggtaagccat atccctcctg atggtcagga cccgttctat 180
 gctgattccg tcaaaggccg ttttaccatt tctcgtgaca acagcaaaaa cactctgtac 240
 ctgcaaatga actccctgcg tgcagaagac acggcgggtt atcactgtgc actgctgcca 300
 aaacgcggcc cttggttcga ctactggggc cagggtactc tggtcactgt atcttct 357

<210> 229
 <211> 119
 <212> ППТ
 <213> Homo sapiens

<400> 229
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ala His Glu
 20 25 30
 Thr Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser His Ile Pro Pro Asp Gly Gln Asp Pro Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr His Cys
 85 90 95
 Ala Leu Leu Pro Lys Arg Gly Pro Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 230
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Escherichia coli

<400> 230
 gaggttcaac tgctggaatc tgggtggtggt ctggtacaac cgggtgggttc cctgcgtctg 60
 agctgtgcag cctctgggtt caccttcgct catgagacca tggtttgggt acgccaggct 120
 ccgggtaaag gcctggagtg ggtaagccat atccctcctg atggtcagga cccgttctat 180
 gctgattccg tcaaaggccg ttttaccatt tctcgtgaca acagcaaaaa cactctgtac 240
 ctgcaaatga actccctgcg tgcagaagac acggcgggtt atcactgtgc actgctgcca 300
 aaacgcggcc cttggttcga ctactggggc cagggtactc tggtcactgt atcttct 357

<210> 231
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Консенсусная

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)...(6)
<223> n = г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (9)...(9)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (13)...(13)
<223> n = т или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)...(18)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (24)...(24)
<223> n = г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (27)...(27)
<223> n = а или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (30)...(30)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)...(31)
<223> n = т или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (39)...(39)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)...(42)
<223> n = т или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (45)...(45)
<223> n = г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (48)...(48)
<223> n = г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (60)...(60)
<223> n = с или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (61)...(61)
<223> n = т или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (62)...(62)
<223> n = с или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (75)...(75)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (78)...(78)
<223> n = а или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (87)...(87)
<223> n = т или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (90)...(90)
<223> n = г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (99)...(99)
<223> n = г или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (105)...(105)
<223> n = г или т

<220>
<221> misc_feature

<222> (111)...(111)

<223> n = с или а

<220>

<221> misc_feature

<222> (120)...(120)

<223> n = а или т

<220>

<221> misc_feature

<222> (123)...(123)

<223> n = а или г

<220>

<221> misc_feature

<222> (126)...(126)

<223> n = г или т

<220>

<221> misc_feature

<222> (129)...(129)

<223> n = г или а

<220>

<221> misc_feature

<222> (132)...(132)

<223> n = т или с

<220>

<221> misc_feature

<222> (135)...(135)

<223> n = а или г

<220>

<221> misc_feature

<222> (144)...(144)

<223> n = с или а

<220>

<221> misc_feature

<222> (145)...(145)

<223> n = т или а

<220>

<221> misc_feature

<222> (146)...(146)

<223> n = с или г

<220>

<221> misc_feature

<222> (147)...(147)

<223> n = а или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (153)...(153)
<223> n = t или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (156)...(156)
<223> n = с или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (159)...(159)
<223> n = г или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (171)...(171)
<223> n = t или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (174)...(174)
<223> n = с или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (180)...(180)
<223> n = с или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (183)...(183)
<223> n = а или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (186)...(186)
<223> n = с или t

<220>
<221> misc_feature
<222> (192)...(192)
<223> n = г или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (195)...(195)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature

<222> (201)...(201)
<223> n = г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (204)...(204)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (210)...(210)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (213)...(213)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (216)...(216)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (222)...(222)
<223> n = т или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (223)...(223)
<223> n = т или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (224)...(224)
<223> n = с или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (228)...(228)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (234)...(234)
<223> n = г или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (237)...(237)
<223> n = а или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (240)...(240)
<223> n = t или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (253)...(253)
<223> n = а или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (254)...(254)
<223> n = г или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (264)...(264)
<223> n = с или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (267)...(267)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (273)...(273)
<223> n = а или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (279)...(279)
<223> n = а или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (291)...(291)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (297)...(297)
<223> n = т или г

<220>
<221> misc_feature
<222> (300)...(300)
<223> n = т или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (303)...(303)
<223> n = г или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (304)...(304)
<223> n = а или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (306)...(306)
<223> n = г или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (309)...(309)
<223> n = г или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (318)...(318)
<223> n = т или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (330)...(330)
<223> n = т или с

<220>
<221> misc_feature
<222> (336)...(336)
<223> n = а или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (339)...(339)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (348)...(348)
<223> n = с или т

<220>
<221> misc_feature
<222> (351)...(351)
<223> n = с или а

<220>
<221> misc_feature
<222> (354)...(354)
<223> n = г или т

<220>

<221> misc_feature
 <222> (355)...(355)
 <223> n = а или т

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (356)...(356)
 <223> n = г или с

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (357)...(357)
 <223> n = с или т

<400> 231
 gaggtncaanc tgnrtgganc tggngngngn ntggtacanc cngngngntc cctgcgtctn 60
 nnctgtgcag cctcnggntt caccttngcn catgagacna tggnttgggt ncgccaggcn 120
 ccnggnaang gncnngagtg ggtnnnncat atncncncng atggtcagga nccnttctan 180
 gcngantccg tnaanggccg ntnaccatn tcncnggaca annncaanaa cacnctntan 240
 ctgcaaatga acnncctgcg tgcngangac acngcggnt atcaactgtgc nctgctnccn 300
 aannngngnc cttggttnga ctactggggn cagggnacnc tggtcacngt ntcnnnn 357

<210> 232
 <211> 5
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<400> 232
 Glu Val Gln Leu Leu
 1 5

<210> 233
 <211> 28
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептидный линкер

<400> 233
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr His Thr Cys
 1 5 10 15
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 20 25

<210> 234
 <211> 32
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> пептидный линкер

<400> 234
 Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
 1 5 10 15
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 20 25 30

<210> 235
<211> 357
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 235
gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgcgtctc 60
tctgtgcag cctccggatt cacctttgcg catgagacga tgggtgtgggt cggccaggct 120
ccaggaagg gtctagagt ggtctccat attcccccg ttggtcagga tcccttctac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccat tcccgcgaca attccaagaa cacgtatat 240
ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac acagcggat attactgtgc gctgcttcct 300
aagagggggc cttggtttga ctactgggt caggaacc ttggtaccgt ctgagc 357

