

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **020464**

(13) **B9**

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

(15) Информация об исправлении
**Версия исправления: 1 (W1 B1)
исправления в формуле: п.5**

(51) Int. Cl. **C07K 16/18** (2006.01)

(48) Дата публикации исправления
2015.10.30, Бюллетень №10'2015

(45) Дата публикации и выдачи патента
2014.11.28

(21) Номер заявки
200900955

(22) Дата подачи заявки
2008.02.08

**(54) ОТДЕЛЬНЫЕ ВАРИАБЕЛЬНЫЕ ДОМЕНЫ АНТИТЕЛ ПРОТИВ СЫВОРОТОЧНОГО
АЛЬБУМИНА**

(31) **11/704,832**

(56) **WO-A-2004003019**

(32) **2007.02.08**

WO-A-2005118642

(33) **US**

WO-A-2006059110

(43) **2010.04.30**

WO-A-2008052933

(86) **PCT/GB2008/000453**

(87) **WO 2008/096158 2008.08.14**

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

(72) Изобретатель:
**Томлинсон Айан, Джесперс Лорен,
Клуб Джаспер, Холт Люси, Шон
Оливер (GB)**

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

(57) Согласно изобретению предложен лиганд с двойной специфичностью, содержащий первый переменный домен иммуноглобулина, обладающий первой специфичностью связывания, и комплементарный или некомплементарный переменный домен иммуноглобулина, обладающий второй специфичностью связывания.

B9

020464

020464

B9

Родственные заявки

Заявка на данный патент является частичным продолжением заявки на патент США № 11/023959, поданной 28 декабря 2004 г., которая является продолжением международной заявки на патент PCT/GB2003/002804, поданной 30 июня 2003 г., которая заявляет приоритет PCT/GB02/03014, поданной 28 июня 2002 г., и заявки на патент Великобритании GB 0230202.4, поданной 27 декабря 2002 г., содержание которых включено сюда посредством ссылки. Заявка на данный патент также является частичным продолжением WO 2005118642, поданной 31 мая 2005 г., которая заявляет приоритет US 60/576271, поданной 1 июня 2004 г., и US 60/632361, поданной 2 декабря 2004 г., содержание которых включено сюда посредством ссылки. Заявка также заявляет приоритет US 11/704832, поданной 8 февраля 2007 г.

Настоящее изобретение относится к лигандам с двойной специфичностью. В частности, согласно изобретению предложен способ получения лигандов с двойной специфичностью, содержащих первый отдельный вариабельный домен иммуноглобулина, связывающий первый антиген или эпитоп, и второй отдельный вариабельный домен иммуноглобулина, связывающий второй антиген или эпитоп. Более конкретно, изобретение относится к лигандам с двойной специфичностью, где связывание по меньшей мере с одним из первого или второго антигенов или эпитопов увеличивает период полувыведения лиганда *in vivo*. Описаны лиганды с открытой и закрытой конформацией, включающие более чем одну специфичность связывания.

Введение

Антигенсвязывающий домен антитела содержит две отдельные области: вариабельный домен тяжелой цепи (V_H) и вариабельный домен легкой цепи (V_L , который может представлять собой либо V_{κ} , либо V_{λ}). Собственно антигенсвязывающая область образована шестью полипептидными петлями: три из домена V_H (H1, H2 и H3) и три из домена V_L (L1, L2 и L3). Разнородный первичный репертуар генов вариабельных доменов (V-генов), кодирующих домены V_H и V_L , образован комбинационной перестройкой сегментов генов. Ген V_H образован рекомбинацией трех сегментов генов, V_H , D и J_H . У людей существует приблизительно 51 функциональный сегмент V_H (Cook and Tomlinson (1995), *Immunol Today*, 16: 237), 25 функциональных сегментов D (Corbett et al. (1997), *J. Mol. Biol.*, 268: 69) и 6 функциональных сегментов J_H (Ravetch et al. (1981), *Cell*, 27: 583), в зависимости от гаплотипа. Сегмент V_H кодирует область полипептидной цепи, образующую первую и вторую антигенсвязывающие петли домена V_H (H1 и H2), в то время как третья антигенсвязывающая петля домена V_H (H3) образована комбинацией сегментов V_H , D и J_H . Ген V_L образован рекомбинацией только двух сегментов генов, V_L и J_L . У людей существует приблизительно 40 функциональных сегментов V_{κ} (Schäble and Zachau (1993), *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 374: 1001), 31 функциональный сегмент V_{λ} (Williams et al. (1996), *J. Mol. Biol.*, 264: 220; Kawasaki et al. (1997), *Genome Res.*, 7: 250), 5 функциональных сегментов J_{κ} (Hieter et al. (1982), *J. Biol. Chem.*, 257: 1516) и 4 функциональных сегмента J_{λ} (Vasicek and Leder (1990), *J. Exp. Med.*, 172: 609), в зависимости от гаплотипа. Сегмент V_L кодирует область полипептидной цепи, образующую первую и вторую антигенсвязывающие петли домена V_L (L1 и L2), в то время как третья антигенсвязывающая петля домена V_L (L3) образована комбинацией сегментов V_L и J_L . Полагают, что антитела, выбранные из этого первичного репертуара, обладают достаточным разнообразием для связывания почти всех антигенов, по меньшей мере, с умеренной аффинностью. Высокоаффинные антитела образуются при "созревании аффинности" перестроенных генов, в которых появляются точковые мутации, и в иммунной системе происходит их селекция на основании улучшенного связывания.

Анализ структур и последовательностей антител показал, что пять из шести антигенсвязывающих петель (H1, H2, L1, L2, L3) обладают ограниченным числом конформаций главной цепи или канонических структур (Chothia and Lesk (1987), *J. Mol. Biol.*, 196: 901; Chothia et al. (1989), *Nature*, 342: 877). Конформаций главной цепи определяются (1) длиной антигенсвязывающей петли и (2) определенными остатками или типами остатков в определенных ключевых положениях антигенсвязывающей петли и каркасной области антитела. Анализ длин петель и ключевых остатков позволил авторам изобретения предсказать конформации главной цепи H1, H2, L1, L2 и L3, кодируемые большинством последовательностей человеческих антител (Chothia et al. (1992), *J. Mol. Biol.*, 227: 799; Tomlinson et al. (1995), *EMBO J.*, 14: 4628; Williams et al. (1996), *J. Mol. Biol.*, 264: 220). Хотя область H3 значительно более разнообразна в отношении последовательности, длины и структуры (благодаря использованию сегментов D), она также образует ограниченное число конформаций главной цепи для петель короткой длины, что зависит от длины и присутствия определенных остатков, типов остатков в ключевых положениях петли и каркасной области антитела (Martin et al. (1996), *J. Mol. Biol.*, 263: 800; Shirai et al. (1996), *FEBS Letters*, 399: 1).

Биспецифичные антитела, содержащие комплементарные пары областей V_H и V_L , известны в данной области техники. Эти биспецифичные антитела должны содержать две пары V_H и V_L , из которых каждая пара V_H/V_L связывает один антиген или эпитоп. Описанные способы включают гибридные гибридомы (Milstein & Cuello AC, *Nature* 305:537-40), мини-тела (Hu et al. (1996), *Cancer Res* 56:3055-

3061), диатела (Holliger et al. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448; WO 94/13804), хелатообразующие рекомбинантные антитела (CRABs; Neri et al. (1995), J. Mol. Biol. 246, 367-373), bisFcV (например, Atwell et al. (1996), Mol. Immunol. 33, 1301-1312), антитела, стабилизированные по механизму "knobs in holes" ("выступы в углубления") (Carter et al. (1997), Protein Sci. 6, 781-788). В каждом случае каждый вид антитела содержит две антигенсвязывающие области, каждая из которых образована комплементарной парой доменов V_H и V_L . Каждое антитело, таким образом, способно связывать два различных антигена или эпитопа одновременно, причем связывание каждого антигена или эпитопа опосредовано V_H и комплементарным ему доменом V_L . Каждая из этих методик обладает определенными недостатками; например, в случае гибридных гибридом неактивные пары V_H/V_L могут значительно уменьшать фракцию биспецифичных IgG. Более того, большая часть способов получения биспецифичных антител основана на объединении различных пар V_H/V_L или объединении цепей V_H и V_L для реконструкции двух различных связывающих областей V_H/V_L . Следовательно, соотношение связывающих областей для каждого антигена или эпитопа в объединенной молекуле невозможно проконтролировать, и, таким образом, многие из объединенных молекул будут связывать только один антиген или эпитоп. В некоторых случаях было возможным конструировать тяжелые или легкие цепи на границах субъединиц (Carter et al., 1997) с целью увеличения числа молекул, имеющих связывающие области для обоих антигенов или эпитопов, но это никогда не приводит к тому, что все молекулы обладают связыванием с обоими антигенами или эпитопами.

Существуют некоторые данные о том, что две различные специфичности связывания антител могут быть включены в одну и ту же связывающую область, но это обычно относится к двум или более специфичностям, соответствующим структурно родственными антигенам или эпитопам, или к антителам, обладающим широкой перекрестной реактивностью. Например, были описаны перекрестно реактивные антитела, где два антигена обычно являются родственными по последовательности и структуре, как, например, лизоцим белка куриного яйца и лизоцим индейки (McCafferty et al., WO 92/01047), или к свободному гаптену и гаптену, конъюгированному с носителем (Griffiths A.D. et al. EMBO J. 1994 13:14 3245-60). В другом примере в WO 02/02773 (Abbott Laboratories) описаны молекулы антител с "двойной специфичностью". Названные молекулы антител представляют собой антитела, выработанные или выбранные против нескольких антигенов таким образом, что их специфичность охватывает более чем один антиген. Каждая комплементарная пара V_H/V_L в антителах по WO 02/02773 характеризует одну специфичность связывания в отношении двух или более структурно родственных антигенов; домены V_H и V_L таких комплементарных пар не обладают отдельной специфичностью. Антитела, таким образом, имеют одну широкую специфичность, охватывающую два антигена, являющиеся структурно родственными. Кроме того, были описаны природные аутоантитела, являющиеся полиреактивными (Casali & Notkins, Ann. Rev. Immunol. 7, 515-531), взаимодействующие с по меньшей мере двумя (обычно более) различными антигенами или эпитопами, не являющимися структурно родственными. Также было показано, что селекции случайных пептидных репертуаров с применением технологии фагового дисплея на моноклональное антитело идентифицирует ряд пептидных последовательностей, соответствующих антигенсвязывающей области. Некоторые из последовательностей являются высококоррелированными, соответствуя консенсусной последовательности, в то время как другие сильно различаются и были названы мимотопами (Lane & Stephen, Current Opinion in Immunology, 1993, 5, 268-271). Таким образом, ясно, что природное четырехцепочечное антитело, содержащее связанные и комплементарные домены V_H и V_L , обладает потенциалом связывания со многими различными антигенами из обширной совокупности известных антигенов. Менее понятно, как создать связывающую область для двух данных антигенов в одном и том же антителе, особенно таких антигенов, которые не обязательно являются структурно родственными.

Были предложены способы конструирования белков, имеющие к этому отношение. Например, было также предложено, что может быть создано каталитическое антитело со связывающей активностью в отношении иона металла через один переменный домен и в отношении гаптена (субстрата) через контакты с ионом металла и комплементарный переменный домен (Barbas et al. 1993, Proc. Natl. Acad. Sci USA 90, 6385-6389). Тем не менее, в этом случае предлагают, что связывание и катализ субстрата (первого антигена) требует связывания иона металла (второго антигена). Таким образом, связывание с парой V_H/V_L относится к одному, но многокомпонентному антигену.

Были описаны способы получения биспецифичных антител из отдельных доменов тяжелых цепей антител верблюда, где связывающие контакты для одного антигена создают в одном переменном домене, а для второго антигена - в другом переменном домене. Тем не менее, переменные домены не были комплементарны. Таким образом, первый переменный домен тяжелой цепи выбирают против первого антигена, а второй переменный домен тяжелой цепи - против второго антигена, затем оба домена связывают друг с другом на одной цепи с образованием фрагмента биспецифичного антитела (Conrath et al., J. Biol. Chem. 270, 27589-27594). Тем не менее, верблюжьих отдельные домены тяжелой цепи необычны в том смысле, что они имеют происхождение от природных верблюжьих антител, у которых нет легких цепей, и в действительности отдельные домены тяжелой цепи неспособны к объединению с верблюжьими легкими цепями с образованием комплементарных пар V_H и V_L .

Также были описаны отдельные вариабельные домены тяжелой цепи, которые обычно объединены с легкими цепями, имеющие происхождение от природных антител (из моноклональных антител или из репертуаров доменов; см. EP-A-0368684). Было показано, что эти вариабельные домены тяжелой цепи специфично взаимодействуют с одним или более родственными антигенами, но их не комбинировали с другими вариабельными доменами тяжелой или легкой цепи для образования лиганда со специфичностью в отношении двух или более антигенов. Кроме того, было показано, что эти отдельные домены имеют очень короткий период полувыведения *in vivo*. Таким образом, такие домены имеют ограниченную терапевтическую ценность.

Было предложено получение биспецифичных фрагментов антител связыванием вместе вариабельных доменов тяжелой цепи с разной специфичностью (как описано выше). Недостатком этого способа является то, что выделенные вариабельные домены антител могут иметь гидрофобную внутреннюю поверхность, которая обычно взаимодействует с легкой цепью, обычно контактирует с растворителем и может быть "липкой", позволяя отдельному домену связывать гидрофобные поверхности. Кроме того, в отсутствие легкой цепи-партнера комбинация двух или более различных вариабельных доменов тяжелой цепи и их объединение, возможно, через их гидрофобные внутренние поверхности, может предотвратить их связывание с одним лигандом, если не с обоими лигандами, которые они способны связывать по отдельности. Более того, в этом случае вариабельные домены тяжелой цепи могут объединяться с комплементарными вариабельными доменами легкой цепи и, таким образом, могут быть менее стабильны и легко подвержены анфолдингу (Worn & Pluckthun, 1998, *Biochemistry* 37, 13120-7).

Краткое изложение сущности изобретения

Авторы настоящего изобретения описали в их находящейся в процессе одновременного рассмотрения международной заявке на патент WO 03/002609, а также в находящейся в процессе одновременного рассмотрения неопубликованной заявке на патент Великобритании № 0230203.2, иммуноглобулиновые лиганды с двойной специфичностью, содержащие отдельные вариабельные домены иммуноглобулинов, специфичность которых различна. Домены могут действовать конкурентно в отношении друг друга или независимо со связыванием антигенов или эпитопов на молекулах-мишенях.

В первой форме согласно настоящему изобретению предложено дополнительное усовершенствование лигандов с двойной специфичностью, разработанных авторами настоящего изобретения, где одну специфичность лиганда направляют на белок или полипептид, присутствующий в организме *in vivo*, связывание с которым может увеличивать период полувыведения лиганда.

Соответственно, в первом аспекте предложен лиганд с двойной специфичностью, содержащий первый отдельный вариабельный домен иммуноглобулина, имеющий специфичность связывания в отношении первого антигена или эпитопа, и второй комплементарный отдельный вариабельный домен иммуноглобулина, имеющий связывающую активность в отношении второго антигена или эпитопа, где один или оба указанных антигена или эпитопа действуют для увеличения периода полувыведения лиганда *in vivo* и где в указанных первом и втором доменах нет взаимно комплементарных доменов с той же специфичностью, при условии, что указанный лиганд с двойной специфичностью не состоит из домена V_H против HSA и домена V_K против β-галактозидазы. Предпочтительно ни один из первого или второго вариабельных доменов не связывает человеческий сывороточный альбумин (HSA).

Антигены или эпитопы, увеличивающие период полувыведения лиганда, как описано здесь, преимущественно присутствуют на белках или полипептидах, обнаруживаемых в организме *in vivo*. Примеры включают белки внеклеточного матрикса, белки крови и белки, присутствующие в различных тканях в организме. Белки снижают скорость клиренса лиганда из крови, например, действуя как наполнители, или фиксируя лиганд к желаемому месту действия. Примеры антигенов/эпитопов, действующих для увеличения периода полувыведения *in vivo*, даны в приложении 1 ниже.

Увеличенный период полувыведения полезен при *in vivo* применениях иммуноглобулинов, конкретно антител и наиболее конкретно фрагментов антител малого размера. Такие фрагменты (Fv, связанные дисульфидными связями Fv, Fab, scFv, доменные антитела (dAb)) подвержены быстрому удалению из организма; таким образом, в то время как они способны быстро достигать большинства частей тела, их производство занимает незначительное время и они более просты в использовании, их применения *in vivo* были ограничены лишь их коротким сохранением *in vivo*. Согласно изобретению эту проблему решают, обеспечивая увеличенный период полувыведения лигандов *in vivo* и, вследствие этого, более длительное время сохранения функциональной активности лиганда в организме.

Способы фармакокинетического анализа и определения периода полувыведения лиганда будут знакомы специалистам в данной области техники. Подробности могут быть обнаружены в Kenneth, A. et al.: *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists and in Peters et al., Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach* (1996). Также сделана ссылка на "Pharmacokinetics", M Gibaldi & D Perron, published by Marcel Dekker, 2nd Rev. ex edition (1982), где описаны такие фармакокинетические параметры, как периоды полувыведения t-альфа (t_α) и t-бета (t_β) и площадь под кривой (AUC).

Периоды полувыведения (t_{1/2}альфа и t_{1/2}бета) и AUC могут быть определены по кривой

зависимости концентрации лиганда в сыворотке от времени. Пакет программ для расчётов WinNonlin (доступный от Pharsight Corp., Mountain View, CA94040, USA) может быть использован, например, для моделирования кривой. В первой фазе (альфа-фаза) лиганд проходит главным образом распределение в организме пациента с незначительным выведением. Вторая фаза (бета-фаза) является конечной фазой, когда лиганд был распределен и концентрация в сыворотке снижается по мере того, как лиганд выводится из организма пациента. Период полувыведения $t_{1/2\alpha}$ является периодом полувыведения первой фазы, а период полувыведения $t_{1/2\beta}$ является периодом полувыведения второй фазы. Таким образом, преимущественно согласно настоящему изобретению предложен лиганд или композиция, содержащая лиганд по изобретению, имеющий период полувыведения $t_{1/2}$ в диапазоне 15 мин или более. В одном воплощении нижняя граница диапазона составляет 30, 45 мин, 1 ч, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11 или 12 ч. В дополнение или альтернативно, лиганд или композиция по изобретению будут иметь период полувыведения $t_{1/2}$ в диапазоне до 12 ч включительно. В одном воплощении верхняя граница диапазона составляет 11, 10, 9, 8, 7, 6 или 5 ч. Пример подходящего диапазона составляет от 1 до 6 ч, от 2 до 5 ч или от 3 до 4 ч.

Преимущественно согласно настоящему изобретению предложен лиганд или композиция, содержащая лиганд по изобретению, имеющий период полувыведения $t_{1/2}$ в диапазоне 2,5 ч или более. В одном воплощении нижняя граница диапазона составляет 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11 или 12 ч. В дополнение или альтернативно, лиганд или композиция по изобретению имеет период полувыведения $t_{1/2}$ в диапазоне до 21 дня включительно. В одном воплощении верхняя граница диапазона составляет 12 ч, 24 ч, 2 дня, 3, 5, 10, 15 или 20 дней. Преимущественно лиганд или композиция по изобретению будет иметь период полувыведения $t_{1/2}$ в диапазоне от 12 до 60 ч. В дополнительном воплощении он будет в диапазоне от 12 до 48 ч. В еще одном дополнительном воплощении он будет в диапазоне от 12 до 26 ч.

В дополнение или альтернативно к вышеописанным критериям, согласно настоящему изобретению предложен лиганд или композиция, содержащая лиганд по изобретению, имеющий значение AUC (площадь под кривой) в диапазоне 1 мг/мин/мл или более. В одном воплощении нижняя граница диапазона составляет 5, 10, 15, 20, 30, 100, 200 или 300 мг/мин/мл. В дополнение или альтернативно, лиганд или композиция по изобретению имеет AUC в диапазоне до 600 мг/мин/мл. В одном воплощении верхняя граница диапазона составляет 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75 или 50 мг/мин/мл. Преимущественно лиганд по изобретению будет иметь AUC в диапазоне, выбранном, предпочтительно без ограничения, из группы, состоящей из следующего: от 15 до 150, от 15 до 100, от 15 до 75 и от 15 до 50 мг/мин/мл.

В первом воплощении лиганд с двойной специфичностью содержит два комплементарных переменных домена, т.е. два переменных домена, которые в их природной среде способны действовать совместно как когнатная пара или группа, даже если в контексте настоящего изобретения они связывают их когнатные эпитопы по отдельности. Например, комплементарные переменные домены могут представлять собой переменные домены тяжелой цепи или легкой цепи иммуноглобулина (V_H и V_L). Домены V_H и V_L преимущественно представлены фрагментами антител scFv или Fab. Переменные домены могут быть связаны друг с другом с образованием мультивалентных лигандов посредством, например, обеспечения присутствия шарнирной области на С-конце каждого переменного домена (V-домена) и дисульфидным связыванием цистеинов в шарнирных областях; или обеспечением присутствия в каждом dAb цистеина на С-конце домена, где цистеины связаны друг с другом дисульфидной связью; или образованием V-CH и V-CL с образованием Fab-формата; или применением пептидных линкеров (например, линкеров Gly_4Ser , обсуждаемых в данном изобретении ниже) с образованием димеров, тримеров и других мультимеров.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что применение комплементарных переменных доменов делает возможной совместную упаковку поверхностей доменов и их отделение от растворителя. Кроме того, комплементарные домены способны стабилизировать друг друга. Более того, это делает возможным создание IgG-антител с двойной специфичностью без недостатков, связанных с гибридными гибридами, которые применяли в предшествующем уровне техники, или необходимости конструирования тяжелых или легких цепей на внутренних поверхностях субъединиц. Лиганды с двойной специфичностью по первому аспекту настоящего изобретения имеют по меньшей мере одну пару V_H/V_L . Биспецифичный IgG по данному изобретению будет, таким образом, содержать две такие пары, по одной паре на каждом плече Y-образной молекулы. Таким образом, в отличие от обычных биспецифичных антител или диател, где соотношение используемых цепей является определяющим для успешного их получения и приводит к практическим трудностям, лиганды с двойной специфичностью по изобретению свободны от проблем баланса цепей. Дисбаланс цепей в обычных биспецифичных антителах является результатом объединения двух различных цепей V_L с двумя различными цепями V_H , где 1 цепь V_L совместно с 1 цепью V_H способна связывать 1 антиген или эпитоп, и 2 цепь V_L совместно со 2 цепью V_H способна связывать 2 антигена или эпитопа, и две правильные пары некоторым образом связаны друг с другом. Таким образом, биспецифичность появляется только тогда, когда 1 цепь V_L образует пару с 1 цепью V_H и 2 цепь V_L образует пару со 2 цепью V_H в одной молекуле. Такие

биспецифичные молекулы могут быть созданы двумя разными способами. Во-первых, они могут быть созданы объединением двух существующих пар V_H/V_L , каждая из которых связывает различный антиген или эпитоп (например, в биспецифичном IgG). В этом случае пары V_H/V_L должны быть объединены в соотношении 1:1 для образования популяции молекул, каждая из которых является биспецифичной. Этого никогда не происходит (даже когда комплементарный домен СН усилен "knobs into holes"-конструированием), что приводит к образованию смеси биспецифичных молекул и молекул, способных связывать лишь один антиген или эпитоп. Второй способ создания биспецифичного антитела заключается в одновременном объединении двух различных цепей V_H с двумя различными цепями V_L (например, в биспецифичном диателе). В этом случае, хотя и существует тенденция к преимущественному образованию пар 1 цепи V_L с 1 цепью V_H и 2 цепи V_L со 2 цепью V_H (которые могут быть усилены "knobs into holes"-конструированием доменов V_H и V_L), никогда не удастся достичь такого образования пар во всех молекулах, что ведет к образованию смешанной композиции, где имеют место неправильные пары, неспособные связывать какой-либо из антигенов или эпитопов.

В биспецифичных антителах, полученных способом лиганда с двойной специфичностью по первому аспекту настоящего изобретения, все эти проблемы преодолены, поскольку связывание 1 антигена или эпитопа присуще домену V_H или V_L и связывание 2 антигена или эпитопа присуще комплементарному домену V_H или V_L соответственно. Поскольку домены V_H и V_L образуют пары в соотношении 1:1, все пары V_H/V_L будут биспецифичными, и, таким образом, все форматы, конструированные с применением этих пар V_H/V_L (Fv, scFv, Fab, мини-тела, IgG и т.п.), будут иметь 100% биспецифичную активность.

В контексте настоящего изобретения первый и второй "эпитопы" следует понимать как эпитопы, не являющиеся одинаковыми и не связываемые одним моноспецифичным лигандом. В первой форме изобретения они преимущественно расположены на разных антигенах, один из которых увеличивает период полувыведения лиганда *in vivo*. Подобным образом, первый и второй антигены преимущественно не являются одинаковыми.

Лиганды с двойной специфичностью по изобретению не включают лиганды, как описано в WO 02/02773. Таким образом, лиганды по настоящему изобретению не включают комплементарные пары V_H/V_L , связывающие один или более антигены или эпитопы кооперативно. Взамен этого, лиганды по первому аспекту изобретения включают комплементарную пару V_H/V_L , где V -домены имеют разные специфичности.

Более того, лиганды по первому аспекту изобретения включают комплементарные пары V_H/V_L , имеющие различные специфичности в отношении эпитопов или антигенов, не являющихся структурно родственными. Структурно родственные эпитопы или антигены являются эпитопами или антигенами, обладающими достаточным структурным сходством для того, чтобы быть связанными обычной комплементарной парой V_H/V_L , действующей кооперативным образом для связывания антигена или эпитопа; в случае структурно родственных эпитопов эпитопы достаточно сходны по структуре, так что они "подходят" к одному и тому же связывающему карману, образованному в антигенсвязывающей области димера V_H/V_L .

Во втором аспекте согласно настоящему изобретению предложен лиганд, содержащий первый переменный домен иммуноглобулина, имеющий первую специфичность связывания в отношении антигена или эпитопа, и второй переменный домен иммуноглобулина, имеющий вторую специфичность связывания в отношении антигена или эпитопа, где один или оба из указанных первого и второго переменных доменов связывают антиген, увеличивающий период полувыведения лиганда *in vivo*, и переменные домены не являются комплементарными по отношению друг к другу.

В одном воплощении связывание с одним переменным доменом модулирует связывание лиганда со вторым переменным доменом.

В этом воплощении переменный домен может представлять собой, например, пары доменов V_H или пары доменов V_L . Связывание антигена в первой области может модулировать, как, например, усиливать или ингибировать, связывание антигена во второй области. Например, связывание в первой области, по меньшей мере, частично ингибирует связывание антигена во второй области. В таком воплощении лиганд может, например, быть сохранен в организме-субъекте *in vivo* посредством связывания с белком, увеличивающим период полувыведения лиганда, до того времени, пока он не будет связан со вторым антигеном-мишенью и отсоединен от белка, увеличивающего период полувыведения.

Модулирование связывания в изложенном выше контексте достигается вследствие структурной близости антигенсвязывающих областей по отношению друг к другу. Такая структурная близость может быть достигнута ввиду природы структурных компонентов, связывающих две или более антигенсвязывающих области, например, обеспечением лиганда с относительно ригидной структурой, удерживающей антигенсвязывающие области в тесной близости. Преимущественно две или более антигенсвязывающих области находятся в физически тесной близости друг от друга таким образом, что одна область модулирует связывание антигена в другой области в результате процесса, включающего стерическое затrudнение и/или конформационные изменения в молекуле иммуноглобулина.

Первый и второй антигенсвязывающие домены могут быть связаны либо ковалентно, либо

нековалентно. В случае, когда домены связаны ковалентно, связывание может быть опосредовано, например, дисульфидными связями или полипептидным линкером, таким как $(Gly_4Ser)_n$, где n – от 1 до 8, например 2, 3, 4, 5 или 7.

Лиганды по изобретению могут быть комбинированы с образованием неиммуноглобулиновых мультлигандных структур для образования мультивалентных комплексов, связывающих молекулы-мишени с одним и тем же антигеном, обеспечивая посредством этого повышенную avidность, в то время как по меньшей мере один вариабельный домен связывает антиген для увеличения периода полувыведения мультимера. Например, природные бактериальные рецепторы, такие как SpA, были использованы как каркасы для переноса гипервариабельных участков (CDR) с образованием лигандов, специфично связывающих один или более чем один эпитоп. Подробности этого способа описаны в US 5831012. Другие подходящие каркасы включают каркасы на основе фибронектина и Affibodies™. Подробности подходящих способов описаны в WO 98/58965. Другие подходящие каркасы включают липокалин и CTLA4, как описано в van den Beuken et al., J. Mol. Biol. (2001), 310, 591-601, и такие каркасы, как описанные в WO 0069907 (Medical Research Council), основанные, например, на кольцевой структуре бактериального GroEl или других полипептидов-шаперонов.

Белковые каркасы можно комбинировать; например, CDR могут быть перенесены на каркас CTLA4 и использованы совместно с доменами иммуноглобулинов V_H или V_L с образованием лиганда. Подобным образом можно комбинировать фибронектиновые, липокалиновые и другие каркасы.

В случае, когда вариабельные домены выбраны из репертуаров V-генов, селектированных, например, с применением технологии фагового дисплея, как описано здесь, эти вариабельные домены могут содержать универсальную каркасную область таким образом, что они могут быть распознаны специфичным лигандом общего типа, как определено здесь. Применение универсальных каркасных областей, лигандов общего типа и т.п. описано в WO 99/20749. В настоящем изобретении ссылка на фаговый дисплей включает применение фагов и/или фагмид.

Там, где используют репертуары V-генов, разнообразие полипептидной последовательности предпочтительно заключено в структурных петлях вариабельных доменов. Полипептидные последовательности каждого вариабельного домена могут быть изменены перетасовкой ДНК или мутацией с целью усиления взаимодействия каждого вариабельного домена с его комплементарной парой.

В предпочтительном воплощении изобретения "лиганд с двойной специфичностью" представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент. В альтернативном воплощении изобретения "лиганд с двойной специфичностью" состоит из Fab-области антитела. Термин "Fab-область" включает Fab-подобную область, где использованы два домена V_H или два домена V_L .

Вариабельные домены могут иметь происхождение от антител, направленных против антигенов-мишеней или эпитопов-мишеней. Альтернативно, они могут иметь происхождение от репертуара отдельных доменов антител, как, например, экспрессированных на поверхности нитчатого бактериофага. Селекцию можно проводить, как описано ниже.

В третьем аспекте согласно изобретению предложен способ получения лиганда, содержащего первый отдельный вариабельный домен иммуноглобулина, имеющий первую специфичность связывания, и второй отдельный вариабельный домен иммуноглобулина, имеющий вторую (другую) специфичность связывания, где одна или обе специфичности связывания специфичны в отношении антигена, увеличивающего период полувыведения лиганда *in vivo*, включающий стадии:

- а) селекции первого вариабельного домена по его способности связывать первый эпитоп;
- б) селекции второго вариабельного домена по его способности связывать второй эпитоп;
- в) комбинирования вариабельных доменов;
- г) селекции лиганда по его способности связывать указанный первый эпитоп и указанный второй эпитоп.

Лиганд может связывать первый и второй эпитопы либо одновременно, либо там, где связывающие домены связывают эпитопы конкурентно, связывание одного домена может предотвращать связывание другого домена с его штатным эпитопом. В одном воплощении, таким образом, указанная выше стадия (г) требует одновременного связывания как первого, так и второго эпитопа (и, возможно, дополнительных эпитопов); в другом воплощении связывание первого и второго эпитопов не является одновременным.

Эпитопы предпочтительно расположены на отдельных антигенах.

Лиганды преимущественно содержат комбинации вариабельных доменов иммуноглобулинов V_H/V_L или комбинации V_H/V_H или V_L/V_L , как описано выше. Более того, лиганды могут содержать домены V_{HH} представителей семейства верблюдовых, при условии, что домен V_{HH} , специфичный в отношении антигена, увеличивающего период полувыведения лиганда *in vivo*, не связывает лизоцим белка куриного яйца (HEL), альфа-амилазу поджелудочной железы свиньи или NmC-A; hcg, азокраситель RR6, связанный с бычьим сывороточным альбумином (BSA), или клетки HG982 S. mutans, как описано в Congath et al. (2001), JBC 276:7346-7350 и WO 99/23221, ни в одной из которых не описано применение специфичности в отношении антигена, увеличивающего период полувыведения, для увеличения периода

полувыведения лиганда *in vivo*.

В одном воплощении указанный первый вариабельный домен выбран для связывания указанного первого эпитопа в отсутствие комплементарного вариабельного домена. В другом воплощении указанный первый вариабельный домен связывания указанного первого эпитопа/антигена в присутствии третьего вариабельного домена, где указанный третий вариабельный домен отличается от указанного второго вариабельного домена и комплементарен первому домену. Сходным образом, второй домен может быть выбран в отсутствие или в присутствии комплементарного вариабельного домена.

Антигены или эпитопы, являющиеся мишенями для лигандов по изобретению, увеличивающие период полувыведения лиганда, не ограничены мишенями на сывороточном альбумине. Другие воплощения антигенов или эпитопов, являющихся мишенями для лигандов по изобретению, увеличивающие период полувыведения лиганда *in vivo*, включают, предпочтительно без ограничения, те антигены и эпитопы, которые перечислены в приложении 1 ниже.

Антигены или эпитопы, являющиеся мишенями для лигандов по изобретению, в дополнение к увеличивающему период полувыведения белку, могут представлять собой любой антиген или эпитоп, но преимущественно представляют собой антиген или эпитоп, направленное воздействие на который сопряжено с терапевтическим эффектом. Согласно изобретению предложены лиганды, включая лиганды с открытой конформацией, закрытой конформацией и лиганды, представляющие собой выделенные мономеры dAb, специфичные в отношении любой такой мишени, в частности, тех мишеней, которые дополнительно обозначены здесь. Такие мишени могут представлять собой полипептиды, белки или нуклеиновые кислоты, которые могут быть встречающимися в природе или синтетическими, или быть их частью. В этом отношении, лиганд по изобретению может связывать эпитоп или антиген и действовать как антагонист или агонист (например, агонист рецептора эритропоэтина (EPO)). Специалисту в данной области техники будет ясно, что выбор широк и разнообразен. Они могут представлять собой, например, белки человека или животных, цитокины, рецепторы цитокинов, где рецепторы цитокинов включают рецепторы цитокинов, ферментов, кофакторов ферментов или ДНК-связывающих белков. Подходящие цитокины и факторы роста включают, предпочтительно без ограничения, аполипопротеин E (ApoE), аполипопротеин SAA (Apo-SAA), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), кардиотрофин-1, эпидермальный фактор роста (EGF), рецептор EGF, ENA-78, эотаксин, эотаксин-2, Exodus-2, EpoR, кислый фактор роста фибробластов (FGF), основной FGF, фактор роста фибробластов-10, лиганд FLT3, фракталкин (CX3C), глиальный нейротрофический фактор (GDNF), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), GF- β 1, инсулин, γ -интерферон (IFN- γ), инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-I), инсулиноподобный фактор роста-2 (IGF-II), интерлейкин-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (72 аминокислоты (a.a.)), IL-8 (77 a.a.), IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 (IFN γ -индуцирующий фактор (IGIF)), ингибин α , ингибин β , IP-10, фактор роста кератиноцитов-2 (KGF-2), KGF, лептин, лейкемический ингибиторный фактор (LIF), лимфотактин, мюллерову ингибирующую субстанцию, фактор, ингибирующий колонии моноцитов, моноцитарный аттрактантный белок, моноцитарный колониингибирующий фактор M-CSF, MDC (67 a.a.), MDC (69 a.a.), моноцитарный хемотаксический белок-1 (MCP-1) (моноцитарный хемотаксический и активирующий фактор (MCAF)), MCP-2, MCP-3, MCP-4, MDC (67 a.a.), MDC (69 a.a.), MIG, макрофагальный воспалительный белок-1 α (MIP-1 α), MIP-1 β , MIP-3 α , MIP-3 β , MIP-4, фактор, ингибирующий миелоидных предшественников, 1 типа (MIPF-1), нейтрофил-активирующий белок-2 (NAP-2), неуртурин, фактор роста нервов, фактор роста нервов- β (β -NGF), нейротрофин-3 (NT-3), NT-4, онкостатин M, тромбоцитарный фактор роста AA (PDGF-AA), PDGF-AB, PDGF-BB, тромбоцитарный фактор-4 (PF-4), RANTES, фактор стромальных клеток-1 α (SDF1 α), SDF1 β , фактор стволовых клеток (SCF), фактор роста стволовых клеток (SCGF), фактор стволовых клеток (SCF), тимус-ассоциированные регуляторные хемокины (TARC), трансформирующий фактор роста- α (TGF- α), TGF- β , TGF- β 2, TGF- β 3, фактор некроза опухоли (TNF), TNF- α , TNF- β , рецептор TNF I типа, рецептор TNF II типа, TNIL-1, TPO, сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), рецептор VEGF 1 типа, рецептор VEGF 2 типа, рецептор VEGF 3 типа, гранулоцитарный хемотаксический белок-2 (GCP-2), GRO/MGSA, GRO- β , GRO- γ , HCC1, I-309, рецептор человеческого эпидермального фактора роста-1 (HER 1), HER 2, HER 3 и HER 4, CD4, человеческие рецепторы хемокинов CXCR4 или CCR5, неструктурный белок 3 типа (NS3) вируса гепатита C, TNF-альфа, IgE, IFN-гамма, матриксную металлопротеиназу-12 (MMP-12), раковоэмбриональный антиген (CEA), *H. pylori*, TB, вирус гриппа, вирус гепатита E, MMP-12, интернализуемые рецепторы, сверхэкспрессируемые на определенных клетках, такие как рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), рецептор ErbB2 на опухолевых клетках, интернализуемый клеточный рецептор, рецептор липопротеинов низкой плотности (LDL), рецептор FGF2, рецептор ErbB2, рецептор трансферрина, рецептор PDGF, рецептор VEGF, PsmAg, белок внеклеточного матрикса, эластин, фибронектин, ламинин, α 1-антитрипсин, тканевой фактор, ингибирующий протеазы, PDK1, GSK1, Bad, каспазу-9, Forkhead, антиген *Helicobacter pylori*, антиген *Mycobacterium tuberculosis* и антиген вируса гриппа. Следует понимать, что этот список ни в коем случае не является исчерпывающим.

В одном воплощении изобретения переменные домены имеют происхождение от соответствующего антитела, направленного против антигена или эпитопа. В предпочтительном воплощении переменные домены имеют происхождение от репертуара отдельных переменных доменов антител.

В другом аспекте согласно настоящему изобретению предложена одна молекула нуклеиновых кислот или более, кодирующая, по меньшей мере, лиганд с двойной специфичностью, как определено здесь. Лиганд с двойной специфичностью может быть закодирован на одной молекуле нуклеиновой кислоты; альтернативно, каждый домен может быть закодирован отдельной молекулой нуклеиновой кислоты. Там, где лиганд закодирован одной молекулой нуклеиновой кислоты, домены могут быть экспрессированы в виде слитого полипептида, в форме молекулы scFv, или могут быть экспрессированы по отдельности и впоследствии соединены друг с другом, например, с использованием химических линкеров. Лиганды, экспрессированные с отдельных нуклеиновых кислот, будут связаны друг с другом подходящими способами.

Нуклеиновая кислота может также кодировать сигнальную последовательность для экспорта полипептидов из клетки-хозяина при экспрессии и может быть слита с поверхностным компонентом частицы нитчатого бактериофага (или другим компонентом дисплейной системы для селекции) при экспрессии.

В другом аспекте согласно настоящему изобретению предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую лиганд с двойной специфичностью по настоящему изобретению.

В еще одном другом аспекте согласно настоящему изобретению предложена клетка-хозяин, трансфицированная вектором, кодирующим лиганд с двойной специфичностью по настоящему изобретению.

Экспрессия с такого вектора может быть изменена для образования, например, на поверхности частицы бактериофага, переменных доменов для селекции. Это делает возможным селекцию представленных переменных доменов и, таким образом, селекцию "лигандов с двойной специфичностью" с применением способа по настоящему изобретению.

Согласно настоящему изобретению также предложен набор, содержащий, по меньшей мере, лиганд с двойной специфичностью по настоящему изобретению.

Лиганды с двойной специфичностью по настоящему изобретению предпочтительно содержат комбинации доменов тяжелой и легкой цепи. Например, лиганд с двойной специфичностью может содержать домен V_H и домен V_L , которые могут быть связаны друг с другом в форме scFv. В дополнение, лиганды могут содержать один или более чем один домен C_H или C_L . Например, лиганды могут содержать домен C_{H1} , C_{H2} или домен C_{H3} , и/или домен C_L , домены $C_{\mu 1}$, $C_{\mu 2}$, $C_{\mu 3}$ или $C_{\mu 4}$, или любую их комбинацию. Также может быть включена шарнирная область. Такие комбинации доменов могут, например, имитировать природные антитела, такие как IgG или IgM, или их фрагменты, такие как молекулы Fv, scFv, Fab или $F(ab')_2$. Предусмотрены другие структуры, такие как отдельное плечо молекулы IgG, содержащее домены V_H , V_L , C_{H1} и C_L .

В предпочтительном воплощении изобретения переменные области выбраны из репертуаров V-генов отдельных доменов. В большинстве случаев репертуар отдельных доменов антител представляют на поверхности нитчатого бактериофага. В предпочтительном воплощении каждый отдельный домен антитела селекционируют связыванием фагового репертуара с антигеном.

В предпочтительном воплощении изобретения каждый отдельный переменный домен может быть селекционирован для связывания его антигена-мишени или эпитопа-мишени в отсутствие комплементарной переменной области. В альтернативном воплощении отдельные переменные домены могут быть селекционированы для связывания их антигена-мишени или эпитопа-мишени в присутствии комплементарной переменной области. Таким образом, первый отдельный переменный домен может быть селекционирован в присутствии третьего комплементарного переменного домена, и второй переменный домен может быть селекционирован в присутствии четвертого комплементарного переменного домена. Комплементарный третий или четвертый переменный домен может быть естественным когнатным переменным доменом, имеющим ту же специфичность, как и исследуемый отдельный домен, или некогнатным комплементарным доменом, таким как "модельный" переменный домен.

Предпочтительно лиганд с двойной специфичностью по изобретению содержит только два переменных домена, хотя несколько таких лигандов могут быть включены совместно в один тот же белок, например, два таких лиганда могут быть включены в IgG или мультимерный иммуноглобулин, как, например, IgM. Альтернативно, в другом воплощении множество лигандов с двойной специфичностью комбинируют с образованием мультимера. Например, два различных лиганда с двойной специфичностью комбинируют для создания тетраспецифичной молекулы.

Специалисту в данной области техники будет ясно, что переменные домены легкой и тяжелой цепи лиганда с двойной специфичностью, полученного способом по настоящему изобретению, могут быть расположены на одной полипептидной цепи или, альтернативно, на разных полипептидных цепях. В случае, когда переменные домены расположены на разных полипептидных цепях, они могут быть

связаны линкером, в большинстве случаев гибким линкером (таким как полипептидная цепь), химической связывающей группой или любым другим способом, известным в данной области техники.

В другом аспекте согласно настоящему изобретению предложена композиция, содержащая лиганд с двойной специфичностью, который можно получить способом по настоящему изобретению, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

Более того, согласно настоящему изобретению предложен способ лечения и/или предотвращения заболевания с применением "лиганда с двойной специфичностью" или композиции по настоящему изобретению.

Во второй форме согласно настоящему изобретению предложены мультиспецифичные лиганды, содержащие по меньшей мере два некомплементарных переменных домена. Например, лиганды могут содержать пару доменов V_H или пару доменов V_L . Преимущественно домены имеют происхождение от источника, не являющегося представителем семейства верблюдовых; предпочтительно они являются человеческими доменами или содержат человеческие каркасные области (FW) и одну или более гетерологичные CDR. CDR и каркасные области представляют собой области переменных доменов иммуноглобулинов, определенные в базе данных Kabat database of Sequences of Proteins of Immunological Interest.

Предпочтительные человеческие каркасные области представляют собой области, кодируемые сегментами генов DP47 и DPK9 эмбрионального типа. Преимущественно FW1, FW2 и FW3 домена V_H или V_L имеют последовательность FW1, FW2 или FW3 из DP47 или DPK9. Человеческие каркасные области могут, возможно, содержать мутации, например, в общей сложности до приблизительно 5 аминокислотных замен или до приблизительно 10 аминокислотных замен в человеческих каркасных областях, используемых в лигандах по изобретению.

Переменные домены в мультиспецифичных лигандах по второй форме изобретения могут быть расположены в открытой или закрытой конформации; т.е. они могут быть расположены таким образом, что переменные домены могут связывать их когнатные лиганды независимо и одновременно, или таким образом, что только один из переменных доменов может связывать его когнатный лиганд в определенный момент времени.

Авторам настоящего изобретения было ясно, что при определенных структурных условиях некомплементарные переменные домены (например, два переменных домена легкой цепи и два переменных домена тяжелой цепи) могут присутствовать в лиганде таким образом, что связывание первого эпитопа с первым переменным доменом ингибирует связывание второго эпитопа со вторым переменным доменом, даже если такие некомплементарные домены не действуют совместно как когнатная пара.

Преимущественно лиганд содержит две или более пары переменных доменов; тот есть он содержит по меньшей мере четыре переменных домена. Преимущественно четыре переменных домена содержат каркасные области человеческого происхождения.

В предпочтительном воплощении человеческие каркасные области идентичны каркасным областям человеческих последовательностей зародышевого типа.

Авторы настоящего изобретения полагают, что такие антитела будут особенно применимы в исследованиях связывания лигандов для терапевтических и других применений.

Таким образом, в первом аспекте второй формы согласно настоящему изобретению предложен способ получения мультиспецифичного лиганда, включающий стадии:

- а) селекции первого эпитопсвязывающего домена по его способности связывать первый эпитоп;
- б) селекции второго эпитопсвязывающего домена по его способности связывать второй эпитоп;
- в) комбинирования эпитопсвязывающих доменов и
- г) селекции мультиспецифичного лиганда с закрытой конформацией по его способности связывать указанный первый эпитоп и указанный второй эпитоп.

В другом аспекте второй формы согласно изобретению предложен способ получения мультиспецифичного лиганда с закрытой конформацией, содержащего первый эпитопсвязывающий домен, имеющий специфичность связывания в отношении первого эпитопа, и некомплементарный второй эпитопсвязывающий домен, имеющий специфичность связывания в отношении второго эпитопа, где первая и вторая специфичности связывания конкурируют за связывание эпитопа таким образом, что мультиспецифичный лиганд с закрытой конформацией не может связывать оба эпитопа одновременно, включающий стадии:

- а) селекции первого эпитопсвязывающего домена по его способности связывать первый эпитоп;
- б) селекции второго эпитопсвязывающего домена по его способности связывать второй эпитоп;
- в) комбинирования эпитопсвязывающих доменов таким образом, что домены расположены в закрытой конформации;
- г) селекции мультиспецифичного лиганда с закрытой конформацией по его способности связывать указанный первый эпитоп и указанный второй эпитоп, но не оба указанных первый и второй эпитопы одновременно.

Более того, согласно изобретению предложен мультиспецифичный лиганд с закрытой

конформацией, содержащий первый эпитопсвязывающий домен, имеющий специфичность связывания в отношении первого эпитопа, и некомплементарный второй эпитопсвязывающий домен, имеющий специфичность связывания в отношении второго эпитопа, где первая и вторая специфичности связывания конкурируют за связывание эпитопа таким образом, что мультиспецифичный лиганд с закрытой конформацией не может связывать оба эпитопа одновременно.

Альтернативное воплощение вышеизложенного аспекта второй формы изобретения, возможно, включает стадию (б1), включающую выбор третьего или дополнительного эпитопсвязывающего домена. Получаемый этим способом мультиспецифичный лиганд с открытой или закрытой конформацией включает специфичность связывания в отношении более чем двух эпитопов. В предпочтительном аспекте второй формы изобретения, где мультиспецифичный лиганд содержит более чем два эпитопсвязывающих домена, по меньшей мере два из указанных доменов расположены в закрытой конформации и конкурируют за связывание; другие домены могут конкурировать за связывание или могут быть способны к независимому объединению с их когнатным эпитопом (эпитопами).

Согласно настоящему изобретению термин "мультиспецифичный лиганд" относится к лиганду, обладающему специфичностью связывания в отношении более чем одного эпитопа, как определено здесь.

Как определено здесь, термин "закрытая конформация" (мультиспецифичного лиганда) означает, что эпитопсвязывающие домены лиганда присоединены или объединены друг с другом, возможно, посредством белкового скелета таким образом, что связывание эпитопа одним эпитопсвязывающим доменом конкурирует со связыванием эпитопа другим эпитопсвязывающим доменом. Т.е. когнатные эпитопы могут быть связаны каждым эпитопсвязывающим доменом по отдельности, но не одновременно. Закрытая конформация лиганда может быть получена с применением способов, описанных здесь.

"Открытая конформация" обозначает, что эпитопсвязывающие домены лиганда присоединены или объединены друг с другом, возможно, посредством белкового скелета таким образом, что связывание эпитопа одним эпитопсвязывающим доменом не конкурирует со связыванием эпитопа другим эпитопсвязывающим доменом.

Термин "конкурирует", как он назван здесь, обозначает, что связывание первого эпитопа с его когнатным эпитопсвязывающим доменом ингибировано, когда второй эпитоп связан с его когнатным эпитопсвязывающим доменом. Например, связывание может быть ингибировано стерически, например, физическим блокированием связывающего домена или изменением структуры или окружения связывающего домена таким образом, что его аффинность или авидность в отношении эпитопа уменьшается.

В другом аспекте второй формы изобретения эпитопы могут вытеснять друг друга при связывании. Например, первый эпитоп может присутствовать на антигене, который, при связывании с его когнатным первым связывающим доменом, вызывает стерическое несоответствие второго связывающего домена или его конформационное изменение, которое вытесняет эпитоп, связанный со вторым связывающим доменом.

Преимущественно связывание уменьшено на 25% или более, преимущественно 40, 50, 60, 70, 80, 90% или более и предпочтительно до 100% или около того таким образом, что связывание полностью ингибировано. Связывание эпитопов может быть измерено обычными исследованиями связывания антигенов, такими как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), методиками, основанными на флуоресценции, включая резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET), или такими методиками, как поверхностный плазмонный резонанс, посредством которого измеряют массу молекул. Специфичное связывание антигенсвязывающего белка с антигеном или эпитопом может быть определено подходящим исследованием, включая, например, анализ Скэтчарда и/или исследования конкурентного связывания, такие как радиоиммуноанализы (RIA), иммуноферментные анализы, такие как ELISA и конкурентные "сэндвич-анализы", и их различные варианты.

Аффинность связывания предпочтительно определяют с применением поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и Biacore (Karlsson et al., 1991), с использованием системы Biacore (Uppsala, Sweden). В системе Biacore поверхностный плазмонный резонанс (SPR, Welford K. 1991, Opt. Quant. Elect. 23:1; Morton and Mysza, 1998, Methods in Enzymology 295: 268) использован для наблюдения биомолекулярных взаимодействий в реальном времени, и использован поверхностный плазмонный резонанс, посредством которого можно выявлять изменения угла резонанса света на поверхности тонкой золотой пленки на стеклянной основе в результате изменений коэффициента преломления поверхности в радиусе до 300 нм. При анализе Biacore легко генерируют константы скорости ассоциации, константы скорости диссоциации, равновесные константы диссоциации и константы аффинности. Аффинность связывания получают посредством оценки констант скорости ассоциации и диссоциации с применением системы поверхностного плазмонного резонанса Biacore (Biacore, Inc.). Биосенсорный чип активируют для ковалентного связывания мишени в соответствии с инструкциями изготовителя (Biacore). Мишень затем разбавляют и вводят на чип для получения сигнала в единицах ответа иммобилизованного вещества. Поскольку сигнал в резонансных единицах (RU) пропорционален массе иммобилизованного

вещества, он отражает диапазон плотностей иммобилизированной мишени на матрице. Данные о диссоциации согласуют с односайтовой моделью для получения K_{off} +/- s.d. (стандартное отклонение измерений). Константу скорости псевдопервого порядка (K_d) вычисляют для каждой кривой ассоциации и наносят на график как функцию концентрации белка для получения K_{on} +/- s.e. (стандартная ошибка выравнивания). Равновесные константы диссоциации для связывания, K_d , вычисляют на основе измерений SPR как K_{off}/K_{on} .

Как описано Phizicky and Field в *Microb. Rev.* (1995), 59:114-115, подходящий антиген, такой как HSA, иммобилизируют на декстрановом полимере и раствор, содержащий лиганд для HSA, такой как отдельный переменный домен, проходит через камеру, контактируя с иммобилизованным HSA. Отдельный переменный домен, задержанный иммобилизованным HSA, изменяет угол резонанса падающего света, приводя к изменению коэффициента преломления, вызванному увеличенными количествами белка, т.е. отдельного переменного домена, вблизи декстранового полимера. Поскольку все белки имеют одинаковый коэффициент преломления и поскольку существует линейная зависимость между изменением угла резонанса и концентрацией белка у поверхности, может быть измерено изменение концентрации белка на поверхности, обусловленное связыванием белок/белок, см. Phizicky and Field, *supra*. Для определения константы связывания увеличение в резонансных единицах (RU) измеряют как функцию времени, пропуская раствор белка отдельного переменного домена мимо иммобилизованного лиганда (HSA) до стабилизации значений RU, затем уменьшение в RU измеряют как функцию времени с использованием буфера без отдельного переменного домена. Эту процедуру повторяют при нескольких различных концентрациях белка отдельного переменного домена. Подробный теоретический предшествующий уровень техники и способы описаны R. Karlsson, et al. (1991), *J. Immunol Methods*, 145, 229.

Программное обеспечение прибора вычисляет равновесную константу диссоциации (K_d), как описано выше. Равновесную константу диссоциации определяют посредством применения поверхностного плазмонного резонанса, как описано в патенте США № 5573957, на основании таблицы значений dR_A/dt и R_A , где R в этом примере представляет собой комплекс HSA/отдельный переменный домен, как измерено *Biacore* в резонансных единицах, и где dR/dt представляет собой скорость образования комплексов HSA/отдельный переменный домен, т.е. производную кривой связывания; нанесением на график dR_A/dt против R_A для нескольких различных концентраций отдельного переменного домена, и затем нанесением на график угловых коэффициентов этих линий против концентрации отдельного переменного домена, угловой коэффициент этого второго графика представляет собой константу скорости ассоциации (M^{-1}, s^{-1}). Константа скорости диссоциации или скорость, с которой HSA и отдельный переменный домен отсоединяются друг от друга, может быть определена с использованием кривой диссоциации, построенной на *Biacore*. Константа скорости диссоциации может быть измерена нанесением на график логарифма уменьшения ответа против времени и определением углового коэффициента. Равновесная константа диссоциации K_d = константа скорости диссоциации/константа скорости ассоциации.

В соответствии со способом по настоящему изобретению преимущественно каждый отдельный переменный эпителиосвязывающий домен имеет специфичность связывания в отношении эпитопа, отличного от связываемого другими доменами.

В контексте настоящего изобретения под первым и вторым "эпитопами" понимают эпитопы, не являющиеся одинаковыми и не связываемые одним моноспецифичным лигандом. Они могут быть расположены на разных антигенах или на одном и том же антигене, но разделены расстоянием, достаточным для того, чтобы они не образовывали единого целого, которое может быть связано одной моноспецифичной парой V_H/V_L обычного антитела. Экспериментально, если оба отдельных переменных домена в форме одноцепочечных антител (доменных антител или dAb) по отдельности конкурируют с моноспецифичным V_H/V_L -лигандом против двух эпитопов, то эти два эпитопа расположены недостаточно далеко друг от друга, для того чтобы рассматривать их как отдельные эпитопы согласно настоящему изобретению.

Мультиспецифичные лиганды с закрытой конформацией по изобретению не включают лиганды, как описано в WO 02/02773. Таким образом лиганды по настоящему изобретению не включают комплементарные пары V_H/V_L , связывающие один или более антигены или эпитопы кооперативно. Взамен этого, лиганды по изобретению предпочтительно включают некомплементарные пары V_H-V_H или V_L-V_L . Преимущественно каждый домен V_H или V_L в каждой паре V_H-V_H или V_L-V_L имеет специфичность связывания в отношении эпитопа, отличного от связываемого другими доменами, и эпитопсвязывающие области расположены таким образом, что связывание эпитопа в одной области конкурирует со связыванием эпитопа в другой области.

В соответствии с настоящим изобретением преимущественно каждый эпитопсвязывающий домен содержит переменный домен иммуноглобулина. Более преимущественно каждый эпитопсвязывающий домен будет представлять собой либо переменный домен легкой цепи (V_L), либо переменный домен тяжелой цепи (V_H) антитела. Во второй форме настоящего изобретения домены иммуноглобулинов, когда они присутствуют на лиганде по настоящему изобретению, являются некомплементарными, т.е.

они не объединяются с образованием антигенсвязывающей области V_H/V_L . Таким образом, мультиспецифичные лиганды, как определено во второй форме изобретения, содержат домены иммуноглобулинов одного и того же подтипа, т.е. либо переменные домены легкой цепи (V_L), либо переменные домены тяжелой цепи (V_H). Более того, там, где лиганд по изобретению имеет закрытую конформацию, домены иммуноглобулинов могут представлять собой домены типа V_{HH} представителей семейства верблюдовых.

В альтернативном воплощении лиганд (лиганды) по изобретению не содержит домен V_{HH} представителей семейства верблюдовых. Более конкретно, лиганд (лиганды) по изобретению не содержит один или более аминокислотных остатков, специфичных для доменов V_{HH} представителей семейства верблюдовых, по сравнению с человеческими доменами V_H .

Преимущественно отдельные переменные домены имеют происхождение от антител, выбранных по активности связывания против различных антигенов или эпитопов. Например, переменные домены могут быть выделены, по меньшей мере частично, иммунизацией человека. В данной области техники известны альтернативные способы, включая выделение из библиотек человеческих антител и синтез искусственных генов антител.

В выбранных воплощениях отдельный переменный домен является встречающимся в природе отдельным переменным доменом. В других выбранных воплощениях отдельный переменный домен не является встречающимся в природе. Термин "встречающийся в природе" использован здесь для указания на то, что объект, например белковый домен, например отдельный переменный домен или отдельный переменный домен антитела, может быть обнаружен в природе. Таким образом, встречающийся в природе белковый домен, такой как переменная область (V-область) антитела, существует в белке, например в белке цепи антитела, экспрессируемом в природе, например, у нереккомбинантных видов, например млекопитающих, приматов, грызунов, рыб, птиц, рептилий и т.п. Во избежание сомнений, отдельный переменный домен, выделенный из репертуара полипептидов, экспрессированных с нуклеиновых кислот, чье разнообразие было внесено *in vitro*, не является встречающимся в природе отдельным переменным доменом. Во избежание сомнений в будущем, отдельный переменный домен антитела, имеющий происхождение от антитела, являющегося результатом иммунизации животного, является встречающимся в природе отдельным переменным доменом.

Переменные домены преимущественно связывают суперантигены, такие как белок А или белок L. Связывание суперантигенов является свойством переменных доменов антител, прошедших правильный фолдинг, и делает возможным выделение таких доменов из, например, библиотек рекомбинантных или мутантных доменов.

Эпитопсвязывающие домены по настоящему изобретению содержат белковый каркас и области, взаимодействующие с эпитопами (расположенные преимущественно на поверхности белкового каркаса).

Эпитопсвязывающие домены могут также быть основаны на белковых каркасах или скелетах, отличных от доменов иммуноглобулинов. Например, природные бактериальные рецепторы, такие как SpA, были использованы в качестве каркасов для переноса CDR с образованием лигандов, специфично связывающих один или более эпитопы. Подробности этого способа описаны в US 5831012. Другие подходящие каркасы включают основанные на фибронектине и аффителах (affibody). Подробности подходящих способов описаны в WO 98/58965. Другие подходящие каркасы включают липокалин и CTLA4, как описано в van den Beuken et al., J. Mol. Biol. (2001), 310, 591-601, и такие каркасы, как описанные в WO 0069907 (Medical Research Council), основанные, например, на кольцевой структуре бактериального GroEl или других полипептидов-шаперонов.

Белковые каркасы можно комбинировать; например, CDR могут быть перенесены на каркас CTLA4 и использованы совместно с доменами иммуноглобулинов V_H или V_L с образованием мультивалентного лиганда. Подобным образом можно комбинировать фибронектиновые, липокалиновые и другие каркасы.

Специалисту в данной области техники будет ясно, что эпитопсвязывающие домены мультиспецифичного лиганда с закрытой конформацией, полученного способом по настоящему изобретению, могут быть расположены на одной полипептидной цепи или, альтернативно, на разных полипептидных цепях. В случае, когда переменные домены расположены на разных полипептидных цепях, они могут быть связаны линкером, преимущественно гибким линкером (таким как полипептидная цепь), химической связывающей группой или любым другим способом, известным в данной области техники.

Первый и второй эпитопсвязывающие домены могут быть связаны либо ковалентно, либо нековалентно. В случае, когда домены связаны ковалентно, связывание может быть опосредовано, например, дисульфидными связями.

Во второй форме изобретения первый и второй эпитопы являются предпочтительно различными. Они могут представлять собой полипептиды, белки или нуклеиновые кислоты, которые могут быть встречающимися в природе или синтетическими, или являться их частью. В этом отношении, лиганд по изобретению может связывать эпитоп или антиген и действовать как антагонист или агонист (например, агонист рецептора EPO). В одном воплощении эпитопсвязывающие домены лиганда имеют

специфичность в отношении одного и того же эпитопа и могут, например, одновременно связывать свои эпитопы, когда на одном и том же антигене присутствуют несколько копий эпитопа. В другом воплощении, эти эпитопы представлены на разных антигенах таким образом, что лиганд может связывать эпитопы и соединять антигены. Специалисту в данной области техники будет ясно, что выбор эпитопов и антигенов широк и разнообразен. Они могут представлять собой, например, белки человека или животных, цитокины, рецепторы цитокинов, ферменты, кофакторы ферментов или ДНК-связывающие белки. Подходящие цитокины и факторы роста включают, предпочтительно без ограничения: AroE, Aro-SAA, BDNF, кардиотрофин-1, EGF, рецептор EGF, ENA-78, эотаксин, эотаксин-2, Exodus-2, EpoR, кислый FGF, основной FGF, фактор роста фибробластов-10, лиганд FLT3, фракталкин (CX3C), GDNF, G-CSF, GM-CSF, GF- β 1, инсулин, γ -интерферон (IFN- γ), IGF-I, IGF-II, интерлейкин-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (72 a.a.), IL-8 (77 a.a.), IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 (IGIF), ингибин α , ингибин β , IP-10, фактор роста кератиноцитов-2 (KGF-2), KGF, лептин, LIF, лимфотактин, мюллерову ингибирующую субстанцию, моноцитарный колониингибирующий фактор, моноцитарный аттрактантный белок, M-CSF, MDC (67 a.a.), MDC (69 a.a.), MCP-1 (MCAF), MCP-2, MCP-3, MCP-4, MDC (67 a.a.), MDC (69 a.a.), MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α , MIP-3 β , MIP-4, фактор, ингибирующий миелоидные предшественники, 1 типа (MPlF-1), NAP-2, неуртурин, фактор роста нервов, β -NGF, NT-3, NT-4, онкостатин M, тромбоцитарный фактор роста AA (PDGF-AA), PDGF-AB, PDGF-BB, тромбоцитарный фактор-4 (PF-4), RANTES, SDF1 α , SDF1 β , SCF, фактор роста стволовых клеток (SCGF), фактор стволовых клеток (SCF), TARC, TGF- α , TGF- β , TGF- β 2, TGF- β 3, фактор некроза опухоли (TNF), TNF- α , TNF- β , рецептор TNF 1 типа, рецептор TNF 2 типа, TNIL-1, TPO, VEGF, рецептор VEGF 1 типа, рецептор VEGF 2 типа, рецептор VEGF 3 типа, GCP-2, GRO/MGSA, GRO- β , GRO- γ , HCC1, 1-309, HER 1, HER 2, HER 3 и HER 4, область распознавания TACE, TNF BP-I и TNF BP-II, CD4, человеческие рецепторы хемокинов CXCR4 или CCR5, неструктурный белок 3 типа (NS3) вируса гепатита C, TNF-альфа, IgE, IFN-гамма, MMP-12, CEA, H. pylori, TB, вирус гриппа, гепатита E, MMP-12, интернализуемые рецепторы, сверхэкспрессируемые на определенных клетках, такие как рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), рецептор ErBb2 на опухолевых клетках, интернализуемый клеточный рецептор, рецептор LDL, рецептор FGF2, рецептор ErBb2, рецептор трансферрина, рецептор PDGF, рецептор VEGF, PsmAr, белок внеклеточного матрикса, эластин, фибронектин, ламинин, α 1-антитрипсин, тканевой фактор, ингибирующий протеазы, PDK1, GSK1, Bad, каспазу-9, Forkhead, антиген Helicobacter pylori, антиген Mycobacterium tuberculosis и антиген вируса гриппа, а также любую мишень, раскрытую в приложении 2 или приложении 3 к этому документу, либо в комбинации, как изложено в приложениях, либо в другой комбинации, либо по отдельности. Рецепторы цитокинов включают рецепторы вышеизложенных цитокинов, например, рецептор IL-1 1 типа (IL-1 R1); рецептор IL-6 (IL-6R); рецептор IL-10 (IL-10R); рецептор IL-18 (IL-18R), а также рецепторы цитокинов, изложенных в приложении 2 или приложении 3, и также рецепторы, раскрытые в приложении 2 и приложении 3. Следует понимать, что этот список ни в коем случае не является исчерпывающим. Там, где мультиспецифичный лиганд связывает два эпитопа (на одном или разных антигенах), антиген (антигены) может быть выбран из этого списка.

Преимущественно лиганды с двойной специфичностью могут быть использованы для направленного воздействия на цитокины и другие молекулы, синергично взаимодействующие в организме в терапевтических ситуациях. Таким образом, согласно изобретению предложен способ синергичного воздействия на активность двух или более цитокинов, включающий введение лиганда с двойной специфичностью, способного связывать указанные два или более цитокина. В данном аспекте изобретения лиганд с двойной специфичностью представлять собой любой лиганд с двойной специфичностью, включая лиганд, состоящий из комплементарных и/или некомплементарных доменов, лиганд с открытой конформацией и лиганд с закрытой конформацией. Например, данный аспект изобретения относится к комбинациям доменов V_H и доменов V_L , только доменов V_H или только доменов V_L .

Синергизм в терапевтическом аспекте может быть достигнут несколькими способами. Например, комбинации для направленного воздействия могут быть терапевтически активны, только если обе мишени подвергаются направленному воздействию лигандом, в то время как направленное воздействие на одну мишень само по себе не является терапевтически эффективным. В другом воплощении одна мишень сама по себе может обеспечить некоторый малый или минимальный терапевтический эффект, но совместно со второй мишенью комбинация обеспечивает синергическое увеличение терапевтического эффекта.

Предпочтительно цитокины, связываемые лигандами с двойной специфичностью по данному аспекту изобретения, выбраны из списка, показанного в приложении 2.

Более того, лиганды с двойной специфичностью могут быть использованы в онкологических применениях, где одна специфичность направлена на CD89, экспрессируемый цитотоксичными клетками, и другая специфична в отношении опухоли. Примеры опухолевых антигенов, которые могут быть мишенями, приведены в приложении 3.

В одном воплощении второй формы изобретения переменные домены имеют происхождение от антитела, направленного против первого и/или второго эпитопа. В предпочтительном воплощении переменные домены имеют происхождение от репертуара отдельных переменных доменов антител. В одном примере репертуар представляет собой репертуар, не созданный в животном, или синтетический репертуар. В другом примере отдельные переменные домены не являются выделенными (по меньшей мере частично) иммунизацией животных. Таким образом, отдельные домены могут быть выделены из интактной библиотеки.

В другом аспекте согласно второй форме изобретения предложен мультиспецифичный лиганд, содержащий первый эпитопсвязывающий домен, имеющий первую специфичность связывания эпитопа, и некомплементарный второй эпитопсвязывающий домен, имеющий вторую специфичность связывания эпитопа. Первая и вторая специфичности связывания могут быть одинаковыми или разными.

В другом аспекте согласно настоящему изобретению предложен мультиспецифичный лиганд с закрытой конформацией, содержащий первый эпитопсвязывающий домен, имеющий специфичность связывания в отношении первого эпитопа, и некомплементарный второй эпитопсвязывающий домен, имеющий специфичность связывания в отношении второго эпитопа, где первая и вторая специфичности связывания способны конкурировать за связывание эпитопа, таким образом, что мультиспецифичный лиганд с закрытой конформацией не может связывать оба эпитопа одновременно.

В еще одном другом аспекте согласно изобретению предложены лиганды с открытой конформацией, содержащие некомплементарные связывающие домены, где домены специфичны в отношении различных эпитопов на одной и той же мишени. Такие лиганды связывают мишени с увеличенной avidностью. Сходным образом, согласно изобретению предложены мультивалентные лиганды, содержащие некомплементарные связывающие домены, специфичные в отношении одного и того же эпитопа и направленные на мишени, содержащие несколько копий указанного эпитопа, такие как, например, IL-5, PDGF-AA, PDGF-BB, TGF- β , TGF- β 2, TGF- β 3 и TNF α , а также человеческий рецептор TNF 1 типа и человеческий TNF α .

В сходном аспекте лиганды по изобретению могут быть изменены для связывания отдельных эпитопов с низкой аффинностью таким образом, что связывание отдельных эпитопов не является терапевтически значимым; но увеличенная avidность, являющаяся результатом связывания двух эпитопов, обеспечивает терапевтический эффект. В конкретном примере мишени могут представлять собой эпитопы, присутствующие по отдельности на нормальных типах клеток, но присутствующие совместно только на аномальных или болезненных клетках, таких как опухолевые клетки. В такой ситуации эффективному направленному воздействию биспецифичными лигандами по изобретению подвержены только аномальные или болезненные клетки.

Лиганды, специфичные в отношении нескольких копий одного и того же эпитопа или расположенных рядом эпитопов на одной и той же мишени (известные как хелатообразующие dAb), могут также представлять собой тримерные или полимерные (тетрамерные или более) лиганды, содержащие три, четыре или более некомплементарных связывающих домена. Например, могут быть сконструированы лиганды, содержащие три или четыре домена V_H или домена V_L .

Более того, предложены лиганды, связывающие мишени из нескольких субъединиц, где каждый связывающий домен специфичен в отношении субъединицы указанной мишени. Лиганд может быть димерным, тримерным или полимерным.

Предпочтительно мультиспецифичные лиганды по вышеизложенным аспектам изобретения можно получить способом по первому аспекту изобретения.

Преимущественно по вышеизложенному аспекту второй формы изобретения первый эпитопсвязывающий домен и вторые эпитопсвязывающие домены являются некомплементарными переменными доменами иммуноглобулинов, как определено здесь. Т.е. либо переменными доменами V_H - V_H , либо переменными доменами V_L - V_L .

Хелатообразующие dAb, в частности, могут быть получены по предпочтительному аспекту изобретения, конкретно, с применением якорных dAb, где библиотеку димерных, тримерных или мультимерных dAb конструируют с использованием вектора, содержащего константное dAb у 5'- или 3'-конца линкерной последовательности, и вводя репертуар вторых, третьих и дополнительных dAb с другой стороны линкера. Например, якорное или ведущее dAb может представлять собой TAR1-5(V_K), TAR1-27(V_K), TAR2h-5(V_H) или TAR2h-6(V_K).

В альтернативных методиках применения линкера можно избежать, например, применением нековалентного связывания или природной аффинности между связывающими доменами, такими как V_H и V_K . Соответственно, согласно изобретению предложен способ получения хелатообразующего мультимерного лиганда, включающий стадии:

- а) предоставления вектора, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую отдельный связывающий домен, специфичный в отношении первого эпитопа на мишени;
- б) предоставления вектора, кодирующего репертуар, содержащий вторые связывающие домены, специфичные в отношении второго эпитопа на указанной мишени, который может быть таким же, как

первый эпитоп, или отличаться от него и который расположен рядом с указанным первым эпитопом;

в) экспрессии указанных первого и второго связывающих доменов;

г) выделения этих комбинаций первого и второго связывающих доменов, образующих комбинации друг с другом с образованием димера, связывающего мишень.

Первый и второй эпитопы расположены рядом друг с другом таким образом, что мультимерный лиганд способен связывать оба эпитопа одновременно. Это обеспечивает лиганд с преимуществами увеличенной avidности связывания. Там, где эпитопы являются одинаковыми, увеличенную avidность получают присутствием нескольких копий эпитопа на мишени, что делает возможным одновременное связывание по меньшей мере двух копий для получения эффекта увеличенной avidности.

Связывающие домены могут быть объединены несколькими способами, а также с использованием линкеров. Например, связывающие домены могут содержать остатки цистеина, авидиновые или стрептавидиновые группы или другие средства нековалентного соединения после синтеза; будут выделять те комбинации, которые эффективно связывают мишень. Альтернативно, линкер может присутствовать между первым и вторым связывающими доменами, экспрессируемыми в виде одного полипептида с одного вектора, содержащего первый связывающий домен, линкер и репертуар вторых связывающих доменов, например, как описано выше.

В предпочтительном аспекте первый и второй связывающие домены объединяются естественным образом при связывании антигена; например, домены V_H и V_L (например, V_{H^*}) при связывании расположенных рядом эпитопов будут естественным образом объединяться при трехмерном взаимодействии с образованием стабильного димера. Такие объединенные белки могут быть выделены при исследовании связывания мишени. Преимущество данного способа состоит в том, что будут объединяться и, таким образом, будут выделены в результате их увеличенной avidности к мишени только те связывающие домены, которые связывают расположенные в непосредственной близости друг от друга эпитопы в правильной конформации.

В альтернативном воплощении вышеизложенного аспекта второй формы изобретения по меньшей мере один эпитопсвязывающий домен содержит неиммуноглобулиновый "белковый каркас" или "белковый скелет", как определено здесь. Подходящие неиммуноглобулиновые белковые каркасы включают, предпочтительно без ограничения, любые из выбранных из группы, состоящей из SpA, фибронектина, GroE1 и других шаперонов, липокалина, CCTLA4 и аффител, как изложено выше.

Преимущественно по вышеизложенному аспекту второй формы изобретения эпитопсвязывающие домены прикреплены к "белковому скелету". Преимущественно белковый скелет по изобретению представляет собой иммуноглобулиновый скелет.

Согласно настоящему изобретению термин "иммуноглобулиновый скелет" относится к белку, включающему по меньшей мере одну характерную для иммуноглобулинов конформацию и действующему в качестве ядра для одного или более эпитопсвязывающих доменов, как определено здесь.

Предпочтительные иммуноглобулиновые скелеты, как определено здесь, включают любой один или более из выбранных из следующего: молекулы иммуноглобулина, содержащей, по меньшей мере, (1) домен C_L антитела (подкласса каппа или лямбда); или (2) домен C_{H1} тяжелой цепи антитела; молекулы иммуноглобулина, содержащей домены C_{H1} и C_{H2} тяжелой цепи антитела; молекулы иммуноглобулина, содержащей домены C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} тяжелой цепи антитела; или любого набора (2) в сочетании с доменом C_L (подкласса каппа или лямбда) антитела. Также может быть включена шарнирная область. Такие комбинации доменов могут, например, имитировать природные антитела, такие как IgG или IgM, или их фрагменты, такие как молекулы Fv, scFv, Fab или F(ab')₂. Специалистам в данной области техники будет ясно, что этот список не является исчерпывающим.

Связывание скелета с эпитопсвязывающими доменами, как определено здесь, может быть достигнуто на полипептидном уровне, т.е. после экспрессии нуклеиновой кислоты, кодирующей скелет и/или эпитопсвязывающие домены. Альтернативно, стадия связывания может быть проведена на уровне нуклеиновых кислот. Способы связывания белкового скелета по настоящему изобретению с одним или более эпитопсвязывающими доменами включают применение методик химии белков и/или молекулярной биологии, которые будут знакомы специалистам в данной области техники и описаны здесь.

Преимущественно мультиспецифичный лиганд с закрытой конформацией может содержать первый домен, способный связывать молекулу-мишень, и второй домен, способный связывать молекулу или группу, увеличивающую период полувыведения лиганда. Например, молекула или группа может представлять собой крупный агент, такой как HSA или белок клеточного матрикса. При использовании здесь фраза "молекула или группа, увеличивающая период полувыведения лиганда" относится к молекуле или химической группе, которая, при связывании лигандом с двойной специфичностью, как описано здесь, увеличивает период полувыведения такого лиганда с двойной специфичностью *in vivo* при его введении животному относительно лиганда, не связывающего такую молекулу или группу. Примеры молекул или групп, увеличивающих период полувыведения лиганда, описаны в данном патенте ниже. В предпочтительном воплощении мультиспецифичный лиганд с закрытой конформацией

может быть способен связывать молекулу-мишень только при вытеснении молекулы или группы, увеличивающей период полувыведения. Таким образом, например, мультиспецифичный лиганд с закрытой конформацией сохраняют в циркулирующей крови субъекта с использованием крупной молекулы, такой как HSA. При встрече с молекулой-мишенью конкуренция между связывающими доменами мультиспецифичного лиганда с закрытой конформацией приводит к вытеснению HSA и связыванию мишени.

Лиганд по любому аспекту настоящего изобретения включает лиганд, имеющий или состоящий из по меньшей мере одного отдельного вариабельного домена в форме отдельного вариабельного домена-мономера или в форме нескольких отдельных вариабельных доменов, т.е. мультимера. Лиганд может быть модифицирован для того, чтобы содержать дополнительные группировки, как, например, слитый белок или конъюгат. Такой мультимерный лиганд, например, в форме лиганда с двойной специфичностью, и/или такой лиганд, содержащий или состоящий из отдельного вариабельного домена, т.е. мономера dAb, применимый в конструировании такого мультимерного лиганда, может преимущественно диссоциировать от его когнатной мишени (мишеней) с K_d 300 нМ или менее, от 300 нМ до 5 пМ (т.е. от 3×10^{-7} до 5×10^{-12} М), предпочтительно от 50 нМ до 20 пМ, или от 5 нМ до 200 пМ, или от 1 нМ до 100 пМ, 1×10^{-7} М или менее, 1×10^{-8} М или менее, 1×10^{-9} М или менее, 1×10^{-10} М или менее, 1×10^{-11} М или менее; и/или константой скорости K_{off} от 5×10^{-1} до 1×10^{-7} с⁻¹, предпочтительно от 1×10^{-2} до 1×10^{-6} с⁻¹, или от 5×10^{-3} до 1×10^{-5} с⁻¹, или 5×10^{-1} с⁻¹ или менее, или 1×10^{-2} с⁻¹ или менее, или 1×10^{-3} с⁻¹ или менее, или 1×10^{-4} с⁻¹ или менее, или 1×10^{-5} с⁻¹ или менее, или 1×10^{-6} с⁻¹ или менее, как определено, например, поверхностным плазмонным резонансом. Константу скорости K_d определяют как K_{off}/K_{on} . Значение K_d более чем 1 М обычно рассматривают как указание на неспецифичное связывание. Предпочтительно отдельный вариабельный домен будет связывать антиген-мишень или эпитоп-мишень с аффинностью менее чем 500 нМ, предпочтительно менее чем 200 нМ и более предпочтительно менее чем 10 нМ, как, например, менее чем 500 пМ.

В частности, согласно изобретению предложен мономер dAb против TNF α (или лиганд с двойной специфичностью, содержащий такое dAb), гомодимерный, гетеродимерный или гомотримерный лиганд, где каждое dAb связывает TNF α . Лиганд связывает TNF α с K_d от 300 нМ до 5 пМ (т.е. от 3×10^{-7} до 5×10^{-12} М), предпочтительно от 50 нМ до 20 пМ, более предпочтительно от 5 нМ до 200 пМ и наиболее предпочтительно от 1 нМ до 100 пМ; выражая альтернативным образом, K_d составляет 1×10^{-7} М или менее, предпочтительно 1×10^{-8} М или менее, более предпочтительно 1×10^{-9} М или менее, преимущественно 1×10^{-10} М или менее и наиболее предпочтительно 1×10^{-11} М или менее; и/или константой скорости K_{off} от 5×10^{-1} до 1×10^{-7} с⁻¹, предпочтительно от 1×10^{-2} до 1×10^{-6} с⁻¹, более предпочтительно от 5×10^{-3} до 1×10^{-5} с⁻¹, например, 5×10^{-1} с⁻¹ или менее, предпочтительно 1×10^{-2} с⁻¹ или менее, более предпочтительно 1×10^{-3} с⁻¹ или менее, преимущественно 1×10^{-4} с⁻¹ или менее, более преимущественно 1×10^{-5} с⁻¹ или менее и наиболее предпочтительно 1×10^{-6} с⁻¹ или менее, как определено поверхностным плазмонным резонансом.

Предпочтительно лиганд нейтрализует TNF α в стандартном исследовании L929 с ND₅₀ от 500 нМ до 50 пМ, предпочтительно от 100 нМ до 50 пМ, преимущественно от 10 нМ до 100 пМ, более предпочтительно от 1 нМ до 100 пМ; например, 50 нМ или менее, предпочтительно 5 нМ или менее, преимущественно 500 пМ или менее, более предпочтительно 200 пМ или менее и наиболее предпочтительно 100 пМ или менее.

Предпочтительно лиганд ингибирует связывание TNF-альфа с рецептором TNF-альфа 1 типа (рецептором p55) с IC₅₀ от 500 нМ до 50 пМ, предпочтительно от 100 нМ до 50 пМ, более предпочтительно от 10 нМ до 100 пМ, преимущественно от 1 нМ до 100 пМ; например, 50 нМ или менее, предпочтительно 5 нМ или менее, более предпочтительно 500 пМ или менее, преимущественно 200 пМ или менее и наиболее предпочтительно 100 пМ или менее. Предпочтительно TNF α представляет собой человеческий TNF α .

Кроме того, согласно изобретению предложен мономер dAb против рецептора TNF 1 типа или лиганд с двойной специфичностью, содержащий такое dAb, связывающее рецептор TNF 1 типа с K_d от 300 нМ до 5 пМ (т.е. от 3×10^{-7} до 5×10^{-12} М), предпочтительно от 50 нМ до 20 пМ, более предпочтительно от 5 нМ до 200 пМ и наиболее предпочтительно от 1 нМ до 100 пМ, например, 1×10^{-7} М или менее, предпочтительно 1×10^{-8} М или менее, более предпочтительно 1×10^{-9} М или менее, преимущественно 1×10^{-10} М или менее и наиболее предпочтительно 1×10^{-11} М или менее; и/или константой скорости K_{off} от 5×10^{-1} до 1×10^{-7} с⁻¹, предпочтительно от 1×10^{-2} до 1×10^{-6} с⁻¹, более предпочтительно от 5×10^{-3} до 1×10^{-5} с⁻¹, например, 5×10^{-1} с⁻¹ или менее, предпочтительно 1×10^{-2} с⁻¹ или менее, преимущественно 1×10^{-3} с⁻¹ или менее, более предпочтительно 1×10^{-4} с⁻¹ или менее, еще более предпочтительно 1×10^{-5} с⁻¹ или менее и наиболее предпочтительно 1×10^{-6} с⁻¹ или менее, предпочтительно как определено поверхностным плазмонным резонансом.

Предпочтительно лиганд, содержащий мономер dAb, нейтрализует TNF α в стандартном исследовании (например, исследованиях L929 или HeLa, описанных здесь) с ND₅₀ от 500 нМ до 50 пМ,

предпочтительно от 100 нМ до 50 пМ, более предпочтительно от 10 нМ до 100 пМ, преимущественно от 1 нМ до 100 пМ; например, 50 нМ или менее, предпочтительно 5 нМ или менее, более предпочтительно 500 пМ или менее, преимущественно 200 пМ или менее и наиболее предпочтительно 100 пМ или менее.

Предпочтительно мономер dAb или лиганд ингибирует связывание TNF-альфа с рецептором TNF-альфа 1 типа (рецептором p55) с IC_{50} от 500 нМ до 50 пМ, предпочтительно от 100 нМ до 50 пМ, более предпочтительно от 10 нМ до 100 пМ, преимущественно от 1 нМ до 100 пМ; например 50 нМ или менее, предпочтительно 5 нМ или менее, более предпочтительно 500 пМ или менее, преимущественно 200 пМ или менее и наиболее предпочтительно 100 пМ или менее. Предпочтительно мишенью для рецептора TNF 1 типа является человеческий TNF α .

Кроме того, согласно изобретению предложен мономер dAb (или лиганд с двойной специфичностью, содержащий такое dAb), связывающий сывороточный альбумин (SA) с K_d от 1 нМ до 500 мкМ (т.е. от 1×10^{-9} до 5×10^{-4}), предпочтительно от 100 нМ до 10 мкМ. Предпочтительно для лиганда с двойной специфичностью, содержащего первое dAb против SA и второе dAb против другой мишени, аффинность (например, K_d и/или K_{off} , как измерено поверхностным плазмонным резонансом, например, с использованием Biacore) второго dAb в отношении его мишени превышает аффинность первого dAb в отношении SA в 1-100000 раз (предпочтительно от 100 до 100000, более предпочтительно от 1000 до 100000 или от 10000 до 100000 раз). Например, первое dAb связывает SA с аффинностью приблизительно 10 мкМ, в то время как второе dAb связывает его мишень с аффинностью 100 пМ. Предпочтительно сывороточный альбумин представляет собой человеческий сывороточный альбумин (HSA).

В одном воплощении первое dAb (или мономер dAb) связывает SA (например, HSA) с K_d приблизительно 50, предпочтительно 70 и наиболее предпочтительно 100, 150 или 200 нМ.

Более того, согласно изобретению предложены димеры, тримеры и полимеры вышеупомянутых мономеров dAb по вышеизложенному аспекту настоящего изобретения.

Лиганды по изобретению, включая мономеры, димеры и тримеры dAb, могут быть связаны с Fc-областью 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, связанные в виде одной нуклеотидной последовательности с Fc-областью.

В другом аспекте второй формы изобретения согласно настоящему изобретению предложены одна или более молекул нуклеиновых кислот, кодирующих, по меньшей мере, мультиспецифичный лиганд, как определено здесь. В одном воплощении мультиспецифичный лиганд представляет собой лиганд с закрытой конформацией. В другом воплощении он представляет собой лиганд с открытой конформацией. Мультиспецифичный лиганд может быть кодирован одной молекулой нуклеиновой кислоты; альтернативно, каждый эпитопсвязывающий домен может быть кодирован отдельной молекулой нуклеиновой кислоты. Там, где мультиспецифичный лиганд кодирован одной молекулой нуклеиновой кислоты, домены могут быть экспрессированы в виде слитого полипептида или могут быть экспрессированы по отдельности и впоследствии соединены друг с другом, например, с использованием химических линкеров. Лиганды, экспрессированные с отдельных нуклеиновых кислот, будут связаны друг с другом подходящими способами.

Нуклеиновая кислота может дополнительно кодировать сигнальную последовательность для экспорта полипептидов из клетки-хозяина при экспрессии и может быть слита с поверхностным компонентом частицы нитчатого бактериофага (или другим компонентом дисплейной системы для селекции) при экспрессии. Лидерные последовательности, которые могут быть использованы при экспрессии у бактерий и/или фаговом или фагмидном дисплее, включают *pelB*, *stII*, *ompA*, *phoA*, *bla* и *pelA*.

В другом аспекте второй формы изобретения согласно настоящему изобретению предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению.

В еще одном другом аспекте согласно настоящему изобретению предложена клетка-хозяин, трансфицированная вектором по настоящему изобретению.

Экспрессия такого вектора может быть изменена для образования, например, на поверхности частицы бактериофага, эпитопсвязывающих доменов для селекции. Это делает возможным селекцию представленных переменных доменов и, таким образом, селекцию "мультиспецифичных лигандов" с применением способа по настоящему изобретению.

В предпочтительном воплощении второй формы изобретения эпитопсвязывающие домены представляют собой переменные домены иммуноглобулинов и выбраны из репертуаров V-генов отдельных доменов. В большинстве случаев репертуар отдельных доменов антител представлен на поверхности нитчатого бактериофага. В предпочтительном воплощении каждый отдельный домен антитела выбран связыванием фагового репертуара с антигеном.

Согласно настоящему изобретению также предложен набор, содержащий, по меньшей мере, мультиспецифичный лиганд по настоящему изобретению, который может представлять собой лиганд с открытой конформацией или с закрытой конформацией. Наборы по настоящему изобретению могут

представлять собой, например, диагностические наборы, терапевтические наборы, наборы для выявления химических и биологических видов и т.п.

В еще одном другом аспекте второй формы изобретения согласно настоящему изобретению предложен однородный иммунологический анализ с применением лиганда по настоящему изобретению.

В еще одном другом аспекте второй формы изобретения согласно настоящему изобретению предложена композиция, содержащая мультиспецифичный лиганд с закрытой конформацией, который можно получить способом по настоящему изобретению, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

Более того, согласно настоящему изобретению предложен способ лечения заболевания с применением "мультиспецифичного лиганда с закрытой конформацией" или композиции по настоящему изобретению.

В предпочтительном воплощении заболевание представляет собой рак или воспалительное заболевание, например ревматоидный артрит, астму или болезнь Крона.

В другом аспекте второй формы изобретения согласно настоящему изобретению предложен способ диагностики, включающий диагностику заболевания с применением мультиспецифичного лиганда с закрытой конформацией или композиции по настоящему изобретению. Таким образом, в большинстве случаев связывание анализируемого вещества с мультиспецифичным лигандом с закрытой конформацией может быть использовано для вытеснения агента, что приводит к генерированию сигнала на вытеснение. Например, связывание анализируемого вещества (второго антигена) может вытеснять фермент (первый антиген), связанный с антителом, обеспечивая основу для иммунологического анализа, особенно если антитело фиксировало фермент через его активный центр.

Таким образом, в конечном аспекте второй формы согласно настоящему изобретению предложен способ выявления присутствия молекулы-мишени, включающий:

а) предоставление мультиспецифичного лиганда с закрытой конформацией, связанного с агентом, специфичного в отношении молекулы-мишени и агента, где агент, связываемый лигандом, приводит к генерированию детектируемого сигнала в ответ на вытеснение из лиганда;

б) воздействие на мультиспецифичный лиганд с закрытой конформацией молекулой-мишенью;

в) детекцию сигнала, генерируемого в результате вытеснения агента.

По вышеизложенному аспекту второй формы изобретения преимущественно агент представляет собой фермент, неактивный при связывании с мультиспецифичным лигандом с закрытой конформацией. Альтернативно, агент может представлять собой одно или более, выбранное из группы, состоящей из следующего: субстрата для фермента и флуоресцентной, люминесцентной или хромогенной молекулы, неактивной или блокируемой при связывании с лигандом.

Последовательности, сходные или гомологичные (например, по меньшей мере 70% идентичность последовательности) последовательностям, раскрытым здесь, также являются частью изобретения. В некоторых воплощениях идентичность последовательности на аминокислотном уровне может составлять приблизительно 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более. На уровне нуклеиновых кислот идентичность последовательности может составлять приблизительно 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более. Альтернативно, существенная идентичность присутствует, когда сегменты нуклеиновых кислот будут гибридизоваться в селективных условиях гибридизации (например, очень строгих условиях гибридизации) с комплементарной цепью. Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, лизате клеток или в частично очищенной или, по существу, чистой форме.

Процент идентичности может относиться к проценту идентичности по всей длине аминокислотной или нуклеотидной последовательности. Если указано, процент идентичности аминокислотной или нуклеотидной последовательности относится к проценту идентичности последовательности (последовательностям) из одной или более отдельных областей эталонной аминокислотной или нуклеотидной последовательности, например, на протяжении одной или более CDR-областей антитела и/или одной или более переменных каркасных областей антитела. Например, идентичность последовательности на аминокислотном уровне одной или более CDR отдельного переменного домена тяжелой или легкой цепи антитела может представлять собой приблизительно 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большую идентичность аминокислотной последовательности соответствующих CDR отдельного переменного домена тяжелой или легкой цепи антитела соответственно. На уровне нуклеиновых кислот последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей одну или более CDR отдельного переменного домена тяжелой или легкой цепи антитела, может иметь по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или большую идентичность последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей соответствующие CDR отдельного переменного домена тяжелой или легкой цепи антитела. На уровне нуклеиновых кислот, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей одну CDR отдельного переменного домена тяжелой или легкой цепи антитела, может иметь процент идентичности по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более по сравнению с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей соответствующую CDR отдельного переменного домена тяжелой или легкой цепи антитела соответственно. В некоторых воплощениях структурная характеристика процента идентичности сочетается с функциональным

аспектом. Например, в некоторых воплощениях последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность с менее чем 100% идентичностью эталонной последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности также необходима для отображения по меньшей мере одного функционального аспекта эталонной аминокислотной последовательности или аминокислотной последовательности, кодируемой эталонной нуклеиновой кислотой. В других воплощениях последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность с менее чем 100% идентичностью эталонной последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, соответственно, также необходима для отображения по меньшей мере одного функционального аспекта эталонной аминокислотной последовательности или аминокислотной последовательности, кодируемой эталонной нуклеиновой кислотой, но эта функциональная характеристика может быть незначительно изменена, например, придавать увеличенную аффинность в отношении обозначенного антигена по сравнению с аффинностью эталона.

Вычисления "гомологии" или "идентичности последовательности" либо "сходства" двух последовательностей (термины использованы здесь взаимозаменяемо) проводят следующим образом. Последовательности выравнивают в целях оптимального сравнения (например, могут быть введены разрывы в одну или обе из первой и второй аминокислотной последовательности или последовательности нуклеиновой кислоты для оптимального выравнивания, и негомологичными последовательностями в целях сравнения можно пренебречь). В предпочтительном воплощении длина эталонной последовательности, выравниваемой в целях сравнения, составляет по меньшей мере 30%, предпочтительно по меньшей мере 40%, более предпочтительно по меньшей мере 50%, еще более предпочтительно по меньшей мере 60% и еще более предпочтительно по меньшей мере 70, 80, 90, 100% длины эталонной последовательности. Затем сравнивают аминокислотные остатки или нуклеотиды в соответствующих аминокислотных положениях или нуклеотидных положениях. Если положение в первой последовательности занято таким же аминокислотным остатком или нуклеотидом, как в соответствующем положении второй последовательности, то молекулы являются идентичными в этом положении (при использовании здесь "гомология" аминокислот или нуклеиновых кислот эквивалентна "идентичности" аминокислот или нуклеиновых кислот). Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией числа идентичных положений в обеих последовательностях, при учете числа разрывов и длины каждого разрыва, который необходимо ввести для оптимального выравнивания двух последовательностей.

Преимущественно для выравнивания последовательностей используют алгоритм BLAST (версии 2.0) с параметрами, установленными на значения по умолчанию. Алгоритм BLAST подробно описан на веб-сайте ("www") Национального центра биотехнологической информации (National Center for Biotechnology Information ("NCBI")) Национального института здравоохранения (National Institutes of Health ("NIH")) правительства США ("gov"), в директории "/Blast/", в файле "blast_help.html". Параметры поиска определены следующим образом и преимущественно установлены на определенные параметры по умолчанию.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) представляет собой эвристический поисковый алгоритм, используемый в программах blastp, blastn, blastx, tblastn, and tblastx; в этих программах значимость результатов определяется применением статистических способов Karlin and Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(6):2264-8 (см. файл "blast_help.html", как описано выше) с некоторыми усовершенствованиями. Программы BLAST были написаны для поиска сходства последовательностей, например, для идентификации гомологов запрашиваемой последовательности. Эти программы в большинстве случаев не пригодны для поиска по мотиву/типу. См. обсуждение основных вопросов поиска по сходству в базах данных последовательностей в Altschul et al. (1994).

Пять программ BLAST, доступные на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации, выполняют следующие задачи:

"blastp" сравнивает запрашиваемую аминокислотную последовательность с базой данных белковых последовательностей;

"blastn" сравнивает запрашиваемую нуклеотидную последовательность с базой данных нуклеотидных последовательностей;

"blastx" сравнивает умозрительные продукты трансляции в шести рамках считывания запрашиваемой нуклеотидной последовательности (обоих цепей) с базой данных белковых последовательностей;

"tblastn" сравнивает запрашиваемую белковую последовательность с базой данных нуклеотидных последовательностей, динамично транслируемых во всех шести рамках считывания (обоих цепей);

"tblastx" сравнивает трансляции в шести рамках считывания запрашиваемой нуклеотидной последовательности с трансляциями в шести рамках считывания базы данных нуклеотидных последовательностей.

В BLAST используют следующие параметры поиска.

HISTOGRAM отображает гистограмму результатов каждого поиска; по умолчанию "да" (см. параметр H в руководстве BLAST Manual).

DESCRIPTIONS ограничивает число коротких описаний совпадающих последовательностей заданным числом; лимит по умолчанию составляет 100 описаний (см. параметр V на странице руководства). См. также EXPECT и CUTOFF.

ALIGNMENTS ограничивает число последовательностей из базы данных с парами сегментов с максимальным сходством (high-scoring segment pairs (HSP)) заданным числом; лимит по умолчанию составляет 50. Если пороговой статистической значимости соответствует больше последовательностей из базы данных (см. EXPECT и CUTOFF ниже), будет сообщено только о наиболее статистически значимых совпадениях (см. параметр B в руководстве BLAST Manual).

EXPECT. Пороговая статистическая значимость для сообщения о совпадениях с последовательностями из базы данных; значение по умолчанию составляет 10 таким образом, что ожидают, что 10 совпадений будут обнаружены только случайно, в соответствии со стохастической моделью Karlin and Altschul (1990). Если статистическая значимость, определенная для совпадения, превышает пороговое значение EXPECT, о совпадении не будет сообщено. Меньшие пороговые значения EXPECT являются более строгими, что приводит к сообщению меньшего числа случайных совпадений. Приемлемы дробные величины (см. параметр E в руководстве BLAST Manual).

CUTOFF. Пороговое сходство для сообщения о парах сегментов с максимальным сходством. Значение по умолчанию вычисляют на основании значения EXPECT (см. выше). О HSP в последовательности из базы данных сообщается только, если определенная для них статистическая значимость, по меньшей мере, равна той, которая была бы присвоена отдельной HSP со сходством, равным значению CUTOFF. Большие значения CUTOFF являются более строгими, что приводит к сообщению меньшего числа случайных совпадений (см. параметр S в руководстве BLAST Manual). Обычно, пороговыми значениями значимости можно управлять более интуитивно с использованием EXPECT.

MATRIX обозначает кососимметрическую матрицу сходства для BLASTP, BLASTX, TBLASTN и TBLASTX. Матрица по умолчанию представляет собой BLOSUM62 (Henikoff & Henikoff, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(22):10915-9). Допустимые альтернативные выборы включают PAM40, PAM120, PAM250 и IDENTITY. Для BLASTN нет доступных кососимметрических матриц сходства; указание MATRIX в запросах BLASTN приводит к ошибочному ответу.

STRAND ограничивает поиск TBLASTN только верхней или только нижней цепью последовательностей из базы данных; или ограничивает поиск BLASTN, BLASTX или TBLASTX рамками считывания на только верхней или только нижней цепи запрашиваемой последовательности.

FILTER маскирует сегменты запрашиваемой последовательности, имеющие малую структурную сложность, как определено программой SEG Wootton & Federhen (1993), Computers and Chemistry 17:149-163, или сегменты, состоящие из внутренних повторов короткой периодичности, как определено программой XNU, Claverie & States, 1993, Computers and Chemistry 17:191-201, или для BLASTN программой DUST, Tatusov and Lipman (см. веб-сайт NCBI). Фильтрацией можно удалить из результатов статистически значимые, но биологически неинтересные сообщения (например, совпадения с распространенными кислыми, основными или богатыми пролином областями), оставляя более биологически интересные области запрашиваемой последовательности доступными для специфического сопоставления с последовательностями из базы данных.

Последовательность малой сложности, обнаруженная программой-фильтром, заменяется буквой "N" в нуклеотидной последовательности (например, "N", повторяемой 13 раз) и буквой "X" в белковых последовательностях (например, "X", повторяемой 9 раз).

Фильтрацию применяют только к запрашиваемой последовательности (или ее трансляционным продуктам), не к последовательностям из базы данных. Фильтром по умолчанию является DUST для BLASTN, SEG для других программ.

Нередко SEG, XNU или обе программы не маскируют ровно ничего при применении к последовательностям в SWISS-PROT, поэтому не следует ожидать, что фильтрация всегда эффективна. Кроме того, в некоторых случаях последовательности маскируются полностью, указывая на то, что к статистической достоверности любых совпадений, о которых сообщено для запрашиваемой последовательности без фильтрации, следует относиться с подозрением.

NCBI-gi показывает в результатах идентификаторы NCBI gi, в дополнение к зарегистрированному названию и/или названию локуса.

Наиболее предпочтительно сравнение последовательностей проводят с применением простого поискового алгоритма BLAST, предоставленного на веб-сайте NCBI, описанном выше, в директории "/BLAST".

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показано разнообразие V_H/HSA в положениях H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H96, H97, H98 (кодировка DVT или NNK соответственно), расположенных в антигенсвязывающей области $V_H HSA$. Последовательность V_K отличается в положениях L50, L53.

На фиг. 2 показана библиотека 1: $V_K/DVT V_H$ эмбрионального типа; библиотека 2: $V_K/NNK V_H$

эмбрионального типа; библиотека 3: $V_H/DVT V_K$ эмбрионального типа; библиотека 4: $V_H/NNK V_K$ эмбрионального типа; в формате фагового дисплея/ScFv. Эти библиотеки были подвергнуты предварительной селекции на связывание лигандов общего типа, белка А и белка L, таким образом, что большинство клонов и селектированных библиотек являются функциональными. Библиотеки селектировали на HSA (первый раунд) и β -галактозидазу (β -gal) (второй раунд), селекция HSA β -gal, или на β -gal (первый раунд) и HSA (второй раунд), селекция β -gal HSA. Растворимые scFv от этих ПЦР (полимеразная цепная реакция)-клонов амплифицируют в последовательности. Для дальнейшей работы был выбран один клон, кодирующий антитело K8 с двойной специфичностью.

На фиг. 3 показано выравнивание цепей V_H и цепей V_K .

На фиг. 4 показано описание связывающих свойств антитела K8, связывающие свойства антитела K8 охарактеризованы моноклональным фаговым ELISA; было обнаружено, что антитело K8 с двойной специфичностью связывало HSA и β -gal и было представлено на поверхности фага с сигналами абсорбции более 1,0. Перекрестной реактивности с другими белками выявлено не было.

На фиг. 5 показан ELISA растворимого scFv, проводимый с использованием известных концентраций фрагмента антитела K8. 96-луночный планшет покрывали 100 мкг HSA, BSA и β -gal в концентрации 10 мкг/мл и 100 мкг/мл белка А в концентрации 1 мкг/мл. Наносили 50 мкг серийных разведений scFv K8 и связанные фрагменты антител выявляли с использованием белка L с пероксидазой хрена (белка L-HRP). Результаты ELISA подтверждают, что антитело K8 имеет две специфичности.

На фиг. 6 показаны характеристики связывания клона $K8V_K$ /модельный V_H , анализируемого с использованием ELISA растворимого scFv. Образование растворимых фрагментов scFv было индуцировано изопропилтиогалактозидом (IPTG), как описано Harrison et al., Methods Enzymol. 1996; 267:83-109, и супернатант, содержащий scFv, анализировали непосредственно. ELISA растворимого scFv проводили, как описано в примере 1, и связанные scFv выявляли с использованием белка L-HRP. Результаты ELISA выявили, что данный клон был все еще способен связывать β -gal, в то время как связывание BSA было ликвидировано.

На фиг. 7 показана последовательность 1 и 2 векторов переменных доменов.

На фиг. 8 представлена карта вектора C_H , используемого для конструирования мультиспецифичного лиганда V_H1/V_H2 .

На фиг. 9 представлена карта вектора V_K , используемого для конструирования мультиспецифичного лиганда V_K1/V_K2 .

На фиг. 10 показано исследование с рецептором TNF по сравнению 4 димера TAR1-5, 4 димера TAR1-5-19 и мономера TAR1-5-19.

На фиг. 11 показано исследование с рецептором TNF по сравнению 1-6 димеров TAR1-5. Все димеры очищали жидкостной хроматографией быстрого разрешения (FPLC), и показаны результаты оптимальных димерных разновидностей.

На фиг. 12 показано исследование с рецептором TNF гомодимеров TAR1-5 19 в различных форматах: формате dAb-линкер-dAb с линкером 3U, 5U или 7U, формате Fab и формате цистеинового шарнирного линкера.

На фиг. 13 представлена последовательность модельного V_H для библиотеки 1. Последовательность каркасной области V_H , основанная на последовательности эмбрионального типа DP47 - JH4b. Положения, в которых в библиотеке 1 была проведена NNK-рандомизация (N=нуклеотиды А, или Т, или С, или G; K=нуклеотиды G или Т), указаны жирным шрифтом с подчеркиванием.

На фиг. 14 представлена последовательность модельного V_H для библиотеки 2. Последовательность каркасной области V_H , основанная на последовательности эмбрионального типа DP47-JH4b. Положения, в которых в библиотеке 2 была проведена NNK-рандомизация (N=нуклеотиды А, или Т, или С, или G; K=нуклеотиды G или Т), указаны жирным шрифтом с подчеркиванием.

На фиг. 15 представлена последовательность модельного V_K для библиотеки 3. Последовательность каркасной области V_K , основанная на последовательности эмбрионального типа $DP_K9 - J_K1$. Положения, в которых в библиотеке 3 была проведена NNK-рандомизация (N=нуклеотиды А, или Т, или С, или G; K=нуклеотиды G или Т), указаны жирным шрифтом с подчеркиванием.

На фиг. 16 представлена нуклеотидная и аминокислотная последовательность dAb против MSA MSA 16 и MSA 26.

На фиг. 17 представлено Вiasoge-ингибирование MSA 16 и 26. Очищенные dAb MSA16 и MSA26 анализировали ингибированием Вiasoge для определения K_d . Кратко, dAb анализировали для определения концентрации dAb, необходимой для достижения 200 резонансных единиц (RU) ответа на чипе Вiasoge CM5, покрытом MSA с высокой плотностью. Когда необходимые концентрации dAb были определены, антиген MSA в диапазоне концентраций около ожидаемой K_d предварительно смешивали с dAb и инкубировали в течение ночи. Связывание dAb с покрытым MSA чипом Вiasoge в каждой из предварительных смесей затем измеряли при высокой скорости потока 30 мкл/мин.

На фиг. 18 представлены сывороточные уровни MSA16 после инъекции. Определяли период полувыведения dAb MSA16 в сыворотке у мышей. MSA16 дозировали в виде однократных

внутривенных (i.v.) инъекций в дозе приблизительно 1,5 мг/кг мышам CD1. Моделирование с использованием 2-компарментной модели показало, что $t_{1/2\alpha}$ MSA16 составлял 0,98 ч и $t_{1/2\beta}$ - 36,5 ч, AUC (площадь под кривой) - 913 ч.мг/мл. MSA16 имело существенно увеличенный период полувыведения по сравнению с HEL4 (dAb против лизоцима белка куриного яйца), $t_{1/2\alpha}$ которого составлял 0,06 ч и $t_{1/2\beta}$ - 0,34 ч.

На фиг. 19 представлены ELISA (а) и исследование с рецептором TNF (в), демонстрирующее ингибирование связывания TNF Fab-подобным фрагментом, содержащим MSA26Cк и TAR1-5-19CH. Добавление MSA с Fab-подобным фрагментом снижает уровень ингибирования. Планшет для ELISA, покрытый 1 мкг/мл TNF α , исследовали Fab-подобным фрагментом $V_k C_H$ и $V_k C_k$ с двойной специфичностью и также контрольным dAb, связывающим TNF α , в концентрации, вычисленной для того, чтобы дать сходный сигнал при ELISA. Как dAb с двойной специфичностью, так и контрольное dAb использовали для зондирования планшета для ELISA в присутствии и в отсутствие 2 мг/мл MSA. Сигнал в лунках с фрагментами с двойной специфичностью был снижен более чем на 50%, но сигнал в лунках с dAb был полностью сохранен (см. фиг. 19а). Такой же белок с двойной специфичностью был подвергнут исследованию с рецептором с и без MSA, и также была показана конкуренция с MSA (см. фиг. 19в). Это демонстрирует, что связывание MSA с фрагментом с двойной специфичностью конкурирует со связыванием с TNF α .

На фиг. 20 представлено исследование с рецептором TNF, показывающее ингибирование связывания TNF со связанным дисульфидными связями гетеродимером dAb TAR1-5-19 и dAb MSA16. Добавление MSA с димером снижает уровень ингибирования дозозависимым образом. Исследование с рецептором TNF (фиг. 19 (б)) проводили в присутствии постоянной концентрации гетеродимера (18 нМ) и серийных разведений MSA и HSA. Присутствие HSA в диапазоне концентраций (до 2 мг/мл) не вызывало снижения способности димера ингибировать TNF α . Тем не менее, добавление MSA вызывало дозозависимое снижение способности димера ингибировать TNF α (фиг. 19а). Это демонстрирует, что MSA и TNF α конкурируют за связывание со связанным дисульфидными связями димером TAR1-5-19, MSA16. MSA и HSA сами по себе не оказывали влияния на уровень связывания TNF в исследовании.

На фиг. 21 представлены очищенные рекомбинантные домены человеческого сывороточного альбумина (HSA), дорожки 1-3 содержат домены I, II и III HSA соответственно.

На фиг. 22 представлен пример иммуопреципитации, показывающий, что HSA-связывающее dAb связывает полноразмерный HSA (дорожка 8) и домен II HSA (дорожка 6), но не связывает домены I и III HSA (дорожки 5 и 7 соответственно). dAb, не связывающее HSA, не осаждает ни полноразмерный HSA, ни домены I, II или III HSA (дорожки 1-4).

На фиг. 23 представлен пример определения связывания домена HSA dAb, как определено поверхностным плазмонным резонансом. Исследуемое dAb наносили, как описано, на сенсорный чип CM5 (Biacore), покрытый человеческим сывороточным альбумином с низкой плотностью. В точке 1 исследуемое dAb наносили само по себе в концентрации 1 мкМ. В точке 2 использовали команду одновременного нанесения, нанесение образца переключали на смесь 1 мкМ dAb плюс 7 мкМ домена 1, 2 или 3 HSA, продуцированного в *Pichia*. В точке 3 нанесение останавливали, но сохраняли поток буфера. Результаты для двух различных dAb показаны на фиг. 23(а) и 23(б). Когда dAb наносят с доменом HSA, который его связывает, он образует комплекс, который не может больше связывать HSA на чипе, поэтому сигнал Biacore уменьшается в точке 2, со скоростью диссоциации, отражающей 3-компонентное равновесие между dAb, растворимым доменом HSA и связанным с чипом HSA. Когда домен не связывает dAb, сигнал остается неизменным в точке 2 и начинает уменьшаться только в точке 3, где поток переключается на буфер. В обоих случаях dAb связывает домен 2 HSA.

На фиг. 24 представлены последовательности антител клонов AlbuAbTM (dAb, специфично связывающего сывороточный альбумин), идентифицированных фаговой селекцией. Все клоны были выравнены с генами человеческой эмбриональной линии. Остатки, идентичные эмбриональному типу, были обозначены ".". В V_H CDR3, символ "-" был использован для облегчения выравнивания, но не обозначает остаток. Все клоны были выбраны из библиотек, основанных на одной человеческой каркасной области, содержащей гены тяжелых цепей эмбрионального типа V3-23/DP47 и JH4b для библиотек V_H и гены легких цепей O12/O2/DPK9 и J_k 1 для библиотек V_k , с разнообразием боковых цепей, внесенным в положения в антигенсвязывающей области.

На фиг. 25 представлены выравнивания трех доменов человеческого сывороточного альбумина. Консервативность цистеиновых остатков очевидна.

Определения

"Комплементарный". Два домена иммуноглобулина "комплементарны", когда они принадлежат семействам структур, образующих когнатные пары или группы, или имеют происхождение от таких семейств и сохраняют это свойство. Например, домен V_H и домен V_L антитела комплементарны; два домена V_H некомплементарны, и два домена V_L некомплементарны. Комплементарные домены могут быть обнаружены у других членов суперсемейства иммуноглобулинов, как, например, домены V_α и V_β (или γ и δ) T-клеточного рецептора. В контексте второй формы настоящего изобретения

некомплементарные домены не связывают молекулу-мишень кооперативно, но действуют независимо на разные эпитопы-мишени, которые могут быть расположены на одной или разных молекулах. Домены, являющиеся искусственными, как, например, домены на основе белковых каркасов, не связывающие эпитопы, если они не конструированы для этого, некомплементарны. Подобным образом, два домена на основе (например) домена иммуноглобулина и домена фибронектина некомплементарны.

"Иммуноглобулин". Это относится к семейству полипептидов, сохраняющих конформацию иммуноглобулинов, характерную для молекул антител, которая содержит две β -складчатости и, обычно, консервативную дисульфидную связь. Члены суперсемейства иммуноглобулинов вовлечены во многие аспекты клеточных и неклеточных взаимодействий *in vivo*, включая широко распространенные функции в иммунной системе (например, антитела, молекулы T-клеточных рецепторов и т.п.), участие в клеточной адгезии (например, молекулы межклеточной адгезии (ICAM)) и межклеточную передачу сигналов (например, рецепторные молекулы, такие как рецептор PDGF). Настоящее изобретение применимо ко всем молекулам суперсемейства иммуноглобулинов, имеющим связывающие домены. Предпочтительно настоящее изобретение относится к антителам.

"Объединение". Варибельные домены по изобретению объединяют с образованием группы доменов; например, могут быть объединены комплементарные домены, как, например, домены V_L , объединяемые с доменами V_H . Также можно объединять некомплементарные домены. Домены можно объединять несколькими способами, включая связывание доменов ковалентным или нековалентным способом.

"Домен". Домен представляет собой складчатую белковую структуру, сохраняющую свою третичную структуру независимо от остальной части белка. В большинстве случаев домены обеспечивают дискретные функциональные свойства белков и во многих случаях могут быть добавлены, удалены или перемещены на другие белки без потери функции оставшейся части белка и/или домена.

При использовании здесь "отдельный варибельный домен" представляет собой домен, способный специфично связывать эпитоп, антиген или лиганд независимо, т.е. это не требует кооперативного связывания эпитопа, антигена или лиганда другим связывающим доменом. Такой эпитоп, антиген или лиганд может быть встречающимся в природе или может представлять собой модификацию встречающегося в природе эпитопа, антигена или лиганда, или может быть синтетическим. "Варибельная" часть отдельного варибельного домена определяет главным образом специфичность связывания каждого конкретного отдельного варибельного домена. Таким образом, термин "варибельный" в контексте отдельных варибельных доменов относится к тому факту, что варибельность последовательности не распределена равномерно по отдельному варибельному домену, а распределена главным образом между каркасными или скелетными частями отдельного варибельного домена. Например, в отдельном варибельном домене антитела варибельность сконцентрирована в одном-трех сегментах, обычно известных как гиперварибельные участки (CDR). Один или более CDR могут быть распределены между каркасными областями (FR) легкой цепи или тяжелой цепи антитела с образованием либо отдельного варибельного домена легкой цепи антитела, либо отдельного варибельного домена тяжелой цепи антитела, соответственно, каждый из которых специфично связывает эпитоп независимо от другого связывающего домена. Сходную структуру имеет отдельный варибельный домен T-клеточного рецептора с одним-трем CDR, распределенными между каркасными доменами T-клеточного рецептора (TCR).

Таким образом, варибельные части, придающие специфичность связывания отдельным варибельным доменам, могут значительно отличаться по последовательности от других отдельных варибельных доменов, имеющих, по существу, такую же остальную каркасную часть, и, соответственно, могут иметь широкий спектр специфичностей связывания. Каркасы отдельных варибельных доменов включают каркасные области антител, консенсусные каркасные области антител и каркасы, имеющие происхождение и/или полученные из бактериальных белков, например GroEl, GroEs, SpA, SpG, и из белков эукариот, например CTLA-4, липокалинов, фибронектина и т.п. Один источник варибельных частей отдельных варибельных доменов включает один или более CDR, которые могут быть перенесены на неиммуноглобулиновые каркасы, а также каркасные области антител с образованием отдельных варибельных доменов антител. Другим источником разнообразия отдельного варибельного домена может являться диверсификация выбранных положений в неиммуноглобулиновой каркасной области, такой как фибронектин, для образования отдельных варибельных доменов с применением молекулярно-биологических методик, таких как NNK-разнообразие кодонов. Сходным образом, такой источник разнообразия также применим к отдельному варибельному домену антитела.

Отдельный варибельный домен антитела может иметь происхождение от последовательностей, кодируемых и/или генерируемых продуцирующим антитело видом, и включает фрагмент (фрагменты) и/или производные варибельной области антитела, включая одну или более каркасных областей или консенсусные последовательности каркасных областей, и/или один или более CDR. Соответственно, отдельный варибельный домен антитела включает фрагмент (фрагменты) и/или производное (производные) варибельной области легкой цепи антитела или варибельной области тяжелой цепи антитела, или области V_{HH} антитела. Например, области V_{HH} антитела включают эндогенные области

представителей семейства верблюдовых, например верблюдов и лам, и рецептор нового антигена (NAR) акул-нянек и ковровых акул (Roux et al., 1998 PNAS 95(20): 11804-9) и область V_H от пятнистой химеры (Rast et al., 1998, Immunogenetics 47:234-245). Варибельные домены легкой цепи антитела и варибельные домены тяжелой цепи антитела включают эндогенные домены видов животных, включая, предпочтительно без ограничения, человека, мышшь, крысу, свинью, обезьян рода *Synomolgus*, хомяка, лошадь, корову, козу, собаку, кошку и виды птиц, например, человеческий V-каппа и человеческий V_H3 соответственно. Варибельные области легкой цепи антитела и варибельные области тяжелой цепи антитела также включают консенсусные каркасные области антител, как описано ниже, включая области из семейств V-областей, таких как семейство V_H3 . Отдельный варибельный домен T-клеточного рецептора представляет собой отдельный варибельный домен, имеющий происхождение от цепи (цепей) T-клеточного рецептора, например, цепей α , β , γ и δ , и связывающий эпитоп или антиген, или лиганд, независимо от другого связывающего домена для этого эпитопа, антигена или лиганда, аналогично отдельным варибельным доменам антител.

Отдельный варибельный домен антитела также включает белковый домен, содержащий каркас, не имеющий происхождения от антитела или T-клеточного рецептора, и который был создан посредством генной инженерии для того, чтобы продемонстрировать разнообразие в специфичности связывания по сравнению с его состоянием до конструирования, включением в каркас одного или более из CDR1, CDR2 и/или CDR3, или их производного или фрагмента, или целого V-домена антитела. Отдельный варибельный домен антитела может также включать как неиммуноглобулиновый каркас, так и иммуноглобулиновые каркасы, как проиллюстрировано мультимерами отдельных варибельных доменов GroEI, описанными ниже. Предпочтительно CDR имеют происхождение из V-домена антитела цепи антитела, например V_H , V_L и V_{HH} . Цепь антитела может представлять собой цепь, специфично связывающую антиген или эпитоп вместе со второй цепью антитела, или цепь антитела может представлять собой цепь, специфично связывающую антиген или эпитоп независимо от второй цепи антитела, как, например, V_{HH} . Интеграция одного или более CDR в отдельный варибельный домен антитела, содержащий неиммуноглобулиновый каркас, должна приводить к способности варибельного домена с неиммуноглобулиновым каркасом специфично связывать эпитоп или антиген, или лиганд, независимо от другого связывающего домена для этого эпитопа, антигена или лиганда.

Отдельный домен трансформируют в отдельный варибельный домен внесением разнообразия в область (области), разработанные, чтобы стать связывающими областями, с последующей селекцией желаемых характеристик связывания с применением, например, дисплейных технологий. Разнообразие может быть внесено в определенные области рассматриваемого неиммуноглобулинового каркаса рандомизацией аминокислотной последовательности определенных петель каркаса, например, введением кодонов NNK. Этот механизм генерирования разнообразия с последующей селекцией желаемых характеристик связывания сходен с природной селекцией высокоаффинных антиген-специфичных антител, являющейся результатом генерирования разнообразия в петлях, составляющих связывающую область антител в природе. В идеальном случае, отдельный домен, небольшой и содержащий конформацию, сходную с петлей антитела, трансформируют в отдельный варибельный домен, варианты отдельного варибельного домена экспрессируют, и из них могут быть выбраны отдельные варибельные домены с желаемыми специфичностями и характеристиками связывания, из библиотек, содержащих большое число вариантов отдельного варибельного домена.

Номенклатура отдельных варибельных доменов: иногда отдельные варибельные домены обозначают, опуская первую букву "d" или буквы "Dom", например, Ab7h24 идентичен dAb7h24, который идентичен DOM7h24.

Под отдельным варибельным доменом антител подразумевают складчатый полипептидный домен, содержащий последовательности, характерные для варибельных доменов антител. Таким образом, он включает полные варибельные домены антител и модифицированные варибельные домены, например, в которых одна или более петли были заменены последовательностями, не характерными для варибельных доменов антител, или варибельные домены, которые были процессированы или содержат N- или C-концевые удлинения, а также складчатые фрагменты варибельных доменов, сохраняющие, по меньшей мере частично, связывающую активность и специфичность полноразмерного домена.

"Репертуар". Набор различных вариантов, например полипептидных вариантов, различающихся их первичной последовательностью. Библиотека, используемая в настоящем изобретении, будет включать репертуар полипептидов, содержащий по меньшей мере 1000 членов.

"Библиотека". Термин "библиотека" относится к совокупности гетерогенных полипептидов или нуклеиновых кислот. Библиотека составлена из членов, каждый из которых имеет единственную полипептидную последовательность или последовательность нуклеиновой кислоты. В этой степени библиотека синонимична репертуару. Различия последовательностей между членами библиотеки обеспечивают разнообразие, присутствующее в библиотеке. Библиотека может принимать форму простой совокупности полипептидов или нуклеиновых кислот или может быть в форме организмов или клеток, например бактерий, вирусов, клеток животных или растительных клеток и т.п., трансформированных в библиотеку нуклеиновых кислот. Предпочтительно каждый отдельный организм

или клетка содержит только один или ограниченное число членов библиотеки. Преимущественно нуклеиновые кислоты введены в векторы экспрессии с целью сделать возможной экспрессию полипептидов, кодируемых нуклеиновыми кислотами. В предпочтительном аспекте, таким образом, библиотека может принимать форму популяции организмов-хозяев, каждый из которых содержит одну или более копии вектора экспрессии, содержащего один член библиотеки в форме нуклеиновой кислоты, которая может быть экспрессирована для выработки ее соответствующего полипептидного члена. Таким образом, популяция организмов-хозяев имеет возможность кодировать широкий репертуар генетически различных полипептидных вариантов.

"Мультиспецифичный лиганд с закрытой конформацией" описывает мультиспецифичный лиганд, как определено здесь, содержащий по меньшей мере два эпитопсвязывающих домена, как определено здесь. Термин "закрытая конформация" (мультиспецифичного лиганда) обозначает, что эпитопсвязывающие домены лиганда расположены таким образом, что связывание эпитопа одним эпитопсвязывающим доменом конкурирует со связыванием эпитопа другим эпитопсвязывающим доменом. Т.е. штатные эпитопы могут быть связаны каждым эпитопсвязывающим доменом по отдельности, но не одновременно. Закрытая конформация лиганда может быть получена с применением способов, описанных здесь.

"Антитело". Антитело (например, IgG, IgM, IgA, IgD или IgE) или фрагмент (такой как Fab, F(ab')₂, Fv, связанный дисульфидными связями Fv, scFv, мультиспецифичное антитело с закрытой конформацией, связанный дисульфидными связями scFv, диатело), либо имеющие происхождение от любого вида, естественным образом продуцирующего антитело, либо созданные методом рекомбинантных ДНК; либо выделенные из сыворотки, В-клеток, гибридом, трансфектом, дрожжей или бактерий.

"Лиганд с двойной специфичностью". Лиганд, содержащий первый отдельный вариабельный домен иммуноглобулина и второй отдельный вариабельный домен иммуноглобулина, как определено здесь, где вариабельные домены способны связывать два разных антигена или два эпитопа на одном и том же антигене, которые обычно не связывает моноспецифичный иммуноглобулин. Например, два эпитопа могут быть расположены на одном и том же гаптене, но не являются одинаковыми или расположенными достаточно близко друг к другу для связывания одним моноспецифичным лигандом. Лиганды с двойной специфичностью по настоящему изобретению состоят из вариабельных доменов, имеющих разные специфичности, и не содержат пар взаимно комплементарных вариабельных доменов, имеющих одинаковую специфичность. Таким образом, лиганды с двойной специфичностью, которые, как определено здесь, содержат два отдельных вариабельных домена, являются подгруппой мультимерных лигандов, которые, как определено здесь, содержат два или более отдельных вариабельных домена, где по меньшей мере два из отдельных вариабельных доменов способны связывать два разных антигена или два разных эпитопа на одном и том же антигене. Кроме того, лиганд с двойной специфичностью, как определено здесь, также отличен от лиганда, содержащего отдельный вариабельный домен антитела и второй антиген- или эпитопсвязывающий домен, не являющийся отдельным вариабельным доменом. Кроме того, лиганд с двойной специфичностью, как определено здесь, также отличен от лиганда, содержащего первый и второй антиген-/эпитопсвязывающий домен, где ни один антиген-/эпитопсвязывающий домен не является отдельным вариабельным доменом, как определено здесь.

"Антиген". Молекула, связываемая лигандом по настоящему изобретению. Обычно антигены связывают лиганды-антитела, и антигены способны вызывать гуморальный иммунный ответ *in vivo*. Он может представлять собой полипептид, белок, нуклеиновую кислоту или другую молекулу. В большинстве случаев лиганды с двойной специфичностью по изобретению выбирают по специфичности в отношении мишени против двух определенных антигенов. В случае обычных антител и их фрагментов связывающая область антитела, определяемая вариабельными петлями (L1, L2, L3 и H1, H2, H3), способна связывать антиген.

"Эпитоп". Единица структуры, обычно связываемая иммуноглобулиновой парой V_H/V_L. Эпитопы определяют минимальную связывающую область для антитела и, таким образом, представляют собой мишень специфичности антитела. В случае отдельного домена антитела эпитоп представляет собой единицу структуры, связываемую вариабельным доменом в выделенном виде. Эпитопсвязывающий домен содержит белковый каркас и области, взаимодействующие с эпитопом (расположенные преимущественно на поверхности белкового каркаса). Эпитопсвязывающий домен может содержать области, взаимодействующие с эпитопом, являющиеся нелинейными, например, когда эпитопсвязывающий домен содержит несколько областей, взаимодействующих с эпитопом, между которыми есть перекрывающиеся области, например, CDR, разделенные FR, или которые расположены на отдельных полипептидных цепях. Альтернативно, эпитопсвязывающий домен может содержать линейную область, взаимодействующую с эпитопом, состоящую из кодируемых рядом друг с другом аминокислотных остатков на одной полипептидной цепи.

"Лиганд общего типа". Лиганд, связывающий все члены репертуара. В большинстве случаев он не связан через антигенсвязывающую область, как определено выше. Неограничивающие примеры включают белок А, белок L и белок G.

"Селекция". Полученный скринингом или полученный способом дарвиновской селекции, где связывающие взаимодействия происходят между доменом и антигеном или эпитопом или между антителом и антигеном или эпитопом. Таким образом, первый вариабельный домен может быть селектирован для связывания антигена или эпитопа в присутствии или в отсутствие комплементарного вариабельного домена.

"Универсальная каркасная область". Отдельная последовательность каркасной области антитела, соответствующей областям антитела, сохраняемым в последовательности, как определено Kabat ("Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Department of Health and Human Services), или соответствующей репертуару человеческих иммуноглобулинов эмбрионального типа или структуре, как определено Chothia and Lesk (1987), J. Mol. Biol. 196:910-917. Согласно изобретению предложено применение отдельной каркасной области или набора таких каркасных областей, которые, как было обнаружено, позволяют получить практически любую специфичность связывания посредством изменения только гипервариабельных областей.

При использовании здесь "конъюгат" относится к композиции, содержащей антигенсвязывающий фрагмент антитела, связывающий сывороточный альбумин, связанный с лекарственным средством.

При использовании здесь термин "малая молекула" обозначает соединение с молекулярной массой менее чем 1500 дальтон (Да), предпочтительно менее чем 1000 Да.

Такие конъюгаты включают "конъюгаты лекарственных средств", содержащие антигенсвязывающий фрагмент антитела, связывающий сывороточный альбумин, с которым лекарственное средство связано ковалентно, и "нековалентные конъюгаты лекарственных средств", содержащие антигенсвязывающий фрагмент антитела, связывающий сывороточный альбумин, с которым лекарственное средство связано нековалентно.

При использовании здесь "конъюгат лекарственного средства" относится к композиции, содержащей антигенсвязывающий фрагмент антитела, связывающий сывороточный альбумин, с которым лекарственное средство связано ковалентно. Лекарственное средство может быть ковалентно связано с антигенсвязывающим фрагментом непосредственно или косвенно посредством подходящей линкерной группировки. Лекарственное средство может быть связано с антигенсвязывающим фрагментом в любом подходящем положении, таком как N-конец, C-конец или через боковые цепи подходящих аминокислот (например, аминогруппу лизина).

"Период полувыведения". Время, занимаемое снижением концентрации лиганда в сыворотке на 50% *in vivo*, например, вследствие деградации лиганда и/или клиренса, или секвестрации лиганда естественными механизмами. Лиганды по изобретению стабилизированы *in vivo*, и их период полувыведения увеличен связыванием с молекулами, препятствующими деградации и/или клиренсу, или секвестрации. Типично, такие молекулы представляют собой встречающиеся в природе белки, сами по себе имеющие длительный период полувыведения *in vivo*. Период полувыведения лиганда увеличен, если его функциональная активность сохраняется *in vivo* в течение более длительного периода, чем у сходного лиганда, не являющегося специфичным в отношении молекулы, увеличивающей период полувыведения. Таким образом, лиганд, специфичный в отношении HSA и молекулы-мишени, сравнивают с таким же лигандом без специфичности в отношении HSA, не связывающим HSA, но связывающим другую молекулу. Например, он может связывать второй эпитоп на молекуле-мишени. Типично, период полувыведения увеличен на 10, 20, 30, 40, 50% или более. Возможны увеличения в пределах 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50 или более периодов полувыведения. Альтернативно, или в дополнение, возможны увеличения в пределах до 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 периодов полувыведения.

Фраза "по существу, одинаковый" при использовании для сравнения периода полувыведения T_β лиганда с периодом полувыведения T_β сывороточного альбумина в организме-хозяине означает, что период полувыведения T_β лиганда в организме-хозяине отличается от периода полувыведения T_β сывороточного альбумина самого по себе в том же организме-хозяине, предпочтительно в человеке-хозяине, не более чем на 50%, например период полувыведения T_β такого лиганда не более чем на 50% меньше или не более чем на 50% больше периода полувыведения T_β сывороточного альбумина в указанном организме-хозяине. Предпочтительно применительно к фразе "по существу, одинаковый", период полувыведения T_β лиганда в организме-хозяине отличается от периода полувыведения сывороточного альбумина самого по себе не более чем на 10-20% и более предпочтительно отличается от периода полувыведения сывороточного альбумина самого по себе не более чем на 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1%, или менее, или вообще не отличается от периода полувыведения сывороточного альбумина самого по себе.

Альтернативно, фраза "по существу, неодинаковый" при использовании для сравнения периода полувыведения T_β лиганда с периодом полувыведения T_β сывороточного альбумина в организме-хозяине означает, что период полувыведения T_β лиганда в организме-хозяине отличается от периода полувыведения T_β сывороточного альбумина самого по себе в том же организме-хозяине, предпочтительно в человеке-хозяине, по меньшей мере на 50%, например, период полувыведения T_β

лиганда более чем на 50% превышает период полувыведения Т β сывороточного альбумина в указанном организме-хозяине.

"Гомогенное иммунологическое исследование". Иммунологическое исследование, где анализируемое вещество выявляют без необходимости в стадии разделения связанных и несвязанных реагентов.

"По существу, идентичный" или "по существу, гомологичный". Первая аминокислотная или нуклеотидная последовательность, содержащая достаточное число идентичных или эквивалентных (например, со сходной боковой цепью, например, консервативные аминокислотные замены) аминокислотных остатков или нуклеотидов по сравнению со второй аминокислотной или нуклеотидной последовательностью таким образом, что первая и вторая аминокислотные или нуклеотидные последовательности обладают одинаковыми активностями. В случае первого и второго антител и/или отдельных переменных доменов, описанных здесь, первое антитело или отдельный переменный домен имеет ту же специфичность связывания, что и первое, и обладает по меньшей мере 50% или по меньшей мере до 55, 60, 70, 75, 80, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% аффинности первого антитела или отдельного переменного домена.

При использовании здесь термины "условия низкой строгости", "условия средней строгости", "условия высокой строгости" или "условия очень высокой строгости" описывают условия гибридизации и промывания нуклеиновых кислот. Руководство по проведению реакций гибридизации может быть найдено в *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6, что полностью включено сюда посредством ссылки. В этой ссылке описаны водные и неводные способы, любой из которых может быть использован. Названные здесь конкретные условия гибридизации представляют следующие: (1) условия гибридизации низкой строгости в 6X хлориде натрия/цитрате натрия (SSC) при приблизительно 45°C с двумя последующими промываниями в 0,2X SSC, 0,1% додецилсульфате натрия (SDS) при по меньшей мере 50°C (температура промываний может быть увеличена до 55°C для условий низкой строгости); (2) условия гибридизации средней строгости в 6X SSC при приблизительно 45°C с последующим одним или более промываниями в 0,2X SSC, 0,1% SDS при 60°C; (3) условия гибридизации высокой строгости в 6X SSC при приблизительно 45°C с последующим одним или более промываниями в 0,2X SSC, 0,1% SDS при 65°C; предпочтительно (4) условия гибридизации очень высокой строгости представляют собой 0,5 M фосфат натрия, 7% SDS при 65°C с последующим одним или более промываниями при 0,2X SSC, 0,1% SDS при 65°C. Условия очень высокой строгости (4) являются предпочтительными условиями, и их следует использовать, если не указано иное.

"Поверхностный плазмонный резонанс". Конкурентные исследования могут быть применены для определения того, конкурирует ли определенный антиген или эпитоп, такой как человеческий сывороточный альбумин, с другим антигеном или эпитопом, таким как сывороточный альбумин обезьян рода *Synomolgus*, за связывание с лигандом, связывающим сывороточный альбумин, описанным здесь, таким как специфичный dAb. Сходные конкурентные исследования могут быть применены для определения того, конкурирует ли первый лиганд, такой как dAb, со вторым лигандом, таким как dAb, за связывание антигена-мишени или эпитопа-мишени. При использовании здесь термин "конкурирует" относится к веществу, такому как молекула, соединение, предпочтительно белок, способному в той или иной степени препятствовать специфичному связывающему взаимодействию между двумя или более молекулами. Фраза "не оказывает конкурентного ингибирования" означает, что вещество, такое как молекула, соединение, предпочтительно белок, не препятствует в какой-либо измеримой или значимой степени специфичному связывающему взаимодействию между двумя или более молекулами. Специфичное связывающее взаимодействие между двумя или более молекулами предпочтительно включает специфичное связывающее взаимодействие между отдельным переменным доменом и его когнатным партнером или мишенью. Препятствующая или конкурирующая молекула может представлять собой другой отдельный переменный домен, или она может представлять собой молекулу, структурно и/или функционально сходную с когнатным партнером или мишенью.

Отдельный переменный домен включает отдельный переменный домен иммуноглобулина и неиммуноглобулиновый отдельный переменный домен, содержащий одну, две, три или более CDR-области из переменного домена иммуноглобулина, такого как переменный домен антитела, включая отдельный переменный домен тяжелой или легкой цепи антитела. Отдельный переменный домен может иметь происхождение от животного, включая человека, крысу, мышь, свинью, обезьяну, представителей семейства верблюдовых, как, например, переменная область (V-область) антитела, или он может иметь происхождение от микроорганизма, такого как *E.coli*, в случае неммуноглобулинового каркаса GroEl и GroEs. Отдельный переменный домен может быть частично или полностью искусственным или может быть образован с применением рекомбинантной молекулярно-биологической технологии.

In vitro конкурентные анализы для определения способности отдельного переменного домена конкурировать за связывание мишени с другим связывающим мишень доменом, таким как другой отдельный переменный домен, а также для определения K_d, хорошо известны в данной области

техники. Одним предпочтительным конкурентным исследованием является исследование поверхностного плазмонного резонанса, которое имеет преимущества быстроты, чувствительности и применимости к широкому спектру концентраций белка, и требует небольших количеств исследуемого материала. Предпочтительным конкурентным исследованием поверхностного плазмонного резонанса является конкурентный эксперимент Biacore. Конкурентный эксперимент Biacore может быть применен для определения, например, того, конкурируют ли сывороточный альбумин яванского макака и человеческий сывороточный альбумин за связывание с лигандом, таким как dAb DOM7h-x. Одним экспериментальным протоколом для такого примера является следующий.

Например, после покрытия сенсорного чипа CM5 (Biacore AB) при 25°C приблизительно 1000 резонансными единицами (RU) человеческого сывороточного альбумина (HSA), очищенное dAb наносят на антигенную поверхность в одной концентрации (например, 1 мкМ) само по себе и в комбинации с серийными разведениями сывороточного альбумина яванского макака (CSA). Серийные разведения HSA смешивали с постоянной концентрацией (40 нМ) очищенного dAb. Подходящие серийные разведения CSA могут начинаться с 5 мкМ CSA, с шестью двукратными разведениями до 78 нМ CSA. Этим раствором необходимо дать достичь равновесия перед нанесением. После нанесения получали считываемый ответ для измерения полученных RU связывания для dAb самого по себе в каждой из нескольких смесей dAb/CSA, по данным, использованным в соответствии с программным обеспечением для оценки BIA, строили кривую доза-ответ для каждого случая, когда CSA ингибировал связывание AlbuAb™ (dAb, специфично связывающего сывороточный альбумин) с чипом, на котором иммобилизован HSA. При сравнении связанных RU dAb самого по себе со связанными RU dAb + CSA будет видно, конкурирует ли CSA с HSA за связывание dAb. Если он конкурирует, тогда с увеличением концентрации CSA в растворе RU dAb, связанного с HSA, будут уменьшаться. Если конкуренции нет, то добавление CSA не будет влиять на количество dAb, связывающего HSA.

Специалисту в данной области техники известно как адаптировать этот или другие протоколы для проведения этого конкурентного анализа на множестве различных лигандов, включая несколько лигандов, описанных здесь, связывающих сывороточный альбумин. Множество лигандов включает, без ограничения, мономерные отдельные вариабельные домены, включая отдельные вариабельные домены, содержащие иммуноглобулиновый и/или неиммуноглобулиновый каркас, dAb, лиганды с двойной специфичностью и мультимеры этих лигандов. Специалисту в данной области техники также известно как адаптировать этот протокол для сравнения связывания нескольких разных пар антигенов и/или эпитопов с лигандом с применением этого конкурентного исследования.

В этих экспериментах можно установить числовое значение отсечки, по которому можно будет определить, конкурирует ли антиген или эпитоп с другим антигеном или эпитопом за связывание со специфичным лигандом, предпочтительно dAb. Например, если в описанном выше эксперименте 5 мкМ CSA в растворе приводят к 10% или менее снижению RU dAb, связанного с HSA, тогда признают отсутствие конкуренции за связывание. Соответственно, снижение RU связывания dAb с HSA в присутствии CSA более чем на 10% будет указывать на наличие конкуренции CSA за связывание dAb для связывания HSA. Снижение RU связывания dAb с HSA менее чем на 10% будет указывать на отсутствие конкуренции CSA за связывание dAb HSA, где снижения на 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 и 1% являются прогрессивно более строгими требованиями для выявления отсутствия конкуренции. Чем больше снижение RU связывания dAb с HSA, тем больше конкуренция. Таким образом, увеличивающиеся степени конкуренции могут быть расположены в соответствии с процентом снижения RU связывания с HSA, т.е. по меньшей мере 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% или вплоть до 100% снижения.

При использовании здесь фрагмент относится к менее чем 100% последовательности (например, до 99, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10% и т.д.), но содержащей 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 или более смежных аминокислотных остатков. Фрагмент имеет длину, достаточную для сохранения интересующего связывания сывороточного альбумина с аффинностью 1×10^{-6} М или менее. При использовании здесь фрагмент также относится к возможным вставкам, делециям или заменам одной или более аминокислот, существенно не меняющим способность измененного полипептида связывать отдельный домен антитела, выработанного против мишени. Число аминокислотных вставок, делеций или замен предпочтительно составляет до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 или 70 аминокислот.

Подробное описание изобретения

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют то же значение, в котором их обычно понимают специалисты в данной области техники (например, в клеточной культуре, молекулярной генетике, химии нуклеиновых кислот, методиках гибридизации и биохимии). Стандартные методики применяют для молекулярных, генетических и биохимических способов (см., в целом, 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., которые включены сюда посредством ссылки), и химических способов. Стандартные методики для исследований поверхностного плазмонного резонанса включают Jan Terje Andersen et al. (2006), *Eur. J. Immunol.* 36:304-3051, Fagerstam (1991), *Tech. Protein Chem.* 2:65-71, и Johnsson et al. (1991), *Anal. Biochem* 198:268-277.

Получение мультиспецифичных лигандов на основе иммуноглобулинов

Лиганды с двойной специфичностью по изобретению, с открытой или закрытой конформацией в соответствии с желаемой формой изобретения, могут быть получены по установленным ранее методикам, используемым в области конструирования антител, для получения scFv, "фаговых" антител или других конструированных молекул антител. Методики получения антител и, в частности, биспецифичных антител, описаны, например, в следующих обзорах и приведенных там ссылках: Winter & Milstein (1991), *Nature* 349:293-299; Plueckthun (1992), *Immunological Reviews* 130:151-188; Wright et al. (1992), *Crit. Rev. Immunol.* 12:125-168; Holliger, P. & Winter, G. (1993), *Curr. Op. Biotechn.* 4, 446-449; Carter, et al. (1995), *J. Hematother.* 4, 463-470; Chester, K.A. & Hawkins, R.E. (1995), *Trends Biotechn.* 13, 294-300; Hoogenboom, H.R. (1997), *Nature Biotechnol.* 15, 125-126; Fearon, D. (1997), *Nature Biotechnol.* 15, 618-619; Plüeckthun, A. & Pack, P. (1997), *Immunotechnology* 3, 83-105; Carter, P. & Merchant, A.M. (1997), *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 449-454; Holliger, P. & Winter, G. (1997), *Cancer Immunol. Immunother.* 45, 128-130.

Согласно изобретению предложена селекция переменных доменов против двух разных антигенов или эпитопов и последующее комбинирование переменных доменов.

В методиках, применяемых для селекции переменных доменов антител, используют библиотеки и способы селекции, известные в данной области техники. Естественные библиотеки (Marks et al. (1991), *J. Mol. Biol.*, 222:581; Vaughan et al. (1996), *Nature Biotech.*, 14:309), в которых используют перестроенные V-гены, полученные от человеческих В-клеток, хорошо известны специалистам в данной области техники. Синтетические библиотеки (Hoogenboom & Winter (1992), *J. Mol. Biol.*, 227: 381; Barbas et al. (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457; Nissim et al. (1994), *EMBO J.*, 13: 692; Griffiths et al. (1994), *EMBO J.*, 13: 3245; De Kruif et al. (1995), *J. Mol. Biol.*, 248: 97) получают клонированием V-генов иммуноглобулинов, обычно с применением ПЦР. Ошибки в процессе ПЦР могут привести к высокой степени рандомизации. Библиотеки V_H и/или V_L можно подвергать селекции против антигенов-мишеней или эпитопов-мишеней по отдельности, в случае чего связывание отдельного домена селекционируют непосредственно, или совместно.

Предпочтительный способ получения лиганда с двойной специфичностью по настоящему изобретению включает применение системы селекции, где репертуар переменных доменов подвергают селекции на связывание первого антигена или эпитопа и репертуар переменных доменов подвергают селекции на связывание второго антигена или эпитопа. Селекционированные первый и второй отдельные переменные домены затем комбинируют и лиганд с двойной специфичностью подвергают селекции на связывание как первого, так и второго антигена или эпитопа. Лиганды с закрытой конформацией подвергают селекции на связывание как первого, так и второго антигена или эпитопа по отдельности, но не одновременно.

А. Векторные системы библиотек

В данной области техники известно множество систем селекции, подходящих для использования в настоящем изобретении. Примеры таких систем описаны ниже.

Системы экспрессии бактериофага лямбда могут быть подвергнуты скринингу непосредственно как бактериофагальные бляшки или как колонии лизогенов, в обоих случаях, как описано ранее (Huse et al. (1989), *Science*, 246: 1275; Caton и Koprowski (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87; Mullinax et al. (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 8095; Persson et al. (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 2432), и применимы в изобретении. В то время как такие системы экспрессии могут быть использованы для скрининга до 10⁶ различных членов библиотеки, они не являются действительно подходящими для скрининга больших количеств (более чем 10⁶ членов).

Особенно полезными в конструировании библиотек являются дисплейные системы селекции, делающие возможным связывание нуклеиновой кислоты с экспрессируемым ею полипептидом. При использовании здесь дисплейная система селекции представляет собой систему, допускающую селекцию, подходящим дисплейным способом, отдельных членов библиотеки связыванием с лигандами общего типа и/или лигандами-мишенями.

Селекционные протоколы для выделения желаемых членов больших библиотек известны в данной области техники, типичными примерами которых являются фаговые дисплейные методики. Такие системы, в которых различные пептидные последовательности представлены на поверхности нитчатого бактериофага (Scott и Smith (1990), *Science*, 249: 386), подтвердили свою полезность для создания библиотек фрагментов антител (и кодирующих их нуклеотидных последовательностей) для *in vitro* селекции и амплификации специфичных фрагментов антител, связывающих антиген-мишень (McCafferty et al., WO 92/01047). Нуклеотидные последовательности, кодирующие области V_H и V_L, связаны с фрагментами генов, кодирующими лидерные сигнальные последовательности, направляющие их в периплазматическое пространство *E.coli*, и в результате получаемые фрагменты антител представлены на

поверхности бактериофага, в большинстве как слитые белки с белками оболочки бактериофага (например, рIII или рVIII). Альтернативно, фрагменты антител представлены снаружи на капсидах фага лямбда (фаготела). Преимущество основанных на фагах дисплейных систем состоит в том, что поскольку они являются биологическими системами, селективируемые члены библиотеки могут быть амплифицированы просто выращиванием фага, содержащего селективируемый член библиотеки, в бактериальных клетках. Кроме того, поскольку фаг или фагмидный вектор содержат на себе нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептидный член библиотеки, секвенирование, экспрессия и последующая генетическая манипуляция относительно просты.

Способы конструирования бактериофаговых дисплейных библиотек антител и библиотек экспрессии фага лямбда хорошо известны в данной области техники (McCafferty et al. (1990), *Nature*, 348: 552; Kang et al. (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 4363; Clackson et al. (1991), *Nature*, 352: 624; Lowman et al. (1991), *Biochemistry*, 30: 10832; Burton et al. (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 10134; Hoogenboom et al. (1991), *Nucleic Acids Res.*, 19: 4133; Chang et al. (1991), *J. Immunol*, 147: 3610; Breitling et al. (1991), *Gene*, 104: 147; Marks et al. (1991), *supra*; Barbás et al. (1992), *supra*; Hawkins and Winter (1992), *J. Immunol*, 22: 867; Marks et al., 1992, *J. Biol. Chem.*, 267: 16007; Lerner et al. (1992), *Science*, 258: 1313, включенные сюда посредством ссылки).

Один особенно выгодный подход представлял собой применение фаговых библиотек scFv (Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 5879-5883; Chaudhary et al. (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 1066-1070; McCafferty et al. (1990), *supra*; Clackson et al. (1991), *Nature*, 352: 624; Marks et al. (1991), *J. Mol. Biol.*, 222: 581; Chiswell et al. (1992), *Trends Biotechnol.*, 10: 80; Marks et al. (1992), *J. Biol. Chem.*, 267). Были описаны различные воплощения библиотек scFv, представленных на белках оболочки бактериофагов. Также известны усовершенствования фаговых дисплейных способов, например, как описано в WO 96/06213, WO 92/01047 (Medical Research Council et al.) и WO 97/08320 (Morphosys), включенных сюда посредством ссылки.

Другие системы для образования библиотек полипептидов включают применение бесклеточного ферментного оборудования для *in vitro* синтеза членов библиотеки. В одном способе молекулы РНК селективируют поочередными раундами селекции против мишени и ПЦР-амплификацией (Tuerk и Gold (1990), *Science*, 249: 505; Ellington и Szostak (1990), *Nature*, 346: 818). Похожая методика может быть применена для идентификации последовательностей ДНК, связывающих предопределенный человеческий транскрипционный фактор (Thiesen и Bach (1990), *Nucleic Acids Res.*, 18: 3203; Beaudry и Joyce (1992), *Science*, 257: 635; WO 92/05258 и WO 92/14843). Похожим образом, *in vitro* трансляция может быть применена для синтеза полипептидов как способ образования больших библиотек. Эти способы, в большинстве случаев включающие стабилизированные полисомные комплексы, описаны, кроме того, в WO 88/08453, WO 90/05785, WO 90/07003, WO 91/02076, WO 91/05058 и WO 92/02536. В альтернативных дисплейных системах, не основанных на фагах, как, например, раскрытых в WO 95/22625 и WO 95/11922 (Affymax), используют полисомы для представления полипептидов для селекции.

Еще одна категория методик включает селекцию репертуаров в искусственных компартментах, допускающих связь гена с его генным продуктом. Например, селекционная система, в которой нуклеиновые кислоты, кодирующие желаемые генные продукты, могут быть селективированы в микрокапсулах, сформированных эмульсиями типа "вода в масле", описана в WO 99/02671, WO 00/40712 и Tawfik & Griffiths (1998), *Nature Biotechnol* 16(7), 652-6. Генетические элементы, кодирующие генный продукт, имеющий желаемую активность, компартиментализуют в микрокапсулах и затем транскрибируют и/или транслируют для образования их соответствующих генных продуктов (РНК или белка) в микрокапсулах. Генетические элементы, вырабатывающие генный продукт, имеющий желаемую активность, впоследствии хранят. В таком способе селективируют интересующие генные продукты выявлением желаемой активности множеством способов.

Б. Конструирование библиотек

Библиотеки, предназначенные для селекции, могут быть конструированы с применением методик, известных в данной области техники, например, как изложено выше, или могут быть приобретены из коммерческих источников. Библиотеки, полезные в настоящем изобретении, описаны, например, в WO 99/20749. Когда векторная система выбрана и одна или более последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие интересующие полипептиды, клонированы в вектор библиотеки, можно формировать разнообразие в рамках клонированных молекул, выполняя мутагенез перед экспрессией; альтернативно, кодируемые белки могут быть экспрессированы и селективированы, как описано выше, перед проведением мутагенеза и дополнительных раундов селекции. Мутагенез последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих структурно оптимизированные полипептиды, проводят стандартными молекулярными способами. Особенно полезна полимеразная цепная реакция, или ПЦР (Mullis и Faloona (1987), *Methods Enzymol*, 155: 335, включено здесь посредством ссылки). ПЦР, в которой используют множество циклов репликации ДНК, катализируемой термостабильной ДНК-зависимой ДНК-полимеразой, для амплификации интересующей последовательности-мишени, хорошо известна в данной области техники. Конструирование различных библиотек антител было обсуждено в Winter et al. (1994), *Ann. Rev.*

Immunology 12, 433-55, и приведенных там ссылок.

ПЦР проводят с использованием ДНК-матрицы (по меньшей мере 1 фг, более эффективно 1-1000 нг) и по меньшей мере 25 пмоль олигонуклеотидных праймеров; может быть выгодным использование большего количества праймера, когда пул праймера сильно гетерогенен, поскольку каждая последовательность представлена лишь малой фракцией молекул пула, и количества становятся лимитирующими на более поздних циклах амплификации. Типичная реакционная смесь включает: 2 мкл ДНК, 25 пмоль олигонуклеотидного праймера, 2,5 мкл 10X буфера 1 для ПЦР (Perkin-Elmer, Foster City, CA), 0,4 мкл 1,25 мкМ дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дНТФ), 0,15 мкл (или 2,5 единицы) Taq-ДНК-полимеразы (Perkin Elmer, Foster City, CA) и деионизированную воду до общего объема 25 мкл. Накладывают минеральное масло и проводят ПЦР с использованием программируемого термального циклера. Длительность и температуру каждой стадии цикла ПЦР, также как число циклов, адаптируют в соответствии с действующими требованиями строгости. Температуру и время отжига определяют как по предполагаемой эффективности, с которой праймер гибридизуется с матрицей, так и по допустимой степени ошибочного спаривания; очевидно, если молекулы нуклеиновых кислот одновременно амплифицируют и мутагенизируют, ошибочное спаривание обязательно, по меньшей мере, в первом раунде синтеза. Способность оптимизировать строгость условий отжига праймера входит в знания специалиста в данной области техники. Применяют температуру отжига от 30 до 72°C. Начальная денатурация матричных молекул обычно происходит при от 92 до 99°C в течение 4 мин, с последующими 20-40 циклами, состоящими из денатурации (94-99°C в течение от 15 с до 1 мин), отжига (температуру определяют, как обсуждено выше, 1-2 мин) и удлинения (72°C в течение 1-5 мин, в зависимости от длины амплифицируемого продукта). Конечное удлинение в большинстве случаев происходит в течение 4 мин при 72°C, и, возможно, с последующей неопределенной (0-24 ч) стадией при 4°C.

В. Комбинирование отдельных переменных доменов

После селекции домены, применимые в изобретении, могут быть комбинированы множеством способов, известных в данной области техники, включая ковалентные и нековалентные способы.

Предпочтительные способы включают применение полипептидных линкеров, как описано, например, в связи с молекулами scFv (Bird et al. (1988), Science 242:423-426). Обсуждение подходящих линкеров предоставлено в Bird et al. Science 242, 423-426; Hudson et al., Journal Immunol Methods 231 (1999), 177-189; Hudson et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85, 5879-5883. Линкеры предпочтительно являются гибкими, допускающими взаимодействие двух отдельных доменов. Один пример линкера представляет собой линкер $(Gly_4Ser)_n$, где n от 1 до 8, например 2, 3, 4, 5 или 7. Также могут быть использованы линкеры, применяемые в диателах, являющиеся менее гибкими (Holliger et al. (1993), Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90:6444-6448).

В одном воплощении используемый линкер не является шарнирной областью иммуноглобулина.

Переменные домены могут быть комбинированы с применением способов, отличных от линкеров. Например, использование дисульфидных связей, обеспеченных через естественные или сконструированные цистеиновые остатки, может быть применено для стабилизации димеров V_H-V_H , V_L-V_L или V_H-V_L (Reiter et al. (1994), Protein Eng. 7:697-704) или, посредством ремоделирования области контакта между переменными доменами, для улучшения "соответствия" и, таким образом, стабильности взаимодействия (Ridgeway et al. (1996), Protein Eng. 7:617-621; Zhu et al. (1997), Protein Science 6:781-788).

При необходимости могут быть применены другие методики соединения или стабилизации переменных доменов иммуноглобулинов и, в частности, доменов V_H антител.

Согласно настоящему изобретению лиганды с двойной специфичностью могут быть в "закрытых" конформациях в растворе. Закрытая конфигурация представляет собой такую конфигурацию, при которой два домена (например, V_H и V_L) присутствуют в объединенной форме, такой как объединенная пара V_H-V_L , образующая связывающую область антитела. Например, scFv может быть в закрытой конформации, в зависимости от расположения линкера, используемого для связывания доменов V_H и V_L . Если он достаточно гибок для объединения доменов или жестко удерживает их в объединенном состоянии, домены, вероятно, будут принимать закрытую конформацию.

Сходным образом, пары доменов V_H и пары доменов V_L могут существовать в закрытой конформации. В большинстве случаев это будет функцией закрытого объединения доменов, как, например, посредством ригидного линкера, в молекуле лиганда. Лиганды в закрытой конформации будут неспособны связывать и молекулу, увеличивающую период полувыведения лиганда, и вторую молекулу-мишень. Таким образом, лиганд будет обычно связывать вторую молекулу-мишень только при диссоциации от молекулы, увеличивающей период полувыведения лиганда.

Более того, конструирование димеров V_H/V_H , V_L/V_L или V_H/V_L без линкеров обеспечивает конкуренцию между доменами.

Более того, лиганды по изобретению могут быть в открытой конформации. В такой конформации лиганды будут способны одновременно связывать и молекулу, увеличивающую период полувыведения лиганда, и вторую молекулу-мишень. Обычно переменные домены в открытой конформации (в случае

пар V_H-V_L) удерживаются достаточно далеко друг от друга так, что они не взаимодействуют с образованием связывающей области антитела и не конкурируют за связывание их соответствующих эпитопов. В случае димеров V_H/V_H или V_L/V_L нет ригидных линкеров, которые удерживали бы домены друг рядом с другом. Естественно, такие пары доменов не будут конкурировать за связывание антигена или образовывать связывающую область антитела.

Fab-фрагменты и целые антитела могут существовать, в первую очередь, в закрытой конформации, хотя следует понимать, что открытые и закрытые лиганды с двойной специфичностью, вероятно, существуют во множестве равновесных состояний при различных условиях. Связывание лиганда с мишенью, вероятно, смещает баланс равновесия в сторону открытой конфигурации. Таким образом, определенные лиганды по изобретению могут существовать в двух конформациях в растворе, одна из которых (открытая форма) может связывать два антигена или эпитопа независимо, в то время как альтернативная конформация (закрытая форма) может связывать только один антиген или эпитоп; антигены или эпитопы, таким образом, конкурируют за связывание лиганда в этой конформации.

Хотя открытая форма лиганда с двойной специфичностью может, таким образом, существовать в равновесии с закрытой формой в растворе, предполагают, что равновесие будет способствовать закрытой форме; более того, открытая форма может быть переведена связыванием мишени в закрытую конформацию. Таким образом, предпочтительно определенные лиганды с двойной специфичностью по изобретению присутствуют в равновесии между двумя (открытой и закрытой) конформациями.

Лиганды с двойной специфичностью по изобретению могут быть модифицированы для того, чтобы способствовать открытой или закрытой конформации. Например, стабилизация взаимодействий V_H-V_L дисульфидными связями стабилизирует закрытую конформацию. Более того, линкеры, используемые для соединения доменов, включая пары доменов V_H и доменов V_L , могут быть конструированы таким образом, чтобы способствовать открытой форме; например, линкеры могут стерически препятствовать объединению доменов, как, например, включением крупных аминокислотных остатков в подходящие положения или разработкой подходящей ригидной структуры, которая будет сохранять домены физически отдаленными друг от друга.

Г. Описание лиганда с двойной специфичностью

Связывание лиганда с двойной специфичностью с его специфичными антигенами или эпитопами можно исследовать способами, которые будут знакомы специалистам в данной области техники и включают ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ). В предпочтительном воплощении изобретения связывание исследуют с применением моноклонального фагового ELISA.

Фаговый ELISA может быть проведен в соответствии с любым подходящим способом, типичный протокол изложен ниже.

Популяции фага, полученные на каждом раунде селекции, могут быть подвергнуты скринингу на связывание с выбранным антигеном или эпитопом посредством ELISA для идентификации "поликлональных" фаговых антител. Фаг из отдельных инфицированных бактериальных колоний из этих популяций может затем быть подвергнут скринингу посредством ELISA для идентификации "моноклональных" фаговых антител. Также желательно провести скрининг растворимых фрагментов антител на связывание с антигеном или эпитопом, и это также может быть проведено посредством ELISA с использованием реагентов, например, против C- или N-концевой метки (см., например, Winter et al. (1994), *Ann. Rev. Immunology* 12, 433-55 и ссылки, приведенные там).

Разнообразие селективируемых фаговых моноклональных антител может также быть оценено геле-электрофорезом продуктов ПЦР (Marks et al. 1991, выше; Nissim et al. 1994 выше), зондированием (Tomlinson et al. (1992), *J. Mol. Biol.* 227, 776) или секвенированием векторной ДНК.

Д. Структура лигандов с двойной специфичностью

Как описано выше, антитело определяют здесь как антитело (например, IgG, IgM, IgA, IgA, IgE) или фрагмент (Fab, Fv, связанный дисульфидными связями Fv, scFv, диатело), содержащий по меньшей мере один переменный домен тяжелой и легкой цепи, по меньшей мере два переменных домена тяжелой цепи или по меньшей мере два переменных домена легкой цепи. Оно может, по меньшей мере, частично иметь происхождение от любого вида, естественным образом образующего антитело, либо может быть создано рекомбинантной ДНК технологией; либо выделено из сыворотки, В-клеток, гибридом, трансфектом, дрожжей или бактерий.

В предпочтительном воплощении изобретения лиганд с двойной специфичностью содержит по меньшей мере один отдельный переменный домен тяжелой цепи антитела и один отдельный переменный домен легкой цепи антитела или два отдельных переменных домена тяжелой или легкой цепи. Например, лиганд может содержать пару V_H/V_L , пару доменов V_H или пару доменов V_L .

Первый и второй переменные домены такого лиганда могут быть расположены на одной полипептидной цепи. Альтернативно, они могут быть расположены на разных полипептидных цепях. В случае, когда они расположены на одной полипептидной цепи, они могут быть связаны линкером, предпочтительно представляющим собой пептидную последовательность, как описано выше.

Первый и второй переменные домены могут быть объединены ковалентно или нековалентно. В случае, когда они объединены ковалентно, ковалентные связи могут представлять собой дисульфидные связи.

В случае если переменные домены выбраны из репертуаров V-генов, селективируемых, например, с применением технологии фагового дисплея, как описано здесь, эти переменные домены содержат универсальную каркасную область, таким образом, что они могут быть распознаны определенным лигандом общего типа, как определено здесь. Применение универсальных каркасных областей, лигандов общего типа и т.п. описано в WO 99/20749.

Там, где используют репертуары V-генов, разнообразие полипептидной последовательности предпочтительно локализовано в структурных петлях переменных доменов. Полипептидные последовательности каждого домена могут быть изменены перетасовкой ДНК или мутацией с целью усиления взаимодействия каждого переменного домена с его комплементарной парой. ДНК-перестановки известны в данной области техники и о них сообщают, например, Stemmer, 1994, Nature 370: 389-391 и патент США № 6297053, оба из которых включены сюда посредством ссылки. Другие способы мутагенеза хорошо известны специалистам в данной области техники.

В предпочтительном воплощении изобретения "лиганд с двойной специфичностью" представляет собой одноцепочечный Fv-фрагмент. В альтернативном воплощении изобретения "лиганд с двойной специфичностью" состоит из Fab-формата.

В другом аспекте согласно настоящему изобретению предложена нуклеиновая кислота, кодирующая, по меньшей мере, "лиганд с двойной специфичностью", как определено здесь.

Специалисту в данной области техники будет ясно, что в зависимости от аспекта изобретения оба антигена или эпитопа могут связывать одну и ту же молекулу антитела одновременно. Альтернативно, они могут конкурировать за связывание одной и той же молекулы антитела. Например, там, где оба эпитопа связаны одновременно, оба переменных домена лиганда с двойной специфичностью способны независимо связывать их эпитопы-мишени. Там, где домены конкурируют, один переменный домен способен связывать свою мишень, но не в то же самое время, когда другой переменный домен связывает свою когнатную мишень; или первый переменный домен способен связывать свою мишень, но не в то же самое время, когда второй переменный домен связывает свою когнатную мишень.

Переменные домены могут иметь происхождение от антител, направленных против антигенов-мишеней или эпитопов-мишеней. Альтернативно, они могут иметь происхождение от репертуара отдельных доменов антител, как, например, экспрессированных на поверхности нитчатого бактериофага. Селекцию можно проводить, как описано ниже.

В большинстве случаев молекулы нуклеиновых кислот и векторные конструкции, необходимые для осуществления настоящего изобретения, могут быть сконструированы и ими можно манипулировать, как изложено в стандартных лабораторных руководствах, таких как Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, USA.

Манипулирование нуклеиновыми кислотами, полезными в настоящем изобретении, обычно проводят в рекомбинантных векторах.

Таким образом, в другом аспекте согласно настоящему изобретению предложен вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую, по меньшей мере, "лиганд с двойной специфичностью", как определено здесь.

При использовании здесь, вектор относится к дискретному элементу, используемому для введения гетерологичной ДНК в клетки для ее экспрессии и/или репликации. Способы селективирования или конструирования и впоследствии применения таких векторов хорошо известны специалисту в данной области техники. В свободном доступе находятся множество векторов, включая бактериальные плазмиды, бактериофаг, искусственные хромосомы и эписомные векторы. Такие векторы могут быть использованы для простого клонирования и мутагенеза; альтернативно, используют вектор экспрессии гена. Вектор, применимый по изобретению, может быть селективирован для приведения в соответствие последовательности желаемого размера, кодирующей полипептид, обычно от 0,25 тысяч пар оснований (т.п.о.) до 40 т.п.о. или более в длину. Подходящую клетку-хозяина трансформируют с использованием вектора после манипуляций клонирования *in vitro*. Каждый вектор содержит различные функциональные компоненты, которые в большинстве случаев включают сайт клонирования (или "полилинкерный" сайт), репликатор и по меньшей мере один селективируемый маркерный ген. Если заданный вектор представляет собой вектор экспрессии, он дополнительно обладает одним или более из следующего: энхансерным элементом, промотором, последовательностями терминации транскрипции и сигнальными последовательностями, каждая из которых расположена поблизости от сайта клонирования, таким образом, что они функционально связаны с геном, кодирующим лиганд по изобретению.

Как векторы для клонирования, так и векторы экспрессии в большинстве случаев содержат последовательности нуклеиновых кислот, делающие возможной репликацию вектора в одной или более выбранных клетках-хозяевах. Обычно в векторах для клонирования эта последовательность представляет собой таковую, делающую возможной репликацию вектора независимо от хромосомной ДНК хозяина, и включает репликаторы или автономно реплицируемые последовательности. Такие последовательности хорошо известны для множества бактерий, дрожжей и вирусов. Репликатор из плазмиды pBR322 является подходящим для большинства грамотрицательных бактерий, репликатор 2-мкм плазмиды является подходящей для дрожжей, и различные вирусные репликаторы (например, вируса обезьян 40

(SV 40), аденовирусные) полезны для векторов для клонирования в клетках млекопитающих. В большинстве случаев репликатор не требуется для векторов экспрессии млекопитающих, если их не используют в клетках млекопитающих, способных реплицировать высокие уровни ДНК, таких как клетки COS.

Преимущественно вектор для клонирования или вектор экспрессии может содержать селективируемый ген, также называемый селективируемым маркером. Этот ген кодирует белок, необходимый для выживания или роста трансформированных клеток-хозяев, выращиваемых на селективной культуральной среде. Клетки-хозяева, не трансформированные вектором, содержащим селективируемый ген, следовательно, не будут выживать на культуральной среде. Типичные селективируемые гены кодируют белки, придающие устойчивость к антибиотикам и другим токсинам, например ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, ауксотрофные недостаточности системы комплемента, или возмещающие жизненно необходимые питательные вещества, не доступные в питательной среде.

Поскольку репликацию векторов, кодирующих лиганд по настоящему изобретению, наиболее удобно проводить в *E.coli*, применяют *E.coli*-селективируемый маркер, например, ген β -лактамазы, придающий устойчивость к антибиотику ампициллину. Они могут быть получены из плазмид *E.coli*, как, например, pBR322 или плазида pUC, такая как pUC18 или pUC19.

Векторы экспрессии обычно содержат промотор, распознаваемый организмом-хозяином и функционально связанный с интересующей кодирующей последовательностью. Такой промотор может быть индуцибельным или конститутивным. Термин "функционально связанный" относится к контактному положению, где описываемые компоненты находятся во взаимоотношениях, допускающих их функционирование предполагаемым для них образом. Контрольная последовательность, "функционально связанная" с кодирующей последовательностью, лигирована таким образом, что экспрессии кодирующей последовательности достигают в условиях, совместимых с контрольными последовательностями.

Промоторы, подходящие для использования с прокариотическими хозяевами, включают, например, промоторные системы β -лактамазы и лактозы, промоторную систему щелочной фосфатазы, триптофановую (*trp*) промоторную систему и гибридные промоторы, такие как промотор *tac*. Промоторы для использования в бактериальных системах будут также в большинстве случаев содержать последовательность Шайна-Далгарно, функционально связанную с кодирующей последовательностью.

Предпочтительные векторы представляют собой векторы экспрессии, делающие возможной экспрессию нуклеотидной последовательности, соответствующей члену библиотеки полипептидов. Таким образом, селекция с использованием первого и/или второго антигена или эпитопа может быть проведена отдельным размножением и экспрессией одного клона, экспрессирующего член полипептидной библиотеки, или применением любой селекционной дисплейной системы. Как описано выше, предпочтительная селекционная дисплейная система представляет собой бактериофаговый дисплей. Таким образом, могут быть использованы фаговые или фагмидные векторы, например, pT1 или pT2. Лидерные последовательности, применимые в изобретении, включают *relB*, *stII*, *ompA*, *phoA*, *bla* и *relA*. Один пример представляет собой фагмидные векторы, имеющие репликатор *E.coli* (для двупочечной репликации) и также фаговый репликатор (для получения одноцепочечной ДНК). Манипуляция такими векторами и их экспрессия хорошо известны в данной области техники (Hoogenboom and Winter (1992), выше; Nissim et al. (1994), выше). Кратко, вектор содержит ген β -лактамазы для придания селективности фагмиде и промотор *lac* ближе к 5'-концу касетты экспрессии, состоящей (от N- к C-концу) из лидерной последовательности *relB* (направляющей экспрессируемый полипептид в периплазматическое пространство), множественного сайта клонирования (для клонирования нуклеотидной версии члена библиотеки), возможно, одной или более пептидной метки (для выявления), возможно, одного или более стоп-кодона TAG и фагового белка рIII. 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 проходить репликацию, как плазида, без экспрессии, продуцировать лишь большие количества члена библиотеки полипептидов самого по себе или продуцировать фаг, часть которого содержит по меньшей мере одну копию слитого белка полипептид-рIII на своей поверхности.

В конструировании векторов, кодирующих лиганды по изобретению, применяют обычные методики лигирования. Выделенные векторы или фрагменты ДНК расщепляют, адаптируют и лигируют заново в форме, желаемой для образования требуемого вектора. Если желательно, известным образом может быть проведен анализ для подтверждения присутствия соответствующих последовательностей в конструированном векторе. Подходящие способы конструирования векторов экспрессии, получения *in vitro* транскриптов, введения ДНК в клетки-хозяева и проведения анализов для оценки экспрессии и функции известны специалистам в данной области техники. Присутствие последовательности гена в образце выявляют или его амплификацию и/или экспрессию оценивают количественно обычными способами, такими как саузерн- или нозерн-анализ, вестерн-блоттинг, дот-блоттинг ДНК, РНК или

белка, гибридизация *in situ*, иммуноцитохимия или анализ последовательности молекул нуклеиновых кислот или белков. Специалисты в данной области техники легко предусмотрят, как эти способы могут быть модифицированы, если желательно.

Структура мультиспецифичных лигандов с закрытой конформацией

Согласно одному аспекту второй формы настоящего изобретения два или более некомплементарных эпитопсвязывающих домена связаны таким образом, что они имеют закрытую конформацию, как определено здесь. Преимущественно они могут быть дополнительно присоединены к скелету, который может, в качестве альтернативы или в дополнение к линкеру, описанному здесь, способствовать образованию и/или поддержанию закрытой конформации эпитопсвязывающих областей по отношению друг к другу.

(I) Скелеты.

Скелеты могут быть основаны на молекулах иммуноглобулинов или могут быть от источника, не являющегося иммуноглобулином, как изложено выше. Предпочтительные иммуноглобулиновые скелеты, как определено здесь, включают любой один или более из выбранных из следующего: молекулы иммуноглобулина, содержащей, по меньшей мере, (1) домен антитела C_L (подкласса каппа или лямбда); или (2) домен C_{H1} тяжелой цепи антитела; молекулы иммуноглобулина, содержащей домены C_{H1} и C_{H2} тяжелой цепи антитела; молекулы иммуноглобулина, содержащей домены C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} тяжелой цепи антитела; или любого набора (2) в сочетании с доменом антитела C_L (подкласса каппа или лямбда). Также может быть включен домен шарнирной области. Такие комбинации доменов могут, например, имитировать природные антитела, такие как IgG или IgM, или их фрагменты, такие как молекулы Fv, scFv, Fab или F(ab')₂. Специалистам в данной области техники будет ясно, что этот список не является исчерпывающим.

(II) Белковые каркасы.

Каждый эпитопсвязывающий домен содержит белковый каркас и одну или более CDR, вовлеченные в специфичное взаимодействие домена с одним или более эпитопами. Преимущественно эпитопсвязывающий домен по настоящему изобретению содержит три CDR. Подходящие белковые каркасы включают любые из выбранных из группы, состоящей из следующего: каркасов на основе доменов иммуноглобулинов, каркасов на основе фибронектина, каркасов на основе аффител, каркасов на основе CTLA4, каркасов на основе шаперонов, как, например, GroE1, каркасов на основе липокалина и каркасов на основе бактериальных Fc-рецепторов SpA и SpD. Специалистам в данной области техники будет ясно, что этот список не является исчерпывающим.

Е. Каркасы для использования в конструировании лигандов с двойной специфичностью

1. Выбор конформации главной цепи.

Все члены суперсемейства иммуноглобулинов имеют сходную конформацию их полипептидной цепи. Например, несмотря на то что антитела сильно отличаются в отношении их первичной последовательности, сравнением последовательностей и кристаллографических структур было выявлено, что, вопреки ожиданиям, пять из шести антигенсвязывающих петель антител (H1, H2, L1, L2, L3) принимают ограниченное число конформации главной цепи или канонических структур (Chothia и Lesk (1987), J. Mol. Biol, 196: 901; Chothia et al. (1989), Nature, 342: 877). Анализ длин петель и ключевых остатков сделал, таким образом, возможным предсказание конформации главной цепи H1, H2, L1, L2 и L3, обнаруженных в большинстве человеческих антител (Chothia et al. (1992), J. Mol. Biol, 227: 799; Tomlinson et al. (1995), EMBO J., 14: 4628; Williams et al. (1996), J. Mol. Biol, 264: 220). Несмотря на то что область H3 намного более разнообразна в отношении последовательности, длины и структуры (ввиду использования D-сегментов), она также формирует ограниченное число конформации главной цепи для коротких длин петель, которые зависят от длины и присутствия определенных остатков или типов остатка в ключевых положениях в петле и каркасной области антитела (Martin et al. (1996), J. Mol. Biol, 263: 800; Shirai et al. (1996), FEBS Letters, 399: 1).

Лиганды с двойной специфичностью по настоящему изобретению преимущественно состоят из библиотек доменов, таких как библиотеки доменов V_H и/или библиотеки доменов V_L . Более того, лиганды с двойной специфичностью по изобретению могут сами по себе быть представлены в форме библиотек. В одном аспекте настоящего изобретения разработаны библиотеки лигандов с двойной специфичностью и/или доменов, в которых длины определенных петель и ключевые остатки были выбраны для подтверждения того, что конформация главной цепи членов известна. Преимущественно они представляют собой реально существующие конформации молекул суперсемейства иммуноглобулинов, обнаруженных в природе, для сведения к минимуму шансов, что они нефункциональны, как обсуждено выше. Сегменты V-генов зародышевого типа служат в качестве одной подходящей основной каркасной области для конструирования библиотек антител или T-клеточных рецепторов; другие последовательности также применимы. Изменения могут происходить с низкой частотой таким образом, что малое число функциональных членов может обладать измененной конформацией главной цепи, что не влияет на ее функцию.

Теорию канонических структур также применяют для оценки числа различных конформации главной цепи, кодируемых лигандами, для предсказания конформации главной цепи на основании

последовательностей лигандов и для выбора остатков для внесения разнообразия, которые не влияют на каноническую структуру. Известно, что в человеческом домене V_k петля L1 может принимать одну из четырех канонических структур, петля L2 имеет одну каноническую структуру и что 90% человеческих доменов V_k принимают одну из четырех или пяти канонических структур для петли L3 (Tomlinson et al. (1995), supra); таким образом, в домене V_k самом по себе различные канонические структуры могут сочетаться с образованием ряда различных конформаций главной цепи. При условии, что домен V_λ кодирует отличный ряд канонических структур для петель L1, L2 и L3 и что домены V_k и V_λ могут образовывать пару с любым доменом V_H , который может кодировать несколько канонических структур для петель H1 и H2, число комбинаций канонических структур, наблюдаемых для этих пяти петель, очень велико. Это предполагает, что формирование разнообразия в конформации главной цепи может быть необходимо для получения широкого диапазона специфичностей связывания. Тем не менее, конструированием библиотеки антител, основанной на одной известной конформации главной цепи, было обнаружено, вопреки ожиданиям, что разнообразие в конформации главной цепи не является необходимым для формирования достаточного разнообразия для нацеливания на практически все антигены. Даже более удивительно, нет необходимости, чтобы одна конформация главной цепи представляла собой консенсусную структуру, одна встречающаяся в природе конформация может быть использована в качестве основы для всей библиотеки. Таким образом, в предпочтительном аспекте лиганды с двойной специфичностью по изобретению обладают одной известной конформацией главной цепи.

Одна выбранная конформация главной цепи предпочтительно является обычной среди молекул суперсемейства иммуноглобулинов обсуждаемого типа. Конформация является обычной, если, как наблюдают, значительное число встречающихся в природе молекул принимают ее. Соответственно, в предпочтительном аспекте изобретения по отдельности принимают во внимание распространенность в природе различных конформации главной цепи для каждой связывающей петли домена иммуноглобулина и затем выбирают встречающийся в природе переменный домен, обладающий желаемой комбинацией конформации главной цепи для различных петель. Если таковые недоступны, может быть выбран ближайший эквивалент. Предпочтительно, что желаемую комбинацию конформации главной цепи для различных петель создают выбором сегментов генов зародышевого типа, кодирующих желаемые конформации главной цепи. Более предпочтительно, что выбранные сегменты генов зародышевого типа часто экспрессированы в природе, и наиболее предпочтительно, что из всех естественных сегментов генов зародышевого типа они экспрессируются чаще всего.

При разработке лигандов с двойной специфичностью или их библиотек встречаемость различных конформации главной цепи для каждой из шести антигенсвязывающих петель может быть рассмотрена отдельно. Для H1, H2, L1, L2 и L3 выбирают заданную конформацию, которую принимают от 20 до 100% антигенсвязывающих петель встречающихся в природе молекул. Типично, наблюдаемая распространённость составляет более 35% (т.е. от 35 до 100%) и, в идеальном случае, более 50% или даже более 65%. Поскольку подавляющее большинство петель H3 не имеет канонических структур, предпочтительно выбрать конформацию главной цепи, являющуюся обычной среди тех петель, в которых представлены канонические структуры. Для каждой из петель, следовательно, выбирают конформацию, наиболее часто наблюдаемую в природном репертуаре. В человеческих антителах наиболее распространенные канонические структуры (CS) для каждой петли представляют собой следующие: H1 - CS 1 (79% экспрессируемого репертуара), H2 - CS 3 (46%), L1 - CS 2 V_k (39%), L2 - CS 1 (100%), L3 - CS 1 V_k (36%) (при вычислениях предполагали соотношение $\kappa:\lambda$ 70:30, Hood et al. (1967), Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 48: 133). Для петель H3, имеющих канонические структуры, длина CDR3 (Kabat et al. (1991), Sequences of proteins of immunological interest, Министерство здравоохранения и социальных услуг США (US Department of Health and Human Services)) в семь остатков с ионной связью от остатка 94 к остатку 101, по-видимому, является наиболее распространенной. В библиотеке данных EMBL имеются последовательности по меньшей мере 16 человеческих антител с длиной H3 и ключевыми остатками, необходимыми для формирования этой конформации, и по меньшей мере две кристаллографические структуры в белковой базе данных, которые могут быть использованы в качестве основы для моделирования антител (2cgr и 1tet). Наиболее часто экспрессируемые сегменты генов зародышевого типа, кодирующие эту комбинацию канонических структур, представляют собой сегмент V_H 3-23 (DP-47), сегмент J_H JH4b, сегмент V_k O2/O12 (DPK9) и J_k сегмент J_{k1} . Сегменты V_H DP45 и DP38 также являются подходящими. Эти сегменты, следовательно, могут быть использованы в комбинации в качестве основы для конструирования библиотеки с желаемой одной конформацией главной цепи.

Альтернативно, вместо выбора одной конформации главной цепи на основании распространенности в природе различных конформации главной цепи отдельно для каждой из связывающих петель, распространенность в природе комбинаций конформации главной цепи используют в качестве основания для выбора одной конформации главной цепи. В случае антител, например, может быть определена распространенность в природе комбинаций канонических структур для любых двух, трех, четырех, пяти или для всех шести из антигенсвязывающих петель. Здесь

предпочтительно, что выбранная конформация является обычной для встречающихся в природе антител, и наиболее предпочтительно, что ее наблюдают наиболее часто в природном репертуаре. Таким образом, в человеческих антителах, например, когда рассматривают естественные комбинации пяти антигенсвязывающих петель, H1, H2, L1, L2 и L3, определяют наиболее распространенную комбинацию канонических структур и затем комбинируют ее с наиболее распространенной конформацией для петли H3, как основание для выбора одной конформации главной цепи.

2. Внесение разнообразия в каноническую последовательность.

После выбора нескольких известных конформации главной цепи или предпочтительно одной известной конформации главной цепи, можно конструировать лиганды с двойной специфичностью по изобретению или библиотеки для использования в изобретении изменением связывающей области молекулы с целью создания репертуара со структурным и/или функциональным разнообразием. Это означает, что варианты создают таким образом, что они обладают достаточным разнообразием в их структуре и/или в их функции таким образом, что они способны обеспечить ряд активностей.

Желаемое разнообразие обычно создают изменением выбранной молекулы в одном или более положениях. Положения, подлежащие изменению, могут быть избраны случайно или предпочтительно селективированы. Изменение может в таком случае быть достигнуто или рандомизацией, в течение которой резидентную аминокислоту заменяют любой аминокислотой или ее аналогом, природным или синтетическим, с образованием очень большого числа вариантов, или заменой резидентной аминокислоты одной или более аминокислотой из определенной подгруппы аминокислот с образованием более ограниченного числа вариантов.

Было сообщено о различных способах внесения такого разнообразия. Для введения случайных мутаций в гены, кодирующие молекулу, могут быть применены ошибочно-направленная ПЦР (Hawkins et al. (1992), *J. Mol. Biol.*, 226: 889), химический мутагенез (Deng et al. (1994), *J. Biol. Chem.*, 269: 9533) или бактериальные мутаторные штаммы (Low et al. (1996), *J. Mol. Biol.*, 260: 359). Способы мутирования выбранных положений также хорошо известны в данной области техники и включают использование некомплементарных олигонуклеотидов или вырожденных олигонуклеотидов с или без применения ПЦР. Например, несколько библиотек синтетических антител были созданы нацеливанием мутаций на антигенсвязывающие петли. Область H3 человеческого Fab, связывающего столбнячный анатоксин, была рандомизирована для создания ряда новых специфичностей связывания (Barbas et al. (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457). Рандомизированные или полурандомизированные области H3 и L3 были присоединены к сегментам V-генов зародышевого типа для создания обширных библиотек с немутированными каркасными областями (Hoogenboom & Winter (1992), *J. Mol. Biol.*, 227: 381; Barbas et al. (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457; Nissim et al. (1994), *EMBO J.*, 13: 692; Griffiths et al. (1994), *EMBO J.*, 13: 3245; De Kruijff et al. (1995), *J. Mol. Biol.*, 248: 97). Такая диверсификация была расширена для включения некоторых из или всех других антигенсвязывающих петель (Cramer et al. (1996), *Nature Med.*, 2: 100; Riechmann et al. (1995), *Bio/Technology*, 13: 475; Morphosys, WO 97/08320, supra).

Поскольку рандомизация петель имеет потенциал для создания приблизительно более чем 10^{15} структур только для H3 и похожего большого числа вариантов для других пяти петель, создание библиотеки, отражающей все возможные комбинации, неосуществимо с применением современной технологии трансформации или даже применением бесклеточных систем. Например, в одной из наиболее обширных библиотек, конструированных на настоящий момент, были созданы 6×10^{10} различных антител, что представляет собой лишь часть возможного разнообразия для библиотеки такого плана (Griffiths et al. (1994), supra).

В предпочтительном воплощении разнообразие вносят только в те остатки, которые непосредственно вовлечены в создание или модификацию желаемой функции молекулы. Для многих молекул функцией будет связывание мишени и, следовательно, разнообразие следует концентрировать в области связывания мишени, избегая в то же время изменения остатков, имеющих решающее значение для общей упаковки молекулы или для поддержания выбранной конформации главной цепи.

Внесение разнообразия в каноническую последовательность в применении к доменам антител

В случае лигандов с двойной специфичностью на основе антител связывающая область для мишени наиболее часто представляет собой антигенсвязывающую область. Таким образом, в особо предпочтительном аспекте согласно изобретению предложены библиотеки лигандов с двойной специфичностью на основе антител или библиотеки для сборки лигандов с двойной специфичностью на основе антител, в которых изменяют только те остатки, которые расположены в антигенсвязывающей области. Эти остатки чрезвычайно разнообразны в репертуаре человеческих антител, и известно, что они образуют контакты в комплексах антитело/антиген высокого разрешения. Например, в L2 известно, что положения 50 и 53 различаются во встречающихся в природе антителах, и замечено, что они образуют контакт с антигеном. В отличие от этого, обычным способом было бы внесение разнообразия во все остатки в соответствующем гипервариабельном участке (CDR1), как определено Kabat et al. (1991, supra), некоторые семь остатков по сравнению с двумя, в которые вносят разнообразие, в библиотеке для использования по изобретению. Это отражает значимое улучшение в отношении функционального

разнообразия, необходимого для создания ряда специфичностей связывания антигена.

В природе разнообразие антител является результатом двух процессов: соматической рекомбинации сегментов генов V, D и J зародышевого типа с образованием интактного первичного репертуара (так называемые гаметное разнообразие и множественность J-сегментов) и соматической сверхмутации полученных перестроенных V-генов. Анализ последовательностей человеческих антител показал, что разнообразие в первичном репертуаре сфокусировано в центре антигенсвязывающей области, в то время как соматическая сверхмутация распространяет разнообразие на области на периферии антигенсвязывающей области, высококонсервативной в первичном репертуаре (см. Tomlinson et al. (1996), *J. Mol. Biol.*, 256: 813). Эта комплементарность, возможно, эволюционировала как эффективная стратегия поиска пространства последовательностей, и, хотя, вероятно, она присуща только антителам, она может легко быть применена к другим полипептидным репертуарам. Изменяемые остатки представляют собой подгруппу остатков, формирующую область связывания для мишени. В различные (включая перекрывающиеся) подгруппы остатков в области связывания мишени разнообразие вносят на различных стадиях в течение селекции, если желательно.

В случае репертуара антител создают начальный "интактный" репертуар, где в некоторые, но не во все, остатки в антигенсвязывающей области внесено разнообразие. При использовании здесь в данном контексте термин "интактный" относится к молекулам антител, не имеющим predetermined мишени. Эти молекулы имеют сходство с молекулами, кодируемыми генами иммуноглобулинов индивида, не прошедшего иммунную диверсификацию, как в случае с плодами и новорожденными индивидами, иммунная система которых не была еще представлена широкому спектру антигенных стимулов. Этот репертуар затем подвергают селекции против ряда антигенов или эпитопов. Если необходимо, дополнительное разнообразие может затем быть внесено вне области, в которую внесено разнообразие в начальном репертуаре. Этот зрелый репертуар может быть подвергнут селекции для модифицированной функции, специфичности или аффинности.

Согласно изобретению предложены два различных интактных репертуара связывающих доменов для конструирования лигандов с двойной специфичностью, в которых изменены некоторые или все остатки антигенсвязывающей области. "Первичная" библиотека имитирует естественный первичный репертуар с разнообразием, ограниченными остатками в центре антигенсвязывающей области, различающимися в сегментах V-генов зародышевого типа (гаметное разнообразие) или диверсифицированными в течение процесса рекомбинации (множественность J-сегментов). Остатки, в которые внесено разнообразие, включают, предпочтительно без ограничения, H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H96, H97, H98, L50, L53, L91, L92, L93, L94 и L96. В "соматической" библиотеке разнообразие ограничено остатками, в которые внесено разнообразие в течение процесса рекомбинации (множественностью J-сегментов), или сильно мутированными соматически. Остатки, в которые внесено разнообразие, включают, предпочтительно без ограничения, H31, H33, H35, H95, H96, H97, H98, L30, L31, L32, L34 и L96. Известно, что все остатки, перечисленные выше как подходящие для внесения разнообразия в этих библиотеках, образуют контакты в одном или более комплексах антитело-антиген. Поскольку в обеих библиотеках изменены не все из остатков антигенсвязывающей области, дополнительное разнообразие вносят в течение селекции изменением остальных остатков, если желательно так сделать. Специалисту в данной области техники будет ясно, что любая подгруппа любых из этих остатков (или дополнительных остатков, которые содержат антигенсвязывающий сайт) может быть использована для начального и/или последующего внесения разнообразия в антигенсвязывающую область.

В конструировании библиотек для использования в изобретении внесение разнообразия в выбранные положения обычно осуществляют на уровне нуклеиновой кислоты изменением кодирующей последовательности, задающей последовательность полипептида, таким образом, что несколько возможных аминокислот (все 20 или их подгруппа) могут быть введены в это положение. С применением номенклатуры Международного союза теоретической и прикладной химии (IUPAC) наиболее изменчивый кодон представляет собой NNK, кодирующий все аминокислоты, также как стоп-кодон TAG. Кодон NNK предпочтительно используют с целью внесения необходимого разнообразия. Другие кодоны, которыми достигают такой же цели, также полезны, включая кодон NNN, приводящий к образованию дополнительных стоп-кодонов TGA и TAA.

Свойство разнообразия боковых цепей в антигенсвязывающей области человеческих антител представляет собой резко выраженную склонность, благоприятствующую определенным аминокислотным остаткам. Если суммировать аминокислотный состав десяти наиболее разнообразных положений в каждой из областей V_H, V_K и V_L, более чем 76% разнообразия боковых цепей исходит от всего семи различных остатков, представляющих собой серин (24%), тирозин (14%), аспарагин (11%), глицин (9%), аланин (7%), аспарат (6%) и треонин (6%). Эта склонность к гидрофильным остаткам и малым остаткам, которые могут обеспечить гибкость главной цепи, возможно, отражает эволюцию поверхностей, предрасположенных к связыванию широкого спектра антигенов или эпитопов, и может помочь в объяснении обязательной разнородности антител первичного репертуара.

Поскольку предпочтительно имитировать это распределение аминокислот, распределение

аминокислот в положениях, подлежащих изменению, предпочтительно имитирует наблюдаемое в антигенсвязывающей области антител. Такая склонность при замещении аминокислот, допускающая селекцию определенных полипептидов (не только полипептидов антител) против ряда антигенно-мишеней, легко применима к любому полипептидному репертуару. Существуют множество способов изменения распределения аминокислот в положении, подлежащем изменению (включая применение тринуклеотидного мутагенеза, см. WO 97/08320), из которых предпочтительным способом, ввиду простоты синтеза, является применение обычных вырожденных кодонов. Сравнением аминокислотного профиля, кодируемого всеми комбинациями вырожденных кодонов (с первичной, вторичной, третичной и четвертичной вырожденностью в равных отношениях в каждом положении), с использованием природных аминокислот можно вычислить наиболее репрезентативный кодон. Кодоны (AGT)(AGC)T, (AGT)(AGC)C и (AGT)(AGC)(CT), т.е. DVT, DVC и DVY соответственно, с применением номенклатуры IUPAC, являются ближайшими к желаемому аминокислотному профилю: они кодируют 22% серина и 11% тирозина, аспарагина, глицина, аланина, аспартата, треонина и цистеина. Таким образом, предпочтительно библиотеки конструируют с использованием любого из кодонов DVT, DVC или DVY в каждом из положений, в которых вносят разнообразие.

Ж. Антигены, способные увеличивать период полувыведения лиганда

Лиганды с двойной специфичностью по изобретению, в одной его форме, способны связывать одну или более молекулы, которые могут увеличивать период полувыведения лиганда *in vivo*. Обычно такие молекулы представляют собой полипептиды, встречающиеся в природе *in vivo* и препятствующие деградации или удалению эндогенными механизмами, удаляющими нежелательные вещества из организма. Например, молекула, увеличивающая период полувыведения в организме, может быть выбрана из следующего.

Белки внеклеточного матрикса; например, коллагены, ламинины, интегрин и фибронектин. Коллагены являются основными белками внеклеточного матрикса. В настоящее время известно около 15 типов молекул коллагена, обнаруженных в различных частях организма, например, коллаген I типа (составляющий 90% коллагена в организме), обнаруженный в кости, коже, сухожилии, связках, роговице, внутренних органах, или коллаген II типа, обнаруженный в хряще, межпозвоночном диске, хорде и стекловидном теле глаза.

Белки, обнаруженные в крови, включая белки плазмы, такие как фибрин, α -2-макроглобулин, сывороточный альбумин, фибриноген А, фибриноген В, сывороточный амилоидный белок А, гаптоглобин, профилин, убиквитин, утероглобулин и β -2-микроглобулин.

Ферменты и ингибиторы, такие как плазминоген, лизоцим, цистатин С, альфа-1-антитрипсин и ингибитор трипсина поджелудочной железы. Плазминоген является неактивным предшественником трипсиноподобной сериновой протеазы плазмينا. В норме его обнаруживают циркулирующим в кровотоке. При активации плазминогена и превращении его в плазмин происходит развертывание мощного ферментативного домена, растворяющего нити фибриногена, удерживающие клетки крови в кровяном сгустке. Это называют фибринолизом.

Белки иммунной системы, такие как IgE, IgG, IgM.

Транспортные белки, такие как ретинолсвязывающий белок, α -1-микроглобулин.

Дефензины, такие как бета-дефензин-1, нейтрофильные дефензины-1, -2 и -3.

Белки, обнаруженные в гематоэнцефалическом барьере или в нервных тканях, такие как рецептор меланокортина, миелин, переносчик аскорбата.

Специфичные в отношении рецептора трансферина слитые белки лиганда-нейрофармацевтического агента (см. US 5977307).

Рецептор эндотелиальных клеток капилляров головного мозга, трансферрин, рецептор трансферрина, инсулин, рецептор инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1), рецептор инсулиноподобного фактора роста-2 (IGF-2), рецептор инсулина.

Белки, локализованные в почке, такие как полицистин, коллаген IV типа, переносчик органических анионов K1, антиген Хеймана.

Белки, локализованные в печени, например алкогольдегидрогеназа, G250.

X Фактор свертывания крови.

α 1-Антитрипсин.

Ядерный фактор гепатоцитов-1 α (HNF-1 α).

Белки, локализованные в легком, такие как секреторный компонент (связывает IgA).

Белки, локализованные в сердце, например HSP27. Он ассоциирован с дилатационной кардиомиопатией.

Белки, локализованные в коже, например кератин.

Белки, специфичные для костей, такие как морфогенетические белки кости (BMP), представляющие собой подгруппу суперсемейства трансформирующего фактора роста- β , демонстрирующие остеогенную активность. Примеры включают BMP-2, -4, -5, -6, -7 (также называемый остеогенным белком-1 (OP-1)) и -8 (OP-2).

Белки, специфичные для опухолей, включая человеческий антиген трофобласта, рецептор герцептина, рецептор эстрогенов, катепсины, например катепсин В (обнаруженный в печени и селезенке).

Белки, специфичные для заболеваний, такие как 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 рецептора TNF, экспрессируемый на активированных Т-клетках и являющийся единственной известной костимуляторной Т-клеточной молекулой, специфично активируемый в клетках, продуцирующих вирус Т-клеточного лейкоза взрослых типа 1 (HTLV-1)). См. Immunol. 165 (1):263-70. Металлопротеиназы (ассоциированные с артритом/злокачественным новообразованиями), включая CG6512 дрозоды, человеческий паралимпин, человеческий FtsH, человеческий AFG3L2, мышинный ftsH; и ангиогенные факторы роста, включая кислый фактор роста фибробластов (FGF-1), основной фактор роста фибробластов (FGF-2), сосудистый эндотелиальный фактор роста/фактор сосудистой проницаемости (VEGF/VPF), трансформирующий фактор роста- α (TGF- α), фактор некроза опухоли-альфа (TNF- α), ангиогенин, интерлейкин-3 (IL-3), интерлейкин-8 (IL-8), тромбоцитарный фактор роста эндотелия (PD-ECGF), плацентарный фактор роста (PIGF), мидкайн, тромбоцитарный фактор роста-BB (PDGF), фракталин.

Белки стрессов (белки теплового шока). Белки теплового шока (HSP) обычно обнаруживают внутриклеточно. Если их обнаруживают внеклеточно, это является индикатором того, что клетка погибла или потеряла свое содержимое. Эта незапрограммированная гибель клетки (некроз) происходит только в результате травмы, заболевания или повреждения, и, таким образом, *in vivo* внеклеточные HSP запускают ответ со стороны иммунной системы, который будет бороться с инфекцией и заболеванием. Лиганд с двойной специфичностью, связывающий внеклеточные HSP, может быть локализован в месте заболевания.

Белки, вовлеченные в Fc-транспорт.

Рецептор Брамбелла (Brambell) (также известный как FcRB).

Этот Fc-рецептор имеет две функции, обе из которых потенциально применимы для доставки.

Функции представляют собой:

(1) транспорт IgG от матери к плоду через плаценту;

(2) защиту IgG от деградации, тем самым продление периода полувыведения IgG из сыворотки.

Полагают, что рецептор рециклирует IgG из эндосом.

См. Holliger et al., Nat Biotechnol, 1997, Jul; 15(7):632-6.

Лиганды по изобретению могут быть разработаны специфичными в отношении вышеуказанных мишеней без необходимости какого-либо увеличения периода полувыведения *in vivo*. Например, лиганды по изобретению могут быть специфичны в отношении мишеней, выбранных из описанных выше, являющихся тканеспецифичными, делая таким образом возможным тканеспецифичное направленное воздействие лиганда с двойной специфичностью или мономера dAb, связывающего тканеспецифичную терапевтически значимую мишень, независимо от какого-либо увеличения периода полувыведения, хотя это может быть результатом. Более того, там, где лиганд или мономер dAb оказывает направленное воздействие на почку или печень, это может перенаправлять лиганд или мономер dAb на альтернативный путь клиренса *in vivo* (например, лиганд может быть переправлен с печеночного клиренса на почечный клиренс).

Как описано выше, лиганды, описанные здесь, содержащие отдельный вариабельный домен, как определено здесь, могут быть выбраны специфичными в отношении мишени и предпочтительно могут иметь дополнительное свойство увеличения периода полувыведения мишени *in vivo*, хотя это не является необходимым. Лиганд с двойной специфичностью может состоять из отдельного вариабельного домена тяжелой цепи антитела, имеющего специфичность связывания в отношении первого эпитопа или антигена, и также из отдельного вариабельного домена легкой цепи антитела, имеющего специфичность связывания в отношении второго эпитопа или антигена, где один или оба антигена могут представлять собой сывороточный альбумин, или один или оба эпитопа представляют собой эпитоп (эпитопы) сывороточного альбумина. В одном воплощении оба эпитопа сывороточного альбумина являются одинаковыми, в другом воплощении эпитопы сывороточного альбумина являются разными.

В дополнение к тем лигандам с двойной специфичностью, которые имеют свойство увеличения периода полувыведения мишени *in vivo*, здесь описаны другие структурные формы лигандов, имеющие или состоящие по меньшей мере из одного отдельного вариабельного домена, как определено здесь, имеющего свойство увеличения периода полувыведения лиганда, связывающего мишень, *in vivo*, например, связыванием сывороточного альбумина. Например, лиганд может состоять из или содержать мономер отдельного вариабельного домена, как определено здесь, связывающий сывороточный альбумин; или лиганд может быть в форме, содержащей несколько отдельных вариабельных доменов, как определено здесь, т.е. мультимера, где один или более из отдельных вариабельных доменов связывает сывороточный альбумин. Как мультимер, так и мономер, могут содержать другие объекты в дополнение к одному или более отдельному вариабельному домену (доменам), связывающим сывороточный альбумин, например, в форме слитого белка и/или конъюгата. Такой слитый белок

предпочтительно представляет собой одну полипептидную цепь и может содержать, например, два или более связанных отдельных переменных домена, как определено здесь; связанные отдельные переменные домены могут быть идентичными друг другу или могут отличаться друг от друга. Такие объекты включают, например, один или более дополнительных переменных доменов, как определено здесь, имеющие специфичность в отношении антигена или эпитопа, отличного от сывороточного альбумина, и/или одно или более лекарственных средства, и/или один или более доменов, связывающие мишень, имеющие специфичность связывания в отношении антигена или эпитопа, отличного от сывороточного альбумина, и не являющиеся отдельными переменными доменами, как определено здесь. Такой мультимер может иметь несколько валентностей в соответствии с его отдельным переменным доменом (доменами), например моновалентным, дивалентным, тривалентным, тетравалентным. Такой мультимер может иметь форму структуры IgG или лиганда с двойной специфичностью, как определено здесь, а также других структур, таких как IgM, IgE, IgD или IgA, и/или их фрагментов, включая, без ограничения, такие фрагменты, как фрагменты scFv, Fab, Fab' и т.п. Лиганд может быть модифицирован, чтобы содержать дополнительные группировки, как, например, слитый белок или конъюгат.

Отдельный переменный домен тяжелой цепи антитела лиганда с двойной специфичностью или мономерного лиганда, или мультимерного лиганда, как описано здесь, может специфично связывать сывороточный альбумин и содержать аминокислотную последовательность отдельного переменного домена тяжелой цепи антитела. Такой отдельный переменный домен тяжелой цепи антитела может быть выбран, предпочтительно без ограничения, из одного из следующих доменов:

dAb7r20, dAb7r21, dAb7r22, dAb7r23, dAb7r24, dAb7r25, dAb7r26, dAb7r27,
dAb7r28, dAb7r29, dAb7r30, dAb7r31, dAb7r32, dAb7r33, dAb7h21, dAb7h22,
dAb7h23, Ab7h24, Ab7h25, Ab7h26, dAb7h27, dAb7h30 и dAb7h31,

или домена с аминокислотной последовательностью, по меньшей мере на 80% идентичной им, до 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% включительно идентичной им, и специфично связывающего сывороточный альбумин. Альтернативно, лиганд содержит отдельный переменный домен антитела, предпочтительно отдельный переменный домен тяжелой цепи антитела, конкурирующий за связывание сывороточного альбумина с одним из следующих доменов:

dAb7r20, dAb7r21, dAb7r22, dAb7r23, dAb7r24, dAb7r25, dAb7r26, dAb7r27,
dAb7r28, dAb7r29, dAb7r30, dAb7r31, dAb7r32, dAb7r33, dAb7h21, dAb7h22,
dAb7h23, Ab7h24, Ab7h25, Ab7h26, dAb7h27, dAb7h30 dAb7h31, 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,

или домена, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную им, до 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% включительно идентичную им, и специфично связывающего сывороточный альбумин. Альтернативно, лиганд содержит, в дополнение к отдельному переменному домену тяжелой цепи антитела, отдельный переменный домен легкой цепи антитела, который может специфично связывать сывороточный альбумин и содержать аминокислотную последовательность отдельного переменного домена легкой цепи антитела. Такой отдельный переменный домен легкой цепи антитела может быть выбран, предпочтительно без ограничения, из одного из следующих доменов:

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,

или домена с аминокислотной последовательностью, по меньшей мере на 80% идентичной им, до 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% включительно идентичной им, и специфично связывающего сывороточный альбумин. Альтернативно, лиганд содержит отдельный переменный домен антитела, предпочтительно отдельный переменный домен легкой цепи антитела, конкурирующий за связывание сывороточного альбумина с доменом, который может быть выбран, предпочтительно без ограничения, из одного из следующих доменов:

dAb7r20, dAb7r21, dAb7r22, dAb7r23, dAb7r24, dAb7r25, dAb7r26, dAb7r27,
 dAb7r28, dAb7r29, dAb7r30, dAb7r31, dAb7r32, dAb7r33, dAb7h21, dAb7h22,
 dAb7h23, Ab7h24, Ab7h25, Ab7h26, dAb7h27, dAb7h30 dAb7h31, 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,

или домена, имеющего аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную им, до 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% включительно идентичную им, и имеющего специфичность связывания в отношении сывороточного альбумина. В одном воплощении лиганд может представлять собой иммуноглобулин IgG, имеющий любую комбинацию из одного или двух лигандов с двойной специфичностью, приведенных выше. В одном воплощении лиганд может содержать один или более мономеров отдельных переменных доменов, перечисленных выше, где, если лиганд содержит более чем один из этих отдельных переменных доменов, отдельные переменные домены могут быть идентичны друг другу или не идентичны друг другу.

В одном воплощении лиганд может представлять собой лиганд с двойной специфичностью, имеющий первый отдельный переменный домен иммуноглобулина, имеющий первую специфичность связывания антигена или эпитопа, и второй отдельный переменный домен иммуноглобулина, имеющий вторую специфичность связывания антигена или эпитопа, где первый и второй отдельные переменные домены иммуноглобулина представляют собой отдельные переменные домены тяжелой цепи антитела и где один или оба из первого и второго отдельных переменных доменов тяжелой цепи антитела специфично связывают сывороточный альбумин и имеют аминокислотную последовательность отдельного переменного домена тяжелой цепи антитела, который может быть выбран, предпочтительно без ограничения, из одного из следующих отдельных переменных доменов тяжелой цепи антитела:

dAb7r20, dAb7r21, dAb7r22, dAb7r23, dAb7r24, dAb7r25, dAb7r26, dAb7r27,
 dAb7r28, dAb7r29, dAb7r30, dAb7r31, dAb7r32, dAb7r33, dAb7h21, dAb7h22,
 dAb7h23, Ab7h24, Ab7h25, Ab7h26, dAb7h27, dAb7h30 и dAb7h31,

или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную им, до 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% включительно идентичную им. Одно воплощение такого лиганда представляет собой лиганд с двойной специфичностью, имеющий первый отдельный переменный домен иммуноглобулина, имеющий первую специфичность связывания антигена или эпитопа, и второй отдельный переменный домен иммуноглобулина, имеющий вторую специфичность связывания антигена или эпитопа, где первый и второй отдельные переменные домены иммуноглобулина представляют собой отдельные переменные домены тяжелой цепи антитела и где один или оба из первого и второго отдельных переменных доменов тяжелой цепи антитела специфично связывают сывороточный альбумин и конкурируют за связывание сывороточного альбумина с отдельным переменным доменом, имеющим аминокислотную последовательность отдельного переменного домена антитела, который может быть выбран, предпочтительно без ограничения, из одного из следующих отдельных переменных доменов антитела:

dAb7r20, dAb7r21, dAb7r22, dAb7r23, dAb7r24, dAb7r25, dAb7r26, dAb7r27,
 dAb7r28, dAb7r29, dAb7r30, dAb7r31, dAb7r32, dAb7r33, dAb7h21, dAb7h22,
 dAb7h23, Ab7h24, Ab7h25, Ab7h26, dAb7h27, dAb7h30 dAb7h31, 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,

или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную им или до 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% включительно идентичную им. В одном воплощении лиганд может представлять собой иммуноглобулин IgG, имеющий любую комбинацию из одного или двух лигандов с двойной специфичностью, приведенных выше. В одном воплощении лиганд может содержать один или более мономеров отдельных переменных доменов, перечисленных выше, где, если лиганд содержит более чем один из этих отдельных переменных доменов, отдельные переменные домены могут быть идентичны друг другу или не идентичны друг другу.

В одном воплощении лиганд с двойной специфичностью имеет первый отдельный переменный домен иммуноглобулина, имеющий первую специфичность связывания антигена или эпитопа, и второй отдельный переменный домен иммуноглобулина, имеющий вторую специфичность связывания антигена или эпитопа, где первый и второй отдельные переменные домены иммуноглобулина

представляют собой отдельные переменные домены легкой цепи антитела и один или оба из первого и второго отдельных переменных доменов легкой цепи антитела специфично связывают сывороточный альбумин и имеют аминокислотную последовательность отдельного переменного легкой тяжелой цепи антитела, который может быть выбран, предпочтительно без ограничения, из одного из следующих отдельных переменных доменов легкой цепи антитела:

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,

или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную им или до 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% включительно идентичную им.

В одном воплощении лиганд может представлять собой лиганд с двойной специфичностью, имеющий первый отдельный переменный домен иммуноглобулина, имеющий первую специфичность связывания антигена или эпитопа, и второй отдельный переменный домен иммуноглобулина, имеющий вторую специфичность связывания антигена или эпитопа, где первый и второй отдельные переменные домены иммуноглобулина представляют собой отдельные переменные домены легкой цепи антитела и один или оба из первого и второго отдельных переменных доменов легкой цепи антитела специфично связывают сывороточный альбумин и конкурируют за связывание сывороточного альбумина с отдельным переменным доменом легкой цепи антитела, имеющим аминокислотную последовательность отдельного переменного домена антитела, который может быть выбран, предпочтительно без ограничения, из одного из следующих отдельных переменных доменов антитела:

dAb7r20, dAb7r21, dAb7r22, dAb7r23, dAb7r24, dAb7r25, dAb7r26, dAb7r27, dAb7r28, dAb7r29, dAb7r30, dAb7r31, dAb7r32, dAb7r33, dAb7h21, dAb7h22, dAb7h23, dAb7h24, dAb7h25, dAb7h26, dAb7h27, dAb7h30, dAb7h31, 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,

или последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную им или до 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% включительно идентичную им.

Здесь описан лиганд, имеющий один или более отдельных переменных доменов тяжелой цепи антитела, где один или более отдельных переменных доменов тяжелой цепи антитела специфично связывает сывороточный альбумин и имеет аминокислотную последовательность отдельного переменного легкой тяжелой цепи антитела, выбранную, предпочтительно без ограничения, из последовательностей:

dAb8, dAb10, dAb36, dAb7r20, dAb7r21, dAb7r22, dAb7r23, dAb7r24, dAb7r25, dAb7r26, dAb7r27, dAb7r28, dAb7r29, dAb7r30, dAb7r31, dAb7r32, dAb7r33, dAb7h21, dAb7h22, dAb7h23, dAb7h24, dAb7h25, dAb7h26, dAb7h27, dAb7h30, dAb7h31

и последовательности, по меньшей мере на 80% идентичной им или до 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% включительно идентичной им.

Здесь описан лиганд, имеющий один или более отдельных переменных доменов тяжелой цепи антитела, где один или более отдельных переменных доменов тяжелой цепи антитела специфично связывает сывороточный альбумин и конкурирует за связывание сывороточного альбумина с отдельным переменным доменом антитела, имеющим аминокислотную последовательность отдельного переменного домена антитела, выбранную, предпочтительно без ограничения, из последовательностей одного из следующих:

dAb8, dAb10, dAb36, dAb7r20, dAb7r21, dAb7r22, dAb7r23, dAb7r24, dAb7r25, dAb7r26, dAb7r27, dAb7r28, dAb7r29, dAb7r30, dAb7r31, dAb7r32, dAb7r33, dAb7h21, dAb7h22, dAb7h23, dAb7h24, dAb7h25, dAb7h26, 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.

Здесь описан лиганд, имеющий отдельный вариабельный домен тяжелой цепи антитела, имеющий специфичность связывания в отношении первого антигена или его эпитопа, и отдельный вариабельный домен легкой цепи антитела, имеющий специфичность связывания в отношении второго антигена или его эпитопа, где один или оба из первого антигена и указанного второго антигена представляют собой сывороточный альбумин и где отдельный вариабельный домен тяжелой цепи антитела специфично связывает сывороточный альбумин и конкурирует за связывание сывороточного альбумина с отдельным вариабельным доменом антитела, имеющим аминокислотную последовательность отдельного вариабельного домена антитела, выбранного, предпочтительно без ограничения, из группы:

dAb8, dAb10, 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, dAb7p2,

и где отдельный вариабельный домен легкой цепи антитела специфично связывает сывороточный альбумин и имеет аминокислотную последовательность отдельного вариабельного домена легкой цепи антитела, выбранную, предпочтительно без ограничения, из последовательностей следующего:

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, drdAb7m12, 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,

и последовательности, по меньшей мере на 80% идентичной им или до 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% включительно идентичной им.

Здесь описан лиганд, имеющий отдельный вариабельный домен тяжелой цепи антитела, имеющий специфичность связывания в отношении первого антигена или его эпитопа, и отдельный вариабельный домен легкой цепи антитела, имеющий специфичность связывания в отношении второго антигена или его эпитопа, где один или оба из указанного первого антигена и указанного второго антигена представляют собой сывороточный альбумин и где отдельный вариабельный домен тяжелой цепи антитела специфично связывает сывороточный альбумин и имеет аминокислотную последовательность отдельного вариабельного домена тяжелой цепи антитела, выбранную, предпочтительно без ограничения, из группы:

dAb8, dAb10, dAb36, dAb7r20, dAb7r21, dAb7r22, dAb7r23, dAb7r24, dAb7r25, dAb7r26, dAb7r27, dAb7r28, dAb7r29, dAb7r30, dAb7r31, dAb7r32, dAb7r33, dAb7h21, dAb7h22, dAb7h23, Ab7h24, Ab7h25, Ab7h26, dAb7h27, dAb7h30, dAb7h31,

и последовательности, по меньшей мере на 80% идентичной им или до 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% включительно идентичной им, и где отдельный вариабельный домен легкой цепи антитела специфично связывает сывороточный альбумин и конкурирует за связывание сывороточного альбумина с отдельным вариабельным доменом антитела, содержащим аминокислотную последовательность отдельного вариабельного домена антитела, выбранную, предпочтительно без ограничения, из группы:

dAb8, dAb10, 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.

Здесь описан лиганд, имеющий один или более чем один отдельный вариабельный домен тяжелой цепи антитела, имеющий специфичность связывания в отношении первого антигена или его эпитопа, и один или более чем один отдельный вариабельный домен легкой цепи антитела, имеющий специфичность связывания в отношении второго антигена или его эпитопа, где один или оба из указанного первого антигена и указанного второго антигена представляют собой сывороточный альбумин и где один или более чем один отдельный вариабельный домен тяжелой цепи антитела специфично связывает сывороточный альбумин и конкурирует за связывание сывороточного альбумина с отдельным вариабельным доменом антитела, имеющим аминокислотную последовательность отдельного вариабельного домена антитела, выбранную, предпочтительно без ограничения, из группы:

dAb8, dAb10, 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, dAb7p2,

и где один или более чем один отдельный вариабельный домен легкой цепи антитела специфично связывает сывороточный альбумин и содержит аминокислотную последовательность отдельного вариабельного домена легкой цепи антитела, выбранную, предпочтительно без ограничения, из группы:

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, drdAb7m12, 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,

и аминокислотной последовательности, по меньшей мере на 80% идентичной им или до 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% включительно идентичной им.

Здесь описан лиганд, имеющий один или более чем один отдельный вариабельный домен тяжелой цепи антитела, имеющий специфичность связывания в отношении первого антигена или его эпитопа, и один или более чем один отдельный вариабельный домен легкой цепи антитела, имеющий специфичность связывания в отношении второго антигена или его эпитопа, где один или оба из указанного первого антигена и указанного второго антигена представляют собой сывороточный альбумин и где один или более чем один отдельный вариабельный домен тяжелой цепи антитела специфично связывает сывороточный альбумин и имеет аминокислотную последовательность отдельного вариабельного домена тяжелой цепи антитела, выбранную, предпочтительно без ограничения, из группы:

dAb8, dAb10, dAb36, dAb7r20, dAb7r21, dAb7r22, dAb7r23, dAb7r24, dAb7r25, dAb7r26, dAb7r27, dAb7r28, dAb7r29, dAb7r30, dAb7r31, dAb7r32, dAb7r33, dAb7h21, dAb7h22, dAb7h23, Ab7h24, Ab7h25, Ab7h26, dAb7h27, dAb7h30, dAb7h31

и последовательности, по меньшей мере на 80% идентичной им или до 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% включительно идентичной им, и где один или более чем один отдельный вариабельный домен легкой цепи антитела специфично связывает сывороточный альбумин и конкурирует за связывание сывороточного альбумина с отдельным вариабельным доменом антитела, имеющим аминокислотную последовательность отдельного вариабельного домена антитела, выбранную, предпочтительно без ограничения, из группы:

dAb8, dAb10, 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.

Здесь описан лиганд, имеющий один или более чем один отдельный вариабельный домен легкой цепи антитела, и где один или более чем один отдельный вариабельный домен легкой цепи антитела специфично связывает сывороточный альбумин и имеет аминокислотную последовательность отдельного вариабельного домена легкой цепи антитела, выбранную, предпочтительно без ограничения, из группы:

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, drdAb7m12, 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, dAb7p2

и последовательности, по меньшей мере на 80% идентичной им или до 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% включительно идентичной им.

Здесь описан лиганд, имеющий один или более чем один отдельный вариабельный домен легкой цепи антитела, и где один или более чем один отдельный вариабельный домен легкой цепи антитела специфично связывает сывороточный альбумин и конкурирует за связывание сывороточного альбумина с отдельным вариабельным доменом антитела, имеющим аминокислотную последовательность отдельного вариабельного домена антитела, выбранную, предпочтительно без ограничения, из группы:

dAb8,
dAb10, 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.

Здесь описан лиганд, имеющий один или более чем один отдельный вариабельный домен, где один или более чем один отдельный вариабельный домен специфично связывает сывороточный альбумин и конкурирует за связывание сывороточного альбумина с отдельным вариабельным доменом антитела, имеющим аминокислотную последовательность отдельного вариабельного домена антитела, выбранную, предпочтительно без ограничения, из группы:

dAb8, dAb10, 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.

Предпочтительно один или более чем один отдельный вариабельный домен содержит каркас, выбранный, предпочтительно без ограничения, из группы, состоящей из CTLA-4, липокалина, SpA, аффитела, авимера, GroEl и фибронектина, и конкурирует за связывание сывороточного альбумина с отдельным вариабельным доменом антитела, имеющим аминокислотную последовательность отдельного вариабельного домена антитела, выбранную, предпочтительно без ограничения, из группы:

dAb8, dAb10, 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.

Здесь описан лиганд, имеющий первый отдельный вариабельный домен иммуноглобулина, имеющий первую специфичность связывания антигена или эпитопа, и второй отдельный вариабельный домен иммуноглобулина, имеющий вторую специфичность связывания антигена или эпитопа, где первый и второй отдельные вариабельные домены иммуноглобулина представляют собой отдельные вариабельные домены тяжелой цепи антитела, где первый отдельный вариабельный домен тяжелой цепи антитела специфично связывает сывороточный альбумин и имеет аминокислотную последовательность отдельного вариабельного домена тяжелой цепи антитела, выбранную, предпочтительно без ограничения, из группы:

dAb8,
dAb10, dAb36, dAb7r20, dAb7r21, dAb7r22, dAb7r23, dAb7r24, dAb7r25, dAb7r26,
dAb7r27, dAb7r28, dAb7r29, dAb7r30, dAb7r31, dAb7r32, dAb7r33, dAb7h21,
dAb7h22, dAb7h23, Ab7h24, Ab7h25, Ab7h26, dAb7h27, dAb7h30, dAb7h31 и

последовательности, по меньшей мере на 80% идентичной им или до 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% включительно идентичной им, и где второй отдельный вариабельный домен тяжелой цепи антитела специфично связывает сывороточный альбумин и конкурирует за связывание сывороточного альбумина с отдельным вариабельным доменом антитела, имеющим аминокислотную последовательность отдельного вариабельного домена антитела, выбранную из группы:

dAb8, dAb10, 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.

Здесь описан лиганд, имеющий первый отдельный вариабельный домен иммуноглобулина, имеющий первую специфичность связывания антигена или эпитопа, и второй отдельный вариабельный домен иммуноглобулина, имеющий вторую специфичность связывания антигена или эпитопа, где первый и второй отдельные вариабельные домены иммуноглобулина представляют собой отдельные вариабельные домены легкой цепи антитела, где первый отдельный вариабельный домен легкой цепи антитела специфично связывает сывороточный альбумин и имеет аминокислотную последовательность отдельного вариабельного домена легкой цепи антитела, выбранную, предпочтительно без ограничения, из группы:

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, drdAb7m12, 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, dAb7p2

и последовательности, по меньшей мере на 80% идентичной им или до 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% включительно идентичной им, и где второй отдельный переменный домен легкой цепи антитела специфично связывает сывороточный альбумин и конкурирует за связывание сывороточного альбумина с отдельным переменным доменом антитела, имеющим аминокислотную последовательность отдельного переменного домена антитела, выбранную, предпочтительно без ограничения, из группы:

dAb8, dAb10, 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.

Воплощения лигандов, описанных выше и здесь, также включают лиганды, имеющие структуру, содержащую IgG-структуру, имеющую комбинацию из одного или двух описанных выше лигандов с двойной специфичностью и/или отдельных переменных доменов, содержащих неиммуноглобулиновые каркасы. Такие иммуноглобулиновые структуры могут иметь различные комбинации отдельных переменных доменов антител, включая IgG-структуру, содержащую четыре отдельных переменных домена тяжелой цепи антитела, или IgG-структуру, содержащую четыре отдельных переменных домена тяжелой цепи антитела, а также IgG-структуру, содержащую две пары цепей, каждая из которых содержит отдельный переменный домен тяжелой цепи антитела и отдельный переменный домен легкой цепи антитела. В дополнение к этим IgG-структурам, лиганды, описанные здесь, могут содержать один или более мономеров отдельного переменного домена, включая, предпочтительно без ограничения, отдельные переменные домены, перечисленные выше, где, если лиганд содержит более чем один из этих отдельных переменных доменов, отдельные переменные домены могут быть идентичны друг другу или не идентичны друг другу.

Воплощения лигандов, содержащих один или более отдельных переменных доменов, включают, предпочтительно без ограничения, dAb, описанные здесь, мономеры с двойной специфичностью, содержащие по меньшей мере один отдельный переменный домен, молекулы IgG с двойной специфичностью, содержащие мономеры отдельной цепи антитела, и мультвалентные молекулы IgG, содержащие мономеры отдельной цепи антитела, как описано здесь. Эти воплощения могут дополнительно включать связывающую область для лиганда общего типа. Лиганд общего типа может включать, предпочтительно без ограничения, белок А, белок L и белок G. Для таких лигандов с двойной специфичностью, включая лиганды в формате IgG, мишень (мишени) для каждой второй специфичности связывания антигена или эпитопа включает, предпочтительно без ограничения, специфичность связывания в отношении антигена, который может входить в группу, выбранную из цитокинов, рецепторов цитокинов, ферментов, кофакторов ферментов и ДНК-связывающих белков, и может быть выбран, предпочтительно без ограничения, из рецептора EPO, ApoE, Apo-SAA, BDNF, кардиотрофина-1, EGF, рецептора EGF, ENA-78, эотаксина, эотаксина-2, Exodus-2, EpoR, кислого FGF, основного FGF, фактора роста фибробластов-10, лиганда FLT3, фракталкина (CX3C), GDNF, G-CSF, GM-CSF, GF-β1, инсулина, γ-интерферона (IFN-γ), IGF-I, IGF-II, интерлейкина-1α (IL-1α), IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (72 а.а.), IL-8 (77 а.а.), IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 (IGIF), ингибина α, ингибина β, IP-10, фактора роста кератиноцитов-2 (KGF-2), KGF, лептина, LIF, лимфотактина, мюллеровой ингибирующей субстанции, моноцитарного колониеингибирующего фактора, моноцитарного аттрактантного белка, M-CSF, MDC (67 а.а.), MDC (69 а.а.), MCP-1 (MCAF), MCP-2, MCP-3, MCP-4, MDC (67 а.а.), MDC (69 а.а.), MIG, MIP-1α, MIP-1β, MIP-3α, MIP-3β, MIP-4, фактора, ингибирующего миелоидные предшественники, 1 типа (MPLIF-1), NAP-2, неуртурина, фактора роста нервов, β-NGF, NT-3, NT-4, онкостатина М, тромбоцитарного фактора роста AA (PDGF-AA), PDGF-AB, PDGF-BB, PF-4, RANTES, SDF1α, SDF1β, TGF-β, TGF-β2, TGF-β, TNF-β, рецептора TNF 1 типа, рецептора TNF 2 типа, TNIL-1, TPO, VEGF, рецептора VEGF 1 типа, рецептора VEGF 2 типа, рецептора VEGF 3 типа, GCP-2, GRO/MGSA, GRO-β, GRO-γ, HCC1, I-309, HER 1, HER 2, HER 3 и HER 4, CD4, человеческих рецепторов хемокинов CXCR4 или CCR5, неструктурного белка 3 типа (NS3) вируса гепатита С, TNF-альфа, IgE, IFN-гамма, MMP-12, CEA, H. pylori, TB, вируса гриппа, гепатита Е, MMP-12, интернализуемых рецепторов, сверхэкспрессируемых на определенных клетках, таких как рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), рецептор ErbB2 на опухолевых клетках, интернализуемый клеточный рецептор, рецептор LDL, рецептор FGF2, рецептор ErbB2, рецептор трансферрина, рецептор PDGF, рецептор VEGF, PsmAg, белка внеклеточного матрикса, эластина,

фибронектина, ламинина, α 1-антитрипсина, тканевого фактора, ингибирующего протеазы, PDK1, GSK1, Bad, каспазы-9, Forkhead, антигена *Helicobacter pylori*, антигена *Mycobacterium tuberculosis* и антигена вируса гриппа. В таком лиганде с двойной специфичностью, включая те лиганды с двойной специфичностью, которые представлены в формате IgG, один или оба отдельных переменных домена специфично связывают эпитоп или антиген с константой диссоциации (K_d), которая может быть выбрана, предпочтительно без ограничения, из 1×10^{-3} М или менее, 1×10^{-4} М или менее, 1×10^{-5} М или менее, 1×10^{-6} М или менее, 1×10^{-7} М или менее, 1×10^{-8} М или менее и 1×10^{-9} М или менее, как определено, например, поверхностным плазмонным резонансом. Такой лиганд с двойной специфичностью, включая те лиганды с двойной специфичностью, которые представлены в формате IgG, может дополнительно содержать один или более объектов, включая, предпочтительно без ограничения, метку, метку и лекарственное средство. Такой лиганд с двойной специфичностью, включая те лиганды с двойной специфичностью, которые представлены в формате IgG, а также мультимерный лиганд, содержащий один или более мономеров отдельных переменных доменов, перечисленных выше, могут быть представлены в наборе и в композиции, включая фармацевтическую композицию, содержащую лиганд с двойной специфичностью и его носитель.

Сходным образом, для лиганда, содержащего один или более отдельные переменные домены, как описано здесь, включая лиганд в мономерной форме и лиганд в мультимерной форме, как определено выше, один или более отдельные переменные домены специфично связывают эпитоп или антиген с константой диссоциации (K_d), которая может быть выбрана, предпочтительно без ограничения, из 1×10^{-3} М или менее, 1×10^{-4} М или менее, 1×10^{-5} М или менее, 1×10^{-6} М или менее, 1×10^{-7} М или менее, 1×10^{-8} М или менее и 1×10^{-9} М или менее, как определено, например, поверхностным плазмонным резонансом. Такой лиганд может дополнительно содержать один или более объекты, включая, предпочтительно без ограничения, метку, метку и лекарственное средство. Такой лиганд может быть представлен в наборе, композиции, включая фармацевтическую композицию, содержащую лиганд и его носитель.

При использовании здесь процент идентичности может относиться к проценту идентичности по всей длине аминокислотной или нуклеотидной последовательности. Если указано, процент идентичности аминокислотной последовательности или последовательности нулеиновой кислоты относится к проценту идентичности последовательности (последовательностям) из одной или более отдельных областей эталонной аминокислотной последовательности или последовательности нулеиновой кислоты, например, на протяжении одной или более CDR-областей антитела и/или одной или более каркасных областей переменного домена антитела. Например, идентичность последовательности на аминокислотном уровне в одной или более CDR полипептида может обладать по меньшей мере 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98% или 99, или большей идентичностью аминокислотной последовательности соответствующих CDR отдельного переменного домена тяжелой или легкой цепи антитела. Сходным образом, идентичность последовательности на аминокислотном уровне в одной или более каркасных областях полипептида может обладать по меньшей мере 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%, или большей идентичностью аминокислотной последовательности соответствующей каркасной области отдельного переменного домена тяжелой или легкой цепи антитела. На уровне нуклеиновых кислот, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей одну или более CDR полипептида, может иметь по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%, или большую идентичность последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей соответствующие CDR отдельного переменного домена тяжелой или легкой цепи антитела. На уровне нуклеиновых кислот, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей одну или более чем одну каркасную область полипептида, может иметь по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%, или большую идентичность последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей соответствующие каркасные области отдельного переменного домена тяжелой или легкой цепи антитела соответственно. Каркасные области (FW) предпочтительно имеют происхождение от каркасной области антитела, как, например, человеческая V3-23[DP47]JH4B тяжелой цепи или человеческая DPK9/JK1 легкой цепи каппа. Если каркасная область представляет собой область, обнаруженную в V-области человеческой тяжелой цепи V3-23[DP47]JH4B, процент идентичности может относиться к ее каркасным областям и/или предпочтительно к одной или более чем одной CDR-области, как показано на фиг. 24. Если каркасная область представляет собой область, обнаруженную в V-области человеческой легкой цепи DPK9/JK1, процент идентичности может представлять собой процент идентичности по сравнению с ее эталонными каркасными областями и/или предпочтительно с одной или более чем одной CDR-областью, как показано на фиг. 24.

CDR предпочтительно представляют собой CDR переменного домена антитела, предпочтительно без ограничения CDR отдельных переменных доменов антитела.

В некоторых воплощениях структурная характеристика процента идентичности сочетается с функциональным аспектом. Например, в некоторых воплощениях последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность с менее чем 100% идентичностью эталонной последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности также необходима

для отображения по меньшей мере одного функционального аспекта эталонной аминокислотной последовательности или аминокислотной последовательности, кодируемой эталонной нуклеиновой кислотой. В других воплощениях последовательность нуклеиновой кислоты или аминокислотная последовательность с менее чем 100% идентичностью эталонной последовательности нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности, соответственно, также необходима для отображения по меньшей мере одного функционального аспекта эталонной аминокислотной последовательности или аминокислотной последовательности, кодируемой эталонной нуклеиновой кислотой, но эта функциональная характеристика может быть незначительно изменена, например, придавать увеличенную аффинность в отношении обозначенного антигена по сравнению с аффинностью эталона.

3. Применение мультиспецифичных лигандов по второй форме изобретения

Мультиспецифичные лиганды в соответствии со способом по второй форме настоящего изобретения могут быть использованы в терапевтических и профилактических применениях *in vivo*, диагностических применениях *in vitro* и *in vivo*, применениях в исследованиях и в качестве реагентов *in vitro* и т.п. Например, молекулы антител могут быть использованы в методиках исследований, основанных на антителах, таких как методики ELISA, в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники.

Как упомянуто выше, мультиспецифичные лиганды по изобретению применимы в диагностических, профилактических и терапевтических способах. Мультиспецифичные антитела по изобретению диагностически применимы в ветерн-блот анализе и выявлении белков *in situ* стандартными иммуногистохимическими способами; для использования в этих применениях лиганды могут быть снабжены метками в соответствии с методиками, известными в данной области техники. В дополнение такие полипептиды-антитела могут быть использованы препаративно в способах аффинной хроматографии в комплексе с хроматографической подложкой, такой как смола. Все такие методики хорошо известны специалисту в данной области техники.

Диагностические применения мультиспецифичных лигандов с закрытой конформацией по изобретению включают гомогенные исследования анализируемых веществ, в которых используют способность мультиспецифичных лигандов с закрытой конформацией связывать две мишени конкурентно таким образом, что две мишени не могут быть связаны одновременно (закрытая конформация), или, альтернативно, их способности связывать две мишени одновременно (открытая конформация).

Производители систем для диагностических и исследовательских анализов, используемых в открытии и разработке лекарственных средств, активно искали формат истинного гомогенного иммунологического исследования. Основные диагностические рынки включают исследования у людей в стационарах, врачебных кабинетах и клиниках, рекомендованных коммерческих лабораториях, станциях переливания крови и на дому, диагностику не у людей (например, исследование пищи, исследование воды, исследование окружающей среды, биологическая защита и ветеринарное исследование) и, в завершение, исследованиях (включая разработку лекарственных средств; фундаментальные исследования и научные исследования).

В настоящее время на всех этих рынках применяют системы иммунологического анализа, построенные на хемилюминесцентных методиках, методиках ELISA, флюоресцентных методиках или, в редких случаях, методиках радиоиммунного анализа. Каждый из этих форматов требует стадии разделения (разделения связанных и несвязанных реагентов). В некоторых случаях необходимы несколько стадий разделения. Добавление этих дополнительных стадий требует добавления реагентов и автоматизации, занимает время и оказывает влияние на конечный результат исследований. В диагностике у человека стадию разделения можно автоматизировать, что маскирует проблему, но не решает ее. Робототехника, дополнительные реагенты, дополнительное время инкубации и т.п. значимо повышают стоимость и сложность. При разработке лекарственных средств, как, например, при высокопроизводительном скрининге, где одновременно исследуют буквально миллионы образцов, добавление дополнительных стадий разделения может сделать проведение скрининга невозможным. Тем не менее, отказ от разделения создает слишком интенсивный шум при считывании данных. Таким образом, существует потребность в истинном гомогенном формате, обеспечивающем чувствительности в диапазоне, получаемом при современных форматах исследований. Преимущественно исследование обладает полностью количественными считываниями данных с широкой чувствительностью и широким динамическим диапазоном. Чувствительность является важным требованием, так как она снижает необходимое количество образца. Оба этих признака являются признаками, предлагаемыми в гомогенной системе. Это очень важно при исследовании в месте наблюдения за пациентом и разработке лекарственных средств, где ценность образцов очень высока. Гетерогенные системы, используемые в данной области техники в настоящее время, требуют больших количеств образца и дорогих реагентов.

Применения для гомогенных исследований включают тесты на злокачественные новообразования, где наиболее крупным исследованием является исследование на простатоспецифический антиген, применяемое в скрининге рака предстательной железы у мужчин. Другие применения включают тесты на бесплодие, представляющие серию тестов для женщин, пытающихся забеременеть, включая

исследование на хорионический β -гонадотропин человека (бета-ХГЧ) на беременность. Тесты на инфекционные заболевания, включая гепатит, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), краснуху, и другие вирусы и микроорганизмы, и заболевания, передающиеся половым путем. Тесты применяют на станциях переливания крови, особенно исследования на ВИЧ, гепатит А, В, С, "ни А, ни В". Тесты для терапевтического лекарственного мониторинга включают мониторинг уровней принимаемых лекарственных средств у пациентов для оценки эффективности и во избежание токсичности, например дигоксина при аритмии, уровней фенобарбитала в случаях психоза; теофиллина при астме. Более того, диагностические тесты применимы при исследовании на злоупотребление наркотиками, как, например, исследование на кокаин, марихуану и т.п. Метаболические тесты применяют для оценки функций щитовидной железы, анемии и других физиологических расстройств и функций.

Более того, формат гомогенного иммунологического исследования применим в изготовлении стандартных клинико-биохимических исследований. Включение иммунологических исследований и химических исследований в один и тот же прибор обеспечивает большое преимущество при диагностическом исследовании. Подходящие химические исследования включают тесты на глюкозу, холестерин, калий и т.п.

Другим важным применением гомогенных иммунологических исследований является открытие и разработка лекарственных средств: высокопроизводительный скрининг включает исследование комбинаторных химических библиотек против мишеней в очень больших объемах. Сигнал детектируют и положительные группы затем разбивают на меньшие группы, и, в конечном счете, тесты проводят на клетках и затем животных. Гомогенные исследования могут быть использованы во всех этих типах тестов. При разработке лекарственных средств, особенно исследованиях на животных и клинических испытаниях, иммунологические исследования применяют очень активно. Гомогенные исследования значительно ускоряют и упрощают эти способы. Другие применения включают исследование пищи и напитков: исследование мяса и других продуктов на *E.coli*, *Salmonella* и т.п.; исследование воды, включая исследование водоочистных сооружений на все типы загрязнителей, включая *E.coli*; и ветеринарное обследование.

В широком воплощении согласно изобретению предложено исследование связывания, включающее детектируемый агент, связываемый мультиспецифичным лигандом с закрытой конформацией по изобретению, и его детектируемые свойства изменяются связыванием анализируемого вещества с указанным мультиспецифичным лигандом с закрытой конформацией. Такое исследование может быть модифицировано несколькими разными способами, в каждом из которых используют вышеописанные свойства мультиспецифичных лигандов с закрытой конформацией.

Исследование основано на непосредственном или косвенном вытеснении агента анализируемым веществом, что приводит к изменению детектируемых свойств агента. Например, там, где агент представляет собой фермент, способный катализировать реакцию, имеющую детектируемую конечную точку, указанный фермент может быть связан лигандом таким образом, что лиганд блокирует его активную область, инактивируя посредством этого фермент. Анализируемое вещество, также связываемое с мультиспецифичным лигандом с закрытой конформацией, вытесняет фермент, придавая ему активность посредством высвобождения активной области. Тогда фермент способен реагировать с субстратом и давать начало детектируемому событию. В альтернативном воплощении лиганд может связывать фермент вне активной области, влияя на конформацию фермента и таким образом изменяя его активность. Например, связывание лиганда может стеснять структуру активной области, или может быть заблокировано связывание кофакторов, необходимых для активности.

Физическое воплощение исследования может принимать любую форму, известную в данной области техники. Например, комплекс мультиспецифичный лиганд с закрытой конформацией/фермент может быть представлен на тестовой полоске; субстрат может быть представлен на другой области тестовой полоски, и растворитель, содержащий анализируемое вещество, может проходить через комплекс лиганд/фермент, вытесняя фермент и перенося его к области субстрата с образованием сигнала. Альтернативно, комплекс лиганд/фермент может быть представлен на тестовой палочке или другой твердой фазе, и его можно погружать в раствор анализируемого вещества/субстрата, высвобождая фермент в раствор в ответ на присутствие анализируемого вещества.

Поскольку каждая молекула анализируемого вещества потенциально высвобождает одну молекулу фермента, исследование является количественным, где интенсивность генерируемого в данное время сигнала зависит от концентрации анализируемого вещества в растворе.

Возможны другие формы с применением анализируемого вещества в закрытой конформации. Например, мультиспецифичный лиганд с закрытой конформацией может быть изменен, чтобы связывать фермент в аллостерической области, активируя посредством этого фермент. В таком положении фермент активен в отсутствие анализируемого вещества. Добавление анализируемого вещества вытесняет фермент и устраняет аллостерическую активацию, инактивируя таким образом фермент.

В контексте описанных выше воплощений, в которых используют ферментативную активность в качестве меры концентрации анализируемого вещества, активация или инактивация фермента относится к увеличению или уменьшению активности фермента, измеренной как способность фермента

катализировать реакцию, генерирующую сигнал. Например, фермент может катализировать превращение недетектируемого субстрата в его детектируемую форму. Например, пероксидазу хрена широко используют в данной области техники совместно с хромогенными или хемилюминесцентными субстратами, имеющимися в продаже. Степень увеличения или уменьшения активности фермента может составлять от 10 до 100%, как, например, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 или 90%; в случае увеличения активности увеличение может превышать 100%, т.е. составлять 200, 300, 500% или более, или может быть неизмерима в процентном отношении, если начальная активность ингибированного фермента не выявляема.

В другой форме мультиспецифичный лиганд с закрытой конформацией может связывать субстрат пары фермент/субстрат активнее, чем фермент. Таким образом, субстрат недоступен для фермента до его высвобождения из мультиспецифичного лиганда с закрытой конформацией посредством связывания анализируемого вещества. Воплощения для этой формы аналогичны воплощениям для форм со связыванием фермента.

Боле того, исследование может быть изменено для связывания флюоресцентной молекулы, такой как флюоресцеин или другой флюорофор, в такой конформации, что флюоресценция блокирована при связывании лиганда. В этом случае связывание анализируемого вещества с лигандом будет вытеснять флюоресцентную молекулу, генерируя таким образом сигнал. Альтернативы флюоресцентным молекулам, применимые в настоящем изобретении, включают люминесцентные агенты, такие как люциферин/люцифераза, и хромогенные агенты, включая агенты, обычно используемые в иммунологических исследованиях, такие как пероксидаза хрена (HRP).

Терапевтические и профилактические применения мультиспецифичных лигандов, полученных в соответствии с изобретением, включают введение лигандов по изобретению млекопитающему-реципиенту, такому как человек. Мультиспецифичность может позволять антителам связывать мультимерный антиген с высокой авидностью. Мультиспецифичные лиганды могут сделать возможным перекрестное связывание двух антигенов, например, при рекрутинге цитотоксических Т-клеток для опосредования цитолиза опухолевых клеточных линий.

По существу, чистые лиганды или их связывающие белки, например мономеры dAb, с по меньшей мере 90-95% гомогенностью являются предпочтительными для введения млекопитающему, и с 98-99% или большей гомогенностью наиболее предпочтительны для фармацевтических применений, особенно, когда млекопитающее представляет собой человека. После очистки, частичной или до желаемой гомогенности, лиганды могут быть применены диагностически или терапевтически (включая экстракорпоральное применение), или в разработке и осуществлении способов исследования, иммунофлюоресцентных окрашиваний и т.п. (Lefkovite and Pernis (1979 and 1981), *Immunological Methods*, Volumes I and II, Academic Press, NY).

Лиганды или их связывающие белки, например мономеры dAb, по настоящему изобретению будут обычно находить применение в предотвращении, подавлении или лечении воспалительных состояний, аллергической гиперчувствительности, злокачественных новообразований, бактериальной или вирусной инфекции и аутоиммунных расстройств (которые включают, предпочтительно без ограничения, диабет I типа, астму, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, системную красную волчанку, болезнь Крона и злокачественную миастению).

В настоящем изобретении термин "предотвращение" включает введение защитной композиции до индукции заболевания. "Подавление" относится к введению композиции после индуцирующего события, но до клинических проявлений заболевания. "Лечение" включает введение защитной композиции после манифестации симптомов заболевания.

Доступны модельные системы на животных, которые могут быть использованы для скрининга эффективности антител или их связывающих белков в защите от заболевания или его лечения. Способы исследования системной красной волчанки (SLE) у восприимчивых мышей известны в данной области техники (Knight et al. (1978), *J. Exp. Med.*, 147: 1653; Reinersten et al. (1978), *New Eng. J. Med.*, 299: 515). Злокачественную миастению (MG) исследуют у самок мышей SJL/J, индуцируя заболевание растворимым белком AchR от другого вида (Lindstrom et al. (1988), *Adv. Immunol.*, 42: 233). Arthritis is induced in a susceptible strain of mice by injection of Type II collagen (Stuart et al. (1984), *Ann. Rev. Immunol.*, 42: 233). Была описана модель, посредством которой адьювантный артрит индуцируют у восприимчивых мышей инъекцией микобактериального белка теплового шока (Van Eden et al. (1988), *Nature*, 331: 171). Тиреоидит индуцируют у мышей введением тироглобулина, как описано (Maron et al. (1980), *J. Exp. Med.*, 152: 1115). Инсулинозависимый сахарный диабет (IDDM) встречается в природе или может быть индуцирован у определенных линий мышей, таких как описанные Kanasawa et al. (1984), *Diabetologia*, 27: 113. Экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (EAE) у мышей и крыс служит моделью рассеянного склероза (MS) у человека. В этой модели демиелинизирующее заболевание индуцируют введением основного миелинового белка (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 and Satoh et al. (1987), *J. Immunol.*, 138: 179).

Лиганд, содержащий отдельный переменный домен, или его композиция, связывающий vWF,

например человеческий vWF, домен A1 vWF активированного vWF или домен A3 vWF, может дополнительно содержать тромболитический агент. Этот тромболитический агент может быть нековалентно или ковалентно присоединен к отдельному вариабельному домену, в частности к отдельному вариабельному домену антитела, посредством ковалентных или нековалентных способов, как известно специалисту в данной области техники. Нековалентные способы включают присоединение посредством белкового взаимодействия, такого как биотин/стрептавидин, или посредством иммуноконъюгата. Альтернативно, тромболитический агент может быть введен одновременно, раздельно или последовательно по отношению к лиганду, состоящему из или содержащему отдельный вариабельный домен, связывающий vWF или домен vWF, как описано выше, или его композиции. Тромболитические агенты по изобретению могут включать, например, стафилокиназу, тканевой активатор плазминогена, стрептокиназу, одноцепочечную стрептокиназу, урокиназу и ацил-плазминоген-стрептокиназный комплекс.

Также здесь описаны инвазивные медицинские устройства, покрытые отдельным вариабельным доменом или лигандом, содержащим отдельный вариабельный домен, или их композицией, или отдельным вариабельным доменом, являющимся результатом способа скрининга, описанного здесь. Неограничивающие примеры устройств включают хирургические трубки, окклюзионные устройства, протезные устройства. Применения таких устройств включают хирургические способы, требующие модуляции опосредованной тромбоцитами агрегации у места инвазии (например, устройство, покрытое отдельным вариабельным доменом, специфично связывающим vWF) или модуляции воспаления (например, устройство, покрытое отдельным вариабельным доменом, специфично связывающим TNF-альфа).

В большинстве случаев лиганды по настоящему изобретению будут использовать в очищенной форме совместно с фармакологически подходящими носителями. Обычно такие носители включают водные или водно-спиртовые растворы, эмульсии или суспензии, любые, включая содержащие физиологический раствор и/или забуференную среду. Парентеральные наполнители включают раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, и лактат Рингера. Подходящие физиологически приемлемые адьюванты, если необходимо поддерживать полипептидный комплекс в суспензии, могут быть выбраны из загустителей, таких как карбоксиметилцеллюлоза, поливинилпирролидон, желатин и альгинаты.

Внутривенные наполнители включают жидкие и питательные наполнители и электролитные наполнители, как, например, наполнители, основанные на декстрозе Рингера. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как противомикробные препараты, антиоксиданты, хелатообразующие агенты и инертные газы (Mack (1982), Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition).

Лиганды по настоящему изобретению могут быть использованы как отдельно вводимые композиции или в сочетании с другими агентами. Они могут включать различные иммунотерапевтические лекарственные средства, такие как циклоспорин, метотрексат, адриамин или цисплатин, и иммунотоксины. Фармацевтические композиции могут включать "смеси" цитотоксических или других агентов в сочетании с лигандами по настоящему изобретению или даже комбинации лигандов по настоящему изобретению, имеющих разные специфичности, как, например, лигандов, выбранных с применением различных антигенов-мишеней или эпитопов-мишеней, независимо от того, объединяют ли их перед введением.

Путь введения фармацевтических композиций по изобретению может представлять собой любой из путей введения, обычно известных специалистам в данной области техники. Для лечения, включая, без ограничения, иммунотерапию, выбранные лиганды по изобретению могут быть введены любому пациенту в соответствии со стандартными методиками. Введение может быть осуществлено любым подходящим способом, включая парентеральное, внутривенное, внутримышечное, внутрибрюшинное, трансдермальное, посредством легочного способа введения или также, подходяще, прямой инфузией с использованием катетера. Доза и кратность введения будут зависеть от возраста, пола и состояния пациента, сопутствующего введения других лекарственных средств, противопоказаний и других параметров, которые следует принимать во внимание клиническому врачу.

Лиганды по данному изобретению могут быть лиофилизированы для хранения и восстановлены в подходящем носителе перед применением. Было показано, что эта методика эффективна с использованием обычных иммуноглобулинов и могут быть применены известные в данной области техники методики лиофилизации и восстановления. Специалистам в данной области техники будет ясно, что лиофилизация и восстановление могут привести к различным степеням потери активности антител (например, с использованием обычных иммуноглобулинов, антитела IgM проявляют тенденцию к большей потере активности, чем антитела IgG) и что может быть необходимым адаптировать применяемые титры в сторону повышения для компенсации.

Композиции, содержащие лиганды по настоящему изобретению или их смеси, могут быть введены для профилактического и/или терапевтического лечения. В определенных терапевтических применениях адекватное количество для достижения, по меньшей мере, частичного ингибирования, подавления,

модуляции, цитолиза или некоторого другого измеряемого параметра популяции выбранных клеток определяют как "терапевтически эффективную дозу". Количества, необходимые для достижения этой дозы, будут зависеть от тяжести заболевания и общего состояния иммунной системы пациента, но в большинстве случаев составляют от 0,005 до 5,0 мг лиганда, например антитела, рецептора (например, T-клеточного рецептора) или их связывающего белка, на 1 кг массы тела, при этом чаще всего применяют дозы от 0,05 до 2,0 мг/кг/доза. Для профилактических применений композиции, содержащие лиганды по настоящему изобретению или их смеси, могут также быть введены в сходных или незначительно более низких дозах.

Лечение, проводимое с применением композиций, описанных здесь, признают "эффективными" при снижении одного или более симптомов (например, на по меньшей мере 10% или по меньшей мере один балл шкалы клинической оценки) по отношению к таким симптомам, присутствовавшим до лечения, или по отношению к таким симптомам у индивида (человека или модельного животного), не пролеченного такой композицией. Симптомы будут очевидно изменяться в зависимости от указанного заболевания или расстройства, но могут быть измерены квалифицированным клиническим врачом или специалистом. Такие симптомы могут быть измерены, например, мониторингом уровня одного или более биохимических индикаторов заболевания или расстройства (например, уровней фермента или метаболита, коррелирующих с заболеванием, количества пораженных клеток и т.п.), мониторингом физикальных проявлений (например, воспаления, размера опухоли и т.п.), или посредством общепринятой шкалы клинической оценки, например, Expanded Disability Status Scale (для рассеянного склероза), Irvine Inflammatory Bowel Disease Questionnaire (оценка из 32 пунктов выражает качество жизни в отношении функции кишечника, системных симптомов, социальной функции и эмоционального статуса, сумма баллов составляет от 32 до 224, с более высокими суммами баллов, указывающими на лучшее качество жизни), Quality of Life Rheumatoid Arthritis Scale или другой общепринятой шкалы клинической оценки, как известно в данной области. Продолжительное (например, один день или более, предпочтительно более длительное) снижение симптомов заболевания или расстройства по меньшей мере на 10% или на один или более балла заданной клинической шкалы указывает на "эффективное" лечение. Подобным образом, профилактика, проводимая с использованием композиции, как описано здесь, "эффективна" при задержке, снижении или исчезновении начала или тяжести одного или более симптомов по отношению к таким симптомам у похожего индивида (человека или модельного животного), не пролеченного композицией.

Композиция, содержащая лиганд или их смесь по настоящему изобретению, может быть применена в профилактических и терапевтических наборах для содействия изменению, инактивации, цитолизу или удалению популяции выбранных клеток-мишеней у млекопитающего. В дополнение, выбранные репертуары полипептидов, описанные здесь, могут быть использованы экстракорпорально или *in vitro* избирательно для уничтожения, сокращения или же эффективного удаления популяции клеток-мишеней из гетерогенного собрания клеток. Кровь от млекопитающего может быть комбинирована экстракорпорально с лигандами, например антителами, поверхностными клеточными рецепторами или их связывающими белками, посредством чего уничтожают нежелательные клетки или же удаляют их из крови, предназначенной для возврата млекопитающему в соответствии со стандартными методиками.

И. Применение лигандов с двойной специфичностью с увеличенным периодом полувыведения по изобретению

Лиганды с двойной специфичностью в соответствии со способом по настоящему изобретению, а также лиганды, содержащие один или более чем один отдельный варибельный домен, как определено здесь, могут быть использованы в терапевтических и профилактических применениях *in vivo*, диагностических применениях *in vivo* и т.п.

Терапевтические и профилактические применения лигандов с двойной специфичностью, полученных в соответствии с изобретением, а также лигандов, содержащих один или более отдельные варибельные домены, как определено здесь, включают введение лигандов по изобретению млекопитающему-реципиенту, такому как человек. Антитела с двойной специфичностью по изобретению, а также лиганды, содержащие один или более отдельные варибельные домены, как определено здесь, включают по меньшей мере одну специфичность в отношении молекулы, увеличивающей период полувыведения; одна или более чем одна другая специфичность может быть направлена против молекул-мишеней. Например, IgG с двойной специфичностью может быть специфичен в отношении четырех эпитопов, один из которых расположен на молекуле, увеличивающей период полувыведения. Двойная специфичность, а также тройная специфичность, а также высокие валентности могут позволять лигандам, содержащим по меньшей мере один отдельный варибельный домен, связывать мультимерный антиген с высокой авидностью. Антитела с двойной специфичностью могут сделать возможным перекрестное связывание двух антигенов, например, при рекрутинге цитотоксических T-клеток для опосредования цитолиза опухолевых клеточных линий.

По существу, чистые лиганды с двойной специфичностью в соответствии со способом по настоящему изобретению, а также лиганды, содержащие один или более чем один отдельный варибельный домен, как определено здесь, или их связывающие белки, такие как мономеры отдельных

вариабельных доменов (т.е. мономеры dAb), с по меньшей мере 90-95% гомогенностью являются предпочтительными для введения млекопитающему, и с 98-99% или большей гомогенностью наиболее предпочтительны для фармацевтических применений, особенно, когда млекопитающее представляет собой человека. После очистки, частичной или до желаемой гомогенности, лиганды могут быть применены диагностически или терапевтически (включая экстракорпоральное применение), или в разработке и осуществлении способов исследования, иммунофлюоресцентных окрашиваний и т.п. (Lefkowitz and Pernis (1979 and 1981), *Immunological Methods, Volumes I and II*, Academic Press, NY).

Лиганды с двойной специфичностью в соответствии со способом по настоящему изобретению, а также лиганды, содержащие один или более чем один отдельный вариабельный домен, как определено здесь, будут обычно находить применение в предотвращении, подавлении или лечении воспалительных состояний, аллергической гиперчувствительности, злокачественных новообразований, бактериальной или вирусной инфекции и аутоиммунных расстройств (которые включают, предпочтительно без ограничения, диабет I типа, астму, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, системную красную волчанку, болезнь Крона и злокачественную миастению).

В настоящем изобретении термин "предотвращение" включает введение защитной композиции до индукции заболевания. "Подавление" относится к введению композиции после индуцирующего события, но до клинических проявлений заболевания. "Лечение" включает введение защитной композиции после манифестации симптомов заболевания.

Доступны модельные системы на животных, которые могут быть использованы для скрининга эффективности антител или их связывающих белков в защите от заболевания или его лечения. Способы исследования системной красной волчанки (SLE) у восприимчивых мышей известны в данной области техники (Knight et al. (1978), *J. Exp. Med.*, 147: 1653; Reinersten et al. (1978), *New Eng. J. Med.*, 299: 515). Злокачественную миастению (MG) исследуют у самок мышей SJL7J, индуцируя заболевание растворимым белком AchR от другого вида (Lindstrom et al. (1988), *Adv. Immunol.*, 42: 233). Arthritis is induced in a susceptible strain of mice by injection of Type II collagen (Stuart et al. (1984), *Ann. Rev. Immunol.*, 42: 233). Была описана модель, посредством которой адьювантный артрит индуцируют у восприимчивых мышей инъекцией микобактериального белка теплового шока (Van Eden et al. (1988), *Nature*, 331: 171). Тиреоидит индуцируют у мышей введением тироглобулина, как описано (Maron et al. (1980), *J. Exp. Med.*, 152: 1115). Инсулинозависимый сахарный диабет (IDDM) встречается в природе или может быть индуцирован у определенных линий мышей, таких как описанные Kanasawa et al. (1984), *Diabetologia*, 27: 113. ЕАЕ у мышей и крыс служит моделью рассеянного склероза (MS) у человека. В этой модели демиелинизирующее заболевание индуцируют введением основного миелинового белка (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; and Satoh et al. (1987), *J. Immunol.*, 138: 179).

Лиганды с двойной специфичностью по изобретению и мономеры dAb, способные связывать внеклеточные мишени, вовлеченные в эндоцитоз (например, клатрин), делают возможным эндоцитоз лигандов с двойной специфичностью, позволяя другой специфичности, способной связывать внутриклеточную мишень, быть доставленной во внутриклеточную среду. Для этой стратегии необходим лиганд с двойной специфичностью с физическими свойствами, позволяющими ему оставаться функциональным внутри клетки. Альтернативно, если внутриклеточный компартмент конечного назначения обладает оксидантной активностью, в лиганде с правильной конформацией не должно быть дисульфидных связей.

В большинстве случаев лиганды по настоящему изобретению будут использовать в очищенной форме совместно с фармакологически подходящими носителями. Обычно такие носители включают водные или водно-спиртовые растворы, эмульсии или суспензии, любые, включая содержащие физиологический раствор и/или забуференную среду. Парентеральные наполнители включают раствор хлорида натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактат Рингера. Подходящие физиологически приемлемые адьюванты, если необходимо поддерживать полипептидный комплекс в суспензии, могут быть выбраны из загустителей, таких как карбоксиметилцеллюлоза, поливинилпирролидон, желатин и альгинаты.

Внутривенные наполнители включают жидкие и питательные наполнители, и электролитные наполнители, как, например, наполнители, основанные на декстрозе Рингера. Также могут быть представлены консерванты и другие добавки, такие как противомикробные препараты, антиоксиданты, хелатообразующие агенты и инертные газы (Mack (1982), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th Edition).

Лиганды по настоящему изобретению могут быть использованы как отдельно вводимые композиции или в сочетании с другими агентами. Они могут включать различные иммунотерапевтические лекарственные средства, такие как циклоспорин, метотрексат, адриамицин или цисплатин, и иммунотоксины. Фармацевтические композиции могут включать "смеси" цитотоксических или других агентов в сочетании с лигандами по настоящему изобретению.

Путь введения фармацевтических композиций по изобретению может представлять собой любой из путей введения, обычно известных специалистам в данной области техники. Для лечения, включая, без

ограничения, иммунотерапию, лиганды по изобретению могут быть введены любому пациенту в соответствии со стандартными методиками. Введение может быть осуществлено любым подходящим способом, включая парентеральное, внутривенное, внутримышечное, внутрибрюшинное, трансдермальное, посредством легочного способа введения или также, подходяще, прямой инфузией с использованием катетера. Доза и кратность введения будут зависеть от возраста, пола и состояния пациента, сопутствующего введения других лекарственных средств, противопоказаний и других параметров, которые следует принимать во внимание клиническому врачу.

Лиганды по данному изобретению могут быть лиофилизированы для хранения и восстановлены в подходящем носителе перед применением. Было показано, что эта методика эффективна с использованием обычных иммуноглобулинов и могут быть применены известные в данной области техники методики лиофилизации и восстановления. Специалистам в данной области техники будет ясно, что лиофилизация и восстановление могут привести к различным степеням потери активности антител (например, с использованием обычных иммуноглобулинов, антитела IgM проявляют тенденцию к большей потере активности, чем антитела IgG) и что может быть необходимым адаптировать применяемые титры в сторону повышения для компенсации.

Композиции, содержащие лиганды по настоящему изобретению или их смесь, могут быть введены для профилактического и/или терапевтического лечения. В определенных терапевтических применениях адекватное количество для достижения, по меньшей мере, частичного ингибирования, подавления, модуляции, цитолиза или некоторого другого измеряемого параметра популяции выбранных клеток определяют как "терапевтически эффективную дозу". Количества, необходимые для достижения этой дозы, будут зависеть от тяжести заболевания и общего состояния иммунной системы пациента, но в большинстве случаев составляют от 0,005 до 5,0 мг лиганда на 1 кг массы тела, при этом чаще всего применяют дозы от 0,05 до 2,0 мг/кг/доза. Для профилактических применений композиции, содержащие лиганды по настоящему изобретению или их смеси, могут также быть введены в сходных или незначительно более низких дозах.

Композиция, содержащая лиганд по настоящему изобретению, может быть применена в профилактических и терапевтических условиях для содействия изменению, инактивации, цитолизу или удалению популяции выбранных клеток-мишеней у млекопитающего.

В дополнение, селектированные репертуары полипептидов, описанные здесь, могут быть использованы экстракорпорально или *in vitro* избирательно для селективного уничтожения, сокращения или же эффективного удаления популяции клеток-мишеней из гетерогенной совокупности клеток. Кровь от млекопитающего может быть комбинирована экстракорпорально с лигандами, например антителами, поверхностными клеточными рецепторами или их связывающими белками, посредством чего уничтожают нежелательные клетки или же удаляют их из крови, предназначенной для возврата млекопитающему в соответствии со стандартными методиками.

Выбор и описание лигандов, содержащих отдельный вариабельный домен для связывания сывороточного альбумина, имеющего происхождение от ряда видов

Лиганд может содержать один или более отдельных вариабельных доменов, например отдельные вариабельные домены иммуноглобулина и/или неиммуноглобулиновые отдельные вариабельные домены, где по меньшей мере один из отдельных вариабельных доменов специфично связывает сывороточный альбумин, имеющий происхождение от человека или вида, не являющегося человеком. В одном воплощении отдельный вариабельный домен специфично связывает сывороточный альбумин, эндогенный для человека. В другом воплощении отдельный вариабельный домен специфично связывает сывороточный альбумин от вида, не являющегося человеком. Альтернативно, отдельный вариабельный домен специфично связывает как сывороточный альбумин, эндогенный для человека, так и сывороточный альбумин, эндогенный для одного или более видов, не являющихся человеком. В качестве неограничивающего примера, такой отдельный вариабельный домен может специфично связывать сывороточный альбумин, эндогенный как для человека, так и для яванского макака, или сывороточный альбумин, эндогенный как для человека, так и для крысы, или сывороточный альбумин, эндогенный как для человека, так и для мыши, или сывороточный альбумин, эндогенный как для человека, так и для свиньи. Альтернативно, отдельный вариабельный домен специфично связывает два или более сывороточных альбумина от двух или более видов, не являющихся человеком. При использовании здесь сывороточный альбумин может быть экспрессирован геном, эндогенным для вида, т.е. природный сывороточный альбумин, или его рекомбинантным эквивалентом. В одном воплощении сывороточный альбумин включает фрагменты, аналоги и производные природного и рекомбинантного сывороточного альбумина. Такие фрагменты сывороточного альбумина включают фрагменты, содержащие I домен, II домен и/или III домен, или комбинации двух или более из каждого из I, II и III доменов сывороточного альбумина, преимущественно человеческого сывороточного альбумина. II домен сывороточного альбумина предпочтителен в качестве мишени для отдельного вариабельного домена, как определено здесь. Другие предпочтительные комбинации представляют собой I домен и II домен; I домен и III домен; II домен и III домен; I домен сам по себе; II домен сам по себе; и III домен сам по себе; и I домен и II домен, и III домен. В одном воплощении сывороточный альбумин представляет собой

рекомбинантный сывороточный альбумин, экзогенно экспрессированный в хозяине, не являющемся человеком, таком как животное-хозяин или одноклеточный хозяин, как, например, дрожжи или бактерии.

Виды, для которых сывороточный альбумин является эндогенным, включают любой вид, экспрессирующий эндогенный сывороточный альбумин, включая, предпочтительно без ограничения, виды человека, мыши, мышинные виды, крысы, яванского макака, свиньи, собаки, кошки, лошади, козы и хомяка. В некоторых случаях сывороточный альбумин, эндогенный для верблюда или ламы, исключен.

Отдельный вариабельный домен может представлять собой отдельный вариабельный домен иммуноглобулина, включая, предпочтительно без ограничения, отдельный вариабельный домен тяжелой цепи антитела, отдельный вариабельный домен V_{HH} тяжелой цепи антитела, человеческий отдельный вариабельный домен тяжелой цепи антитела, человеческий отдельный вариабельный домен V_{H3} тяжелой цепи отдельный вариабельный домен легкой цепи антитела, человеческий отдельный вариабельный домен легкой цепи антитела, человеческий отдельный вариабельный домен легкой цепи каппа антитела и/или человеческий отдельный вариабельный домен легкой цепи лямбда антитела.

Отдельный вариабельный домен, специфично связывающий сывороточный альбумин, может представлять собой отдельный вариабельный домен, содержащий иммуноглобулиновый каркас или неиммуноглобулиновый каркас. Отдельный вариабельный домен, связывающий сывороточный альбумин, может содержать одну, или две, или три из CDR1, CDR2 и CDR3 из вариабельного домена антитела, предпочтительно от отдельного вариабельного домена, где CDR-область (CDR-области) представлена на неиммуноглобулиновом каркасе, таком как каркас CTLA-4, липокалиновый каркас, каркас стафилококкового белка A (SpA), GroE1 и фибронектиновый каркас, трансферриновый каркас (имеющийся в продаже от Biorex), каркас Avimer™ и Affibody™. Альтернативно, неиммуноглобулиновый отдельный вариабельный домен, связывающий сывороточный альбумин, может не содержать ни CDR-области (CDR-областей) антитела, ни целого связывающего домена антитела. Альтернативно, отдельный вариабельный домен (домены), связывающий сывороточный альбумин, может представлять собой отдельные вариабельные домены, содержащие одну, или две, или три из любых из CDR1, CDR2 и CDR3 из вариабельного домена антитела, предпочтительно отдельного вариабельного домена; эти CDR-области могут быть представлены на каркасной области тяжелой или легкой цепи антитела. Каркасные области включают, например, каркасные области V_H , такие как V_{H3} (включая DP47, DP38 и DP45) и каркасные области V_{HH} , описанные выше, а также каркасные области VL, включая каркасные области V-каппа (как, например, DPK9) и V-лямбда. В некоторых воплощениях вариабельный домен содержит по меньшей мере одну человеческую каркасную область, имеющую аминокислотную последовательность, кодируемую человеческим сегментом гена антитела зародышевого типа, или аминокислотную последовательность, содержащую до 5 аминокислотных различий по отношению к аминокислотной последовательности, кодируемой человеческим сегментом гена антитела зародышевого типа. В других воплощениях вариабельный домен содержит четыре человеческие каркасные области, FW1, FW2, FW2 и FW4, имеющие аминокислотные последовательности, кодируемые человеческим сегментом гена антитела зародышевого типа, или аминокислотные последовательности FW1, FW2, FW2 и FW4, содержащие в общей сложности до 10 аминокислотных различий по отношению к аминокислотным последовательностям, кодируемым человеческим сегментом гена антитела зародышевого типа. В одном воплощении все три CDR-области представлены либо на иммуноглобулиновом каркасе (например, каркасе тяжелой цепи или легкой цепи антитела), либо на неиммуноглобулиновом каркасе, как определено здесь, любой из которых может быть от источника, не являющегося человеком, синтетическим, полусинтетическим. Альтернативно, любая комбинация из одной, двух или трех из CDR1-, CDR2- и/или CDR3-областей представлена либо на иммуноглобулиновом каркасе, либо на неиммуноглобулиновом каркасе, например, либо CDR3-область сама по себе, либо CDR2- и CDR3-области совместно, либо CDR1 и CDR2 представлены либо на иммуноглобулиновом каркасе, либо на неиммуноглобулиновом каркасе. Подходящие каркасы и методики такого CDR-переноса будут ясны специалисту в данной области техники и хорошо известны в данной области техники, см., например, заявку на патент США 07/180370, WO 01/27160, EP 0605522, EP 0460167, заявку на патент США 07/054297, Nicaise et al., Protein Science (2004), 13:1882-1891; Ewert et al., Methods, 2004 Oct; 34(2): 184-199; Kettleborough et al., Protein Eng. 1991 Oct; 4(7): 773-783; O'Brien and Jones, Methods Mol. Biol. 2003: 207: 81-100; и Skerra, J. Mol. Recognit. 2000: 13: 167-187, и Saerens et al., J. Mol. Biol. 2005 Sep 23; 352(3): 597-607, и другие ссылки, приведенные там.

Лиганды могут содержать один или более таких отдельных вариабельных доменов, специфично связывающих сывороточный альбумин, предпочтительно включающих по меньшей мере один отдельный вариабельный домен, специфично связывающий как сывороточный альбумин, эндогенный для людей, так и по меньшей мере один дополнительный сывороточный альбумин, эндогенный для вида, не являющегося человеком. В одном воплощении этот отдельный вариабельный домен специфично связывает сывороточный альбумин, эндогенный для человека, со значением K_d , не более чем в 10 раз превышающим значение K_d , с которым он специфично связывает (т.е. перекрестно взаимодействует с) по меньшей мере один сывороточный альбумин, эндогенный для вида, не являющегося человеком. Альтернативно, этот отдельный вариабельный домен специфично связывает сывороточный альбумин,

эндогенный для человека, со значением K_d , не более чем в 15, 20, 25, 30, 50 или до приблизительно 100 раз превышающим значение K_d , с которым он специфично связывает (т.е. перекрестно взаимодействует с) по меньшей мере один сывороточный альбумин, эндогенный для вида, не являющегося человеком. В некоторых воплощениях K_d может составлять от 300 нМ до приблизительно 5 пМ. В других воплощениях отдельный переменный домен специфично связывает сывороточный альбумин с K_{off} по меньшей мере $5 \times 10^{-1} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^{-2} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^{-6} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^{-7} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^{-8} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^{-9} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^{-10} \text{ c}^{-1}$ или менее, предпочтительно с K_{off} от 1×10^{-6} до $1 \times 10^{-8} \text{ c}^{-1}$.

В одном воплощении этот отдельный переменный домен специфично связывает сывороточный альбумин, эндогенный для первого вида, не являющегося человеком, со значением K_d , не более чем в 10 раз превышающим значение K_d , с которым он специфично связывает (т.е. перекрестно взаимодействует с) по меньшей мере один сывороточный альбумин, эндогенный для второго вида, не являющегося человеком. Альтернативно, этот отдельный переменный домен специфично связывает сывороточный альбумин, эндогенный для первого вида, не являющегося человеком, со значением K_d , не более чем в 15, 20, 25, 30, 50 или до приблизительно 100 раз превышающим значение K_d , с которым он специфично связывает (т.е. перекрестно взаимодействует с) по меньшей мере один сывороточный альбумин, эндогенный для второго вида, не являющегося человеком. В некоторых воплощениях K_d может составлять от 300 нМ до приблизительно 5 пМ. В других воплощениях отдельный переменный домен специфично связывает сывороточный альбумин с K_{off} по меньшей мере $5 \times 10^{-1} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^{-2} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^{-6} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^{-7} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^{-8} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^{-9} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^{-10} \text{ c}^{-1}$ или менее, предпочтительно с K_{off} от 1×10^{-6} до $1 \times 10^{-8} \text{ c}^{-1}$.

Например, такой лиганд может содержать отдельный переменный домен иммуноглобулина, где отдельный переменный домен иммуноглобулина специфично связывает человеческий сывороточный альбумин и мышинный сывороточный альбумин и где период полувыведения $T_{1/2}$ лиганда и период полувыведения $T_{1/2}$ мышинного сывороточного альбумина в мышши-хозяине, по существу, одинаковы. В одной версии такого лиганда эпитопсвязывающий домен содержит неиммуноглобулиновый каркас, специфично связывающий человеческий сывороточный альбумин и мышинный сывороточный альбумин, и где период полувыведения $T_{1/2}$ лиганда и период полувыведения $T_{1/2}$ мышинного сывороточного альбумина в мышши-хозяине, по существу, одинаковы. Фраза "по существу, одинаковый" означает, что лиганд имеет период полувыведения $T_{1/2}$ в мышши-хозяине, составляющий по меньшей мере 50% от периода полувыведения $T_{1/2}$ мышинного сывороточного альбумина в мышши-хозяине, т.е. по меньшей мере 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 105, 110, 125 и до 150% от периода полувыведения $T_{1/2}$ мышинного сывороточного альбумина в мышши-хозяине. Неиммуноглобулиновый каркас может, возможно, содержать фрагменты отдельного переменного домена антитела, такие как одна или более CDR-областей переменного домена антитела, включая отдельный переменный домен антитела, имеющий период полувыведения $T_{1/2}$ в человеке-хозяине, составляющий по меньшей мере 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 105, 110, 125 или до 150% от периода полувыведения $T_{1/2}$ человеческого сывороточного альбумина в человеке-хозяине.

Например, одно воплощение представляет собой отдельный переменный домен, где отдельный переменный домен специфично связывает человеческий сывороточный альбумин и крысиный сывороточный альбумин и где период полувыведения $T_{1/2}$ лиганда и период полувыведения $T_{1/2}$ крысиного сывороточного альбумина в крысе-хозяине, по существу, одинаковы. В одной версии такого лиганда отдельный переменный связывающий домен содержит неиммуноглобулиновый каркас, специфично связывающий человеческий сывороточный альбумин и крысиный сывороточный альбумин, и где период полувыведения $T_{1/2}$ лиганда и период полувыведения $T_{1/2}$ крысиного сывороточного альбумина в крысе-хозяине, по существу, одинаковы. Фраза "по существу, одинаковый" означает, что лиганд имеет период полувыведения $T_{1/2}$ в крысе-хозяине, составляющий по меньшей мере 50% от периода полувыведения $T_{1/2}$ крысиного сывороточного альбумина в крысе-хозяине, т.е. до 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 105, 110, 125 до 150% от периода полувыведения $T_{1/2}$ крысиного сывороточного альбумина в крысе-хозяине. Неиммуноглобулиновый каркас может, возможно, содержать фрагменты отдельного переменного домена антитела, такие как одна или более CDR-областей переменного домена антитела.

Например, лиганд может содержать отдельный переменный домен иммуноглобулина, где отдельный переменный домен иммуноглобулина специфично связывает человеческий сывороточный альбумин и свиной сывороточный альбумин и где период полувыведения $T_{1/2}$ лиганда и период полувыведения $T_{1/2}$ свиного сывороточного альбумина в свинье-хозяине, по существу, одинаковы. В одной версии лиганда эпитопсвязывающий домен содержит неиммуноглобулиновый каркас, специфично связывающий человеческий сывороточный альбумин и свиной сывороточный альбумин, и где период полувыведения $T_{1/2}$ лиганда и период полувыведения $T_{1/2}$ свиного сывороточного альбумина в свинье-хозяине, по существу, одинаковы. Фраза "по существу, одинаковый" означает, что лиганд имеет период полувыведения $T_{1/2}$ в свинье-хозяине, составляющий по меньшей мере 50% от периода полувыведения $T_{1/2}$

свиного сывороточного альбумина в свинье-хозяине, т.е. до 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 105, 110, 125 до 150% от периода полувыведения Т β свиного сывороточного альбумина в свинье-хозяине. Неиммуноглобулиновый каркас может, возможно, содержать фрагменты отдельного варибельного домена антитела, такие как одна или более CDR-области варибельного домена антитела, включая отдельный варибельный домен антитела.

Например, лиганд может содержать отдельный варибельный домен иммуноглобулина, где отдельный варибельный домен иммуноглобулина специфично связывает человеческий сывороточный альбумин и сывороточный альбумин яванского макака и где период полувыведения Т β лиганда и период полувыведения Т β сывороточного альбумина яванского макака в яванском макаке-хозяине, по существу, одинаковы. В одной версии лиганда домен, связывающий сывороточный альбумин, содержит неиммуноглобулиновый каркас, специфично связывающий человеческий сывороточный альбумин и сывороточный альбумин яванского макака, и где период полувыведения Т β лиганда и период полувыведения Т β сывороточного альбумина яванского макака в яванском макаке-хозяине, по существу, одинаковы. Фраза "по существу, одинаковый" означает, что лиганд имеет период полувыведения Т β в яванском макаке-хозяине, составляющий по меньшей мере 50% от периода полувыведения Т β сывороточного альбумина яванского макака в яванском макаке-хозяине, т.е. до 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 105, 110, 125 или до 150% от периода полувыведения Т β сывороточного альбумина яванского макака в яванском макаке-хозяине.

Неиммуноглобулиновый каркас может, возможно, содержать фрагменты отдельного варибельного домена антитела, такие как одна или более CDR-области варибельного домена антитела.

В одном воплощении лиганд и/или лиганд с двойной специфичностью содержит отдельный варибельный домен, специфично связывающий сывороточный альбумин, эндогенный для человека, имеющий период полувыведения Т β в человеке-хозяине, составляющий по меньшей мере 50% от периода полувыведения Т β человеческого сывороточного альбумина в человеке-хозяине, до 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 105, 110, 125 или до 150% от периода полувыведения Т β человеческого сывороточного альбумина в человеке-хозяине. В предпочтительном воплощении отдельный варибельный домен, специфично связывающий сывороточный альбумин, эндогенный для вида, не являющегося человеком, имеет период полувыведения Т β в его соответствующем хозяине, не являющемся человеком, составляющий по меньшей мере 50% от периода полувыведения Т β сывороточного альбумина от источника, не являющегося человеком, в его соответствующем хозяине, не являющемся человеком, до 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 105, 110, 125 или до 150% от периода полувыведения Т β сывороточного альбумина от источника, не являющегося человеком, в его соответствующем хозяине, не являющемся человеком. В предпочтительном воплощении отдельный варибельный домен, специфично связывающий сывороточный альбумин, эндогенный для человека, и также специфично связывающий сывороточный альбумин от по меньшей мере одного вида, не являющегося человеком, имеет период полувыведения Т β в человеке-хозяине, составляющий до 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 105, 110, 125 или до 150% от человеческого сывороточного альбумина в человеке-хозяине, и период полувыведения Т β в хозяине, не являющемся человеком, составляющий до 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 92, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 105, 110, 125 или до 150% от сывороточного альбумина от источника, не являющегося человеком, в его соответствующем хозяине, не являющемся человеком. В некоторых воплощениях период полувыведения Т β отдельного варибельного домена, специфично связывающего сывороточный альбумин, может составлять от 2 до 3 ч, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18, 20, 22 ч, 1 сутки, 2, 3, 4, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 суток включительно, вплоть до 21 суток или более. В человеке-хозяине, а также в хозяине, не являющемся человеком, как, например, свинье-хозяине, яванском макаке-хозяине, крысе-хозяине, мышинном хозяине, мыши-хозяине, период полувыведения Т β отдельного варибельного домена, специфично связывающего сывороточный альбумин, может составлять от 2 до 3 ч, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18, 20, 22 ч, 1 сутки, 2, 3, 4, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 суток включительно, вплоть до 21 суток или более. Другие предпочтительные периоды полувыведения Т β лиганда, содержащего отдельный варибельный домен, специфично связывающий сывороточный альбумин, включают в обезьяне-хозяине от приблизительно 3 до приблизительно 5, 6, 7 или 8 суток, включая от 2 до 3 ч, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18, 20, 22 ч, 1 сутки, 2, 3, 4, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 суток включительно, вплоть до 21 суток. В крысе-хозяине или мыши-хозяине период полувыведения Т β отдельного варибельного домена, специфично связывающего сывороточный альбумин, может составлять от 40 до приблизительно 75 ч и включает от 2 до 3 ч, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, 18, 20, 22 ч, 1 сутки, 2, 3, 4, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 суток включительно, вплоть до 21 суток.

Отдельный варибельный домен, специфично связывающий сывороточный альбумин, включает отдельные варибельные домены V-каппа, выбранные, предпочтительно без ограничения, из DOM7h-9, DOM7h-1, DOM7h-8, DOM7h-9, DOM7h-11, DOM7h-12, DOM7h-13 и DOM7h-14, DOM7r-3 и DOM7r-16, и/или те домены, которые конкурируют за связывание сывороточного альбумина, предпочтительно

человеческого сывороточного альбумина, с отдельными переменными доменами, выбранными, предпочтительно без ограничения, из dAb7r20, dAb7r21, dAb7r22, dAb7r23, dAb7r24, dAb7r25, dAb7r26, dAb7r27, dAb7r28, dAb7r29, dAb7r30, dAb7r31, dAb7r32, dAb7r33, dAb7h21, dAb7h22, dAb7h23, Ab7h24, Ab7h25, Ab7h26, dAb7h27, dAb7h30 dAb7h31, 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. Отдельный переменный домен, специфично связывающий сывороточный альбумин, может представлять собой отдельный переменный домен тяжелой цепи антитела, в частности, человеческий V_{H3} или V_{HH} . Упомянутый выше отдельный переменный домен может также дополнительно специфично связывать человеческий сывороточный альбумин с K_{off} по меньшей мере $5 \times 10^{-1} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^{-2} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^{-3} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^{-4} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^{-5} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^{-6} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^{-7} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^{-8} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^{-9} \text{ c}^{-1}$, $5 \times 10^{-10} \text{ c}^{-1}$ или менее, предпочтительно с K_{off} от $1 \times 10^{-6} \text{ c}^{-1}$ до $1 \times 10^{-8} \text{ c}^{-1}$. Отдельные переменные домены, специфично связывающие человеческий сывороточный альбумин и сывороточный альбумин, эндогенный для вида, не являющегося человеком, могут дополнительно связывать сывороточный альбумин, эндогенный для третьего, четвертого, пятого, шестого, седьмого, восьмого, девятого или десятого вида, не являющегося человеком. В одном неограничивающем воплощении отдельный переменный домен, специфично связывающий человеческий сывороточный альбумин и крысиный сывороточный альбумин, дополнительно специфично связывает сывороточный альбумин яванского макака. В другом неограничивающем воплощении отдельный переменный домен, специфично связывающий человеческий сывороточный альбумин и мышинный сывороточный альбумин, дополнительно специфично связывает сывороточный альбумин яванского макака.

Как описано здесь, лиганд, содержащий один отдельный переменный домен (мономер) или более чем один отдельный переменный домен (мультимер, слитый белок, конъюгат и лиганд с двойной специфичностью, как определено здесь), специфично связывающий сывороточный альбумин, может дополнительно содержать один или более объектов, выбранные, предпочтительно без ограничения, из метки, метки, дополнительного отдельного переменного домена, dAb, антитела, фрагмента антитела, маркера и лекарственного средства. Один или более из этих объектов могут быть расположены либо на С-конце, либо на N-конце, либо как на N-конце, так и на С-конце лиганда, содержащего отдельный переменный домен (либо отдельный переменный домен иммуноглобулина, либо неиммуноглобулиновый отдельный переменный домен). Один или более из этих объектов могут быть расположены на либо С-конце, либо на N-конце, либо как на N-конце, так и на С-конце отдельного переменного домена, специфично связывающего сывороточный альбумин, лиганда, содержащего один отдельный переменный домен (мономер) или более чем один отдельный переменный домен (мультимер, слитый белок, конъюгат, лиганд с двойной специфичностью, как определено здесь). Неограничивающие примеры меток, которые могут быть расположены на одном или обоих из этих концов, включают НА-, his- или тус-метку. Объекты, включающие одну или более метки, метки и лекарственные средства могут быть связаны с лигандом, содержащим один отдельный переменный домен (мономер) или более чем один отдельный переменный домен (мультимер, слитый белок, конъюгат, лиганд с двойной специфичностью, как определено здесь), специфично связывающим сывороточный альбумин, либо непосредственно, либо через линкеры, как описано в отдельном разделе ниже.

Лиганд, содержащий один отдельный переменный домен (мономер) или более чем один отдельный переменный домен (мультимер, слитый белок, конъюгат, лиганд с двойной специфичностью, как определено здесь), специфично связывающий сывороточный альбумин или специфично связывающий как человеческий сывороточный альбумин, так и по меньшей мере один сывороточный альбумин от источника, не являющегося человеком, может специфично связывать один или более из I домена и/или II домена, и/или III домена человеческого сывороточного альбумина, как описано далее ниже. В дополнение к тому, что он содержит один или более отдельных переменных доменов (например, отдельный переменный домен иммуноглобулина, связывающий сывороточный альбумин, или неиммуноглобулиновый отдельный переменный домен, связывающий сывороточный альбумин), специфично связывающие сывороточный альбумин, такой как человеческий сывороточный альбумин, или специфично связывающие как человеческий сывороточный альбумин, так и по меньшей мере один сывороточный альбумин от источника, не являющегося человеком, лиганд может содержать один или более дополнительных доменов, способные специфично связывать антиген и/или эпитоп, отличный от сывороточного альбумина, антиген и эпитоп, выбранный из группы, состоящей из любого животного белка, включая цитокины и/или антигены, имеющие происхождение от микроорганизмов, патогенов, внутриклеточных организмов, насекомых, вирусов, водорослей и растений. Этот один или более дополнительных доменов (домены), связывающий группировку, отличную от сывороточного альбумина, может представлять собой неиммуноглобулиновый связывающий домен, неиммуноглобулиновый отдельный переменный домен и/или отдельный переменный домен иммуноглобулина.

В некоторых воплощениях лиганд с двойной специфичностью, содержащий один или более отдельных переменных доменов (либо отдельный переменный домен иммуноглобулина, либо неиммуноглобулиновый отдельный переменный домен), специфично связывающие сывороточный альбумин, такой как человеческий сывороточный альбумин, или специфично связывающие как человеческий сывороточный альбумин, так и по меньшей мере один сывороточный альбумин от источника, не являющегося человеком, может состоять из (а) отдельного переменного домена, специфично связывающего сывороточный альбумин, и отдельного переменного домена, специфично связывающего лиганд, отличный от сывороточного альбумина, где оба отдельных переменных домена представляют собой отдельный переменный домен тяжелой цепи; или (б) отдельного переменного домена, специфично связывающего сывороточный альбумин, и отдельного переменного домена, специфично связывающего лиганд, отличный от сывороточного альбумина, где оба отдельных переменных домена представляют собой отдельный переменный домен легкой цепи; или (в) отдельный переменный домен, специфично связывающий сывороточный альбумин, представляет собой отдельный переменный домен тяжелой цепи, и отдельный переменный домен, специфично связывающий антиген, отличный от сывороточного альбумина, представляет собой отдельный переменный домен легкой цепи; или (г) отдельный переменный домен, специфично связывающий сывороточный альбумин, представляет собой отдельный переменный домен легкой цепи, и отдельный переменный домен, специфично связывающий антиген, отличный от сывороточного альбумина, представляет собой отдельный переменный домен тяжелой цепи.

Также сюда включена выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая любой из лигандов, описанных здесь, например лиганд, содержащий один отдельный переменный домен (мономер) или более чем один отдельный переменный домен (мультимер, слитый белок, конъюгат, лиганд с двойной специфичностью, как определено здесь), специфично связывающий сывороточный альбумин или специфично связывающий как человеческий сывороточный альбумин, так и по меньшей мере один сывороточный альбумин от источника, не являющегося человеком, или их функционально активные фрагменты. Также сюда включен его вектор и/или вектор экспрессии, клетка-хозяин, содержащая вектор, например растительная или животная клетка, и/или клеточная линия, трансформированная вектором, способ экспрессии и/или получения одного или более лигандов, содержащих один отдельный переменный домен (мономеров) или более чем один отдельный переменный домен (мультимеров, слитых белков, конъюгатов, лигандов с двойной специфичностью, как определено здесь), специфично связывающих сывороточный альбумин, или их фрагмента (фрагментов), кодируемого указанными векторами, включающий, в некоторых случаях, культивирование клеток-хозяев таким образом, что один или более лиганда или их фрагмента экспрессированы, и, возможно, получение лиганда, содержащего один отдельный переменный домен (мономера) или более чем один отдельный переменный домен (мультимера, слитого белка, конъюгата, лиганда с двойной специфичностью, как описано здесь), специфично связывающего сывороточный альбумин, из культуральной среды клеток-хозяев. Также включены способы приведения лиганда, описанного здесь, в контакт с сывороточным альбумином, включая сывороточный альбумин и/или сывороточный альбумин (альбумины) от источника, не являющегося человеком, и/или одной или более мишенями, отличными от сывороточного альбумина, где мишени включают биологически активные молекулы и включают животные белки, цитокины, как перечислено выше, и включены способы, где приведение в контакт осуществляют *in vitro*, а также в форме введения любого из лигандов, описанных здесь, отдельному животному-хозяину или в клетку, *in vivo* и/или *ex vivo*. Предпочтительно введение лигандов, описанных здесь, содержащих отдельный переменный домен (иммуноглобулина или неиммуноглобулиновый), направленный против сывороточного альбумина и/или сывороточного альбумина (альбуминов) от источника, не являющегося человеком, и один или более домена, направленных против одной или более мишеней, отличных от сывороточного альбумина, будет увеличивать период полувыведения, включая период полувыведения Т_{1/2}, лиганда против мишени. Здесь описаны молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие лиганды, содержащие отдельные домены или их фрагменты, включая их функциональные фрагменты. Здесь описаны векторы, кодирующие молекулы нуклеиновых кислот, включая, предпочтительно без ограничения, векторы экспрессии, а также клетки-хозяева из клеточной линии или организма, содержащие один или более из этих векторов экспрессии. Также описаны способы получения любых лигандов, содержащих отдельные домены, включающие, предпочтительно без ограничения, любые из упомянутых выше нуклеиновых кислот, векторов и клеток-хозяев.

Картирование эпитопов сывороточного альбумина

Сывороточные альбумины от видов млекопитающих имеют сходную структуру, содержащую три основных домена со сходным характером свертывания и дисульфидных связей, как подчеркнуто на фиг. 25. Полагают, что белок произошел от двух tandemных дубликаций и последующей дифференциации остатков.

Структура человеческого сывороточного альбумина была выяснена рентгеновской кристаллографией с или без множества связанных лигандов.

Atomic structure and chemistry of human serum albumin. He X.M., Carter D.C.

Nature. 1992; 358: 209-15. Erratum in: Nature 1993; 364: 362.

Atomic structure and chemistry of human serum albumin. He X.M., Carter D.C.; J. Mol. Biol. 2001; 314:955-60.

Crystal structures of human serum albumin complexed with monounsaturated and polyunsaturated fatty acids. Pettipas I., Grune T., Bhattacharya A.A., Curry S.; J. Biol. Chem. 2001; 276: 22804-9.

Было показано, что человеческий сывороточный альбумин представляет собой сердцевидную молекулу. Отдельные домены, называемые I, II и III, являются преимущественно спиральными, и каждый из них состоит из двух субдоменов, называемых IA, IB, IIA, 2B, IIIA и IIIB. Они связаны гибкими случайными спиралями.

Здесь описан лиганд, содержащий один или более отдельные переменные домены, специфично связывающие II домен человеческого сывороточного альбумина. Отдельный переменный домен может представлять собой отдельный переменный домен V_H антитела. Отдельный переменный домен может представлять собой отдельный переменный домен V_{HH} антитела. Отдельный переменный домен V_H может представлять собой отдельный переменный домен V_{H3} . Отдельный переменный домен V_{H3} может представлять собой человеческий отдельный переменный домен V_{H3} . Лиганд может, альтернативно или дополнительно, содержать отдельный переменный домен, представляющий собой отдельный переменный домен антитела V-каппа, включая один из следующих: DOM7h-1, DOM7h-8, DOM7h-9, DOM7h-11, DOM7h-12, DOM7h-13, DOM7h-14, DOM7r-3 и DOM7r-16, или отдельный переменный домен антитела V-каппа, имеющий домен, имеющий аминокислотную последовательность, приблизительно на 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% или более идентичную им.

Отдельный переменный домен антитела может включать набор из четырех каркасных областей (FR) Kabat, кодируемых сегментами генов каркасных областей V_H , предпочтительно V_{H3} , антител зародышевого типа. Каркасная область V_{H3} выбрана из группы, состоящей из DP47, DP38 и DP45. Отдельный переменный домен антитела может включать набор из четырех каркасных областей (FR) Kabat, кодируемых сегментами генов каркасных областей VL, предпочтительно V-каппа, антител зародышевого типа. Предпочтительно каркасная область V-каппа представляет собой DPK9.

Лиганд, содержащий один или более отдельные переменные домены, специфично связывающие II домен человеческого сывороточного альбумина, может дополнительно содержать один или более доменов, способных специфично связывать группировку, отличную от сывороточного альбумина, и может дополнительно содержать один объект или более, включая одно или более из метки, метки и лекарственного средства. Один или более домены, способные специфично связывать группировку, отличную от сывороточного альбумина, могут представлять собой отдельный переменный домен иммуноглобулина. Также здесь описан лиганд, содержащий один или более отдельные переменные домены, специфично связывающие II домен человеческого сывороточного альбумина, содержащие неиммуноглобулиновый каркас и CDR1-, CDR2- и/или CDR3-области, или где по меньшей мере одна из CDR1-, CDR2- и/или CDR3-областей имеет происхождение из отдельного переменного домена отдельного переменного домена антитела, связывающего II домен человеческого сывороточного альбумина. Неиммуноглобулиновые каркасы включают, преимущественно без ограничения, CTLA-4, липокалин, стафилококковый белок A (SPA), Affibody™, Avimer™, GroEl и фибронектин.

Лиганд, содержащий один или более отдельных переменных доменов, специфично связывающие II домен человеческого сывороточного альбумина, содержит те домены, которые специфично связывают человеческий сывороточный альбумин с K_d менее или равной 300 нМ. Лиганд, содержащий один или более отдельные переменные домены, специфично связывающий II домен человеческого сывороточного альбумина, может дополнительно содержать один или более объекты, включая одно или более из метки, метки и лекарственного средства. Метка может включать одну или более из C-концевых HA- или тус-меток или N-концевых HA- или тус-меток.

Лиганд, содержащий один или более отдельных переменных доменов, специфично связывающий II домен человеческого сывороточного альбумина, и который может дополнительно содержать один или более домены, способные специфично связывать группировку, отличную от сывороточного альбумина, и который может дополнительно содержать один или более объекты, включая одно или более из метки, метки и лекарственного средства, может связывать через по меньшей мере один из его отдельных переменных доменов антиген, включая, предпочтительно без ограничения, рецептор цитокинов, рецептор EPO, ApoE, Apo-SAA, BDNF, кардиотрофин-1, EGF, рецептор EGF, ENA-78, эотаксин, эотаксин-2, Exodus-2, EpoR, кислый FGF, основной FGF, фактор роста фибробластов-10, лиганд FLT3, фракталин (CX3C), GDNF, G-CSF, GM-CSF, GF- β 1, инсулин, IFN- γ , IGF-I, IGF-II, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (72 a.a.), IL-8 (77 a.a.), IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 (IGIF), ингибин α , ингибин β , IP-10, фактор роста кератиноцитов-2 (KGF-2), KGF, лептин, LIF, лимфотактин, мюллерову ингибирующую субстанцию, моноцитарный колониеингибирующий фактор, моноцитарный аттрактантный белок, M-CSF, MDC (67 a.a.), MDC (69 a.a.), MCP-1 (MCAF), MCP-2, MCP-3, MCP-4, MDC (67 a.a.), MDC (69 a.a.), MIG, MLP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α , MIP-3 β , MIP-4, фактор,

ингибирующий миелоидных предшественников, 1 типа (MPLIF-1), NAP-2, неуртурин, фактор роста нервов, β -NGF, NT-3, NT-4, онкостатин M, 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 , рецептор TNF 1 типа, рецептор TNF 2 типа, TNIL-1, TPO, VEGF, рецептор VEGF 1 типа, рецептор VEGF 2 типа, рецептор VEGF 3 типа, GCP-2, GRO/MGSA, GRO- β , GRO- γ , HCC1, I-309, HER 1, HER 2, HER 3 и HER 4, CD4, человеческие рецепторы хемокинов CXCR4 или CCR5, неструктурный белок 3 типа (NS3) вируса гепатита С, TNF-альфа, IgE, IFN-гамма, MMP-12, CEА, *H. pylori*, TB, вирус гриппа, гепатита Е, MMP-12, интернализуемые рецепторы, сверхэкспрессируемые на определенных клетках, такие как рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), рецептор EгBb2 на опухолевых клетках, интернализуемый клеточный рецептор, рецептор LDL, рецептор FGF2, рецептор EгBb2, рецептор трансферрина, рецептор PDGF, рецептор VEGF, PsmAg, белок внеклеточного матрикса, эластин, фибронектин, ламинин, α 1-антитрипсин, тканевой фактор, ингибирующий протеазы, PDK1, GSK1, Bad, каспазу-9, Forkhead, антиген *Helicobacter pylori*, антиген *Mycobacterium tuberculosis* и антиген вируса гриппа.

Лиганд, содержащий один или более отдельных переменных доменов, специфично связывающий II домен человеческого сывороточного альбумина, и который может дополнительно содержать один или более домены, способные специфично связывать группировку, отличную от сывороточного альбумина, представляет собой, по меньшей мере, лиганд с двойной специфичностью, который может иметь одну из следующих структур: (а) каждый указанный отдельный переменный домен, специфично связывающий II домен сывороточного альбумина, и указанный отдельный переменный домен, специфично связывающий группировку, отличную от сывороточного альбумина, представляет собой отдельный переменный домен тяжелой цепи антитела; или (б) каждый указанный отдельный переменный домен, специфично связывающий II домен сывороточного альбумина, и указанный отдельный переменный домен, специфично связывающий группировку, отличную от сывороточного альбумина, представляет собой отдельный переменный домен легкой цепи антитела; или (в) указанный отдельный переменный домен, специфично связывающий II домен сывороточного альбумина, представляет собой отдельный переменный домен тяжелой цепи антитела, и указанный отдельный переменный домен, специфично связывающий антиген, отличный от сывороточного альбумина, представляет собой отдельный переменный домен легкой цепи антитела; или (г) указанный отдельный переменный домен, специфично связывающий II домен сывороточного альбумина, представляет собой отдельный переменный домен легкой цепи антитела, и указанный отдельный переменный домен, специфично связывающий антиген, отличный от сывороточного альбумина, представляет собой отдельный переменный домен тяжелой цепи антитела. Включены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие любые лиганды или их фрагменты, включая их функциональные фрагменты, описанные здесь, векторы, включая, предпочтительно без ограничения, векторы экспрессии, и клетки-хозяева любого типа клеточной линии или организма, содержащие один или более из этих векторов экспрессии и/или способы получения любых лигандов, включающие, предпочтительно без ограничения, любые из упомянутых выше нуклеиновых кислот, векторов и клеток-хозяев.

Сывороточный альбумин имеет длительный период полувыведения в сыворотке по сравнению с другими белками сыворотки вместе с прямой зависимостью между концентрацией в сыворотке и фракционной интенсивностью катаболизма (т.е. чем выше концентрация сывороточного альбумина (SA), тем большее количество деградирует), общее свойство с IgG. Недавно было выяснено, что как у IgG, так и у сывороточного альбумина одинаковый механизм рециклинга, опосредованный неонатальным Fc-рецептором FcRn. FcRn является членом семейства молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) I типа, состоящим из гетеродимера мембранно закрепленной цепи FCRGT и не являющегося мембранно связанным бета-2-микроглобулина. Мышиные нокаутные мутанты либо по FcRn, либо по бета-2-микроглобулину не экспрессируют функциональных FcRn и демонстрируют увеличенную интенсивность биосинтеза сывороточного альбумина (увеличение приблизительно на 20%) и повышенный катаболизм сывороточного альбумина, приводящий к 40% снижению уровня сывороточного альбумина с более коротким периодом полувыведения (Chaudhry et al. 2005). Было показано, что у людей мутации бета-2-микроглобулина приводят к сильному снижению уровней функционального FcRn и, в конечном счете, к недостаточности IgG и гипоальбуминемии, характеризующейся уменьшенным периодом полувыведения HSA в сыворотке (Wani et al. 2006, PNAS).

Без желания быть связанными теорией, предложенный механизм реутилизации, опосредованной FcRn, является следующим.

1. Белки плазмы подвергаются пиноцитозу клетками эндотелия, выстилающими все кровеносные сосуды и, возможно, клетками с пиноцитарной активностью из внесосудистого компартмента. Эта стадия является неспецифической и происходит поглощение всех циркулирующих белков. FcRn имеет очень низкую аффинность к альбумину (и IgG) при сывороточном pH, приблизительно при pH 7,4.

2. После пиноцитоза в везикулах происходит закисление до pH 5,0. В кислых условиях FcRn имеет более высокую аффинность к альбумину и связывает альбумин и также IgG. Таким образом, альбумин и

IgG связываются с рецептором FcRn. FcRn связывает человеческий сывороточный альбумин в области в III домене через область, отличную от области, связывающей IgG.

3. Происходит сортировка, посредством которой большинство белков, не связанных с рецепторами, подвергаются сортировке в эндосому, где большинство белков будут направлены на деградацию. Связанные с рецептором альбумин и IgG подвергаются сортировке в везикулу, направляемую к поверхности клетки и, таким образом, сберегаемую от деградации.

4. Везикула, направленная к клеточной поверхности, затем либо сливается с клеточной поверхностью, либо, кратко, сливается с клеточной мембраной. В этих условиях pH эндосомы увеличивается до приблизительно pH 7,4, аффинность FcRn к альбумину снижается, и альбумин высвобождается обратно в циркуляцию.

Таким образом, авторы изобретения могут определить четкий набор желаемых параметров для любого белка, связывающего SA, для того, чтобы он имел максимальный период полувыведения. Эти параметры могут быть ясно проиллюстрированы с использованием реутилизационного рецептора сывороточного альбумина FcRn в качестве модели, хотя будут использованы также другие рецепторы, опосредующие длительный период полувыведения:

аффинность связывания сывороточного альбумина будет предпочтительно такой, что белок, связывающий SA, не диссоциирует от сывороточного альбумина при прохождении клубочковой фильтрации в почке, минимизируя, таким образом, потери с мочой, и/или

связывание SA не будет предпочтительно оказывать отрицательное воздействие на связывание сывороточного альбумина с любыми рецепторами, обуславливающими поддержание уровней сывороточного альбумина в циркуляции, поскольку это будет ингибировать рециклинг и, таким образом, снижать период полувыведения как сывороточного альбумина, так и белка, связывающего SA; таким образом, dAb, связывающие SA, предпочтительно связывают эпитоп, отличный от эпитопа, связываемого FcRn на III домене HSA, и комплекс SA/dAb предпочтительно также способен связывать FcRn, и/или

связывание с SA будет предпочтительно сохраняться при условиях, при которых рецептор и комплекс связанный SA/белок, связывающий SA, подвергается сортировке и рециклингу; было показано, что эндосомальный pH приближается к pH 5,0, следовательно, желательно стабильное связывание dAb с сывороточным альбумином как при pH 7,4, так и при pH 5,0.

Как показано в примере 15 ниже, большинство dAb связывают 2 домена HSA, и, следовательно, ожидают, что они не будут конкурировать со связыванием человеческого сывороточного альбумина с FcRn. Два dAb (DOM7h-27 и DOM7h-30) связывают III домен.

dAb против SA, сохраняющее достаточную аффинность к SA в диапазоне pH от 7,4 до 5,0

В дополнение к аффинности к SA, а также в отсутствие конкуренции с образованием комплексов SA:FcRn, специфичные в отношении сывороточного альбумина dAb будут предпочтительно сохранять аффинность к SA в диапазоне pH от pH 7,4 в сыворотке до pH 5,0 в эндосоме для получения полного преимущества FcRn-опосредованного пути реутилизации.

В этом диапазоне pH только гистидиновые остатки и боковые цепи аминокислот с отклоненной pKa, вероятно, изменяют свое состояние протонирования. Если боковые цепи аминокислот вносят существенный вклад в энергию связывания комплекса, можно ожидать, что изменение pH от одной крайней точки до другой крайней точки диапазона может приводить к снижению аффинности связывания комплекса. Без желания быть связанными теорией это будет, в свою очередь, приводить к увеличению вероятности того, что dAb, специфичное в отношении SA, скорее пойдет по пути деградации, чем будет вызволено посредством FcRn-опосредованного пути реутилизации.

Таким образом, для связывающего SA AlbuAbTM (dAb, специфично связывающего сывороточный альбумин) желательно выбрать такое, у которого характеристики связывания сывороточного альбумина значимо не изменяются при изменении pH (в диапазоне от 5,0 до 7,4). Непосредственным способом подтверждения этого будет анализ аминокислотных последовательностей dAb против SA на отсутствие гистидиновых остатков в CDR. Как показано ниже, для такого свойства могут быть предусмотрены несколько способов селекции.

Например, первый раунд селекции проводят с "интактным" фаговым репертуаром dAb с использованием иммобилизованного человеческого сывороточного альбумина в условиях, где pH буфера представляет собой pH 7,4 (например, забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS)). Выделенную и амплифицированную фаговую популяцию затем подвергают второму раунду селекции, где pH инкубационного буфера составляет 5,0. Смену буферов и pH, возможно, повторяют в других раундах для поддержания селекционного давления для связывания dAb с HSA при обоих pH.

Во втором примере все раунды селекции проводят с "интактным" фаговым репертуаром dAb с использованием иммобилизованного человеческого сывороточного альбумина в условиях, где pH буфера представляет собой pH 7,4 (например, PBS). Тем не менее, сразу после промывания несвязанного фага с использованием PBS (или PBS, дополненного Tween) и перед элюированием связанного фага добавляют дополнительную стадию промывки/инкубации при pH 5,0 в течение длительного периода

времени (например, до 4 ч). В течение этого времени фаг, на котором представлены dAb, не способные связывать SA при pH 5,0 (но способные связывать при pH 7,4), отделяют от иммобилизованного SA. После второй серии стадий промывки (при pH 5,0 с (без) Tween) связанный фаг выделяют и анализируют.

В третьем примере все раунды селекции проводят с "интактным" фаговым репертуаром dAb с использованием иммобилизованного человеческого сывороточного альбумина в условиях, где pH буфера представляет собой pH 7,4 (например, PBS). Наилучшие dAb-кандидаты (т.е. способные к связыванию при pH 7,4 и pH 5,0) затем устанавливают посредством скрининга. Обычно гены, кодирующие dAb, выделяют от пула селектируемого фага, субклонировать в вектор экспрессии, направляющий растворимое dAb в супернатант культур *E.coli*. Отдельные клоны собирают, выращивают по отдельности в лунках титрационного микропланшета и индуцируют для экспрессии. Супернатанты (или очищенные dAbs) затем непосредственно наносят на чип Biacore для определения тех dAb, которые демонстрируют аффинность к иммобилизованному сывороточному альбумину. Каждый супернатант подвергают скринингу на связывание (главным образом по кривой скорости диссоциации на сенсограмме) с HSA в условиях, где pH буфера для проведения эксперимента составляет либо 7,4, либо 5,0. Следует отметить, что скрининг связывания dAb на Biacore может также быть использован как предпочтительный способ для идентификации лучших dAb из двух вышеописанных примеров.

Здесь описан лиганд, содержащий отдельный вариабельный домен, как определено здесь, где отдельный вариабельный домен специфично связывает сывороточный альбумин как при естественном pH сыворотки, так и при pH внутриклеточной везикулы. Естественный pH сыворотки составляет приблизительно 7 (например, 7,4), и указанный pH внутриклеточной везикулы может варьировать от приблизительно 4,8 до 5,2, или может представлять собой pH приблизительно 5. В одном воплощении отдельный вариабельный домен может специфично связывать сывороточный альбумин в диапазоне pH приблизительно от 7 до 5 или при pH 7,4. Без желания быть связанными теорией, дополнительная характеристика этого лиганда состоит в том, что его отдельный вариабельный домен, специфично связывающий сывороточный альбумин, по существу, не диссоциирует от сывороточного альбумина при прохождении клубочковой фильтрации в почке. Без желания быть связанными теорией, дополнительная характеристика этого лиганда состоит в том, что его отдельный вариабельный домен, специфично связывающий сывороточный альбумин, по существу, не препятствует связыванию FcRn с сывороточным альбумином. Этот отдельный вариабельный домен может представлять собой отдельный вариабельный домен антитела; отдельный вариабельный домен антитела может представлять собой домен V_{H3} и/или отдельный вариабельный домен антитела может представлять собой домен V-каппа. Этот отдельный вариабельный домен может содержать неиммуноглобулиновый каркас, например каркасы CTLA-4, липокалиновые каркасы, каркасы SpA, Affibody™, GroEl, Avimer™ или фибронектиновые каркасы, и может содержать одну или более из CDR1, CDR2 и/или CDR3 из отдельного вариабельного домена антитела, предпочтительно, но не обязательно, специфично связывающего сывороточный альбумин. Отдельный вариабельный домен (домены) этого лиганда может специфично связывать человеческий сывороточный альбумин и/или, включая сывороточный альбумин от одного или более видов, например, человека, крысы, обезьяны, свиньи, кролика, хомяка, мыши или козы. Внутриклеточный компартмент может представлять собой любой внутриклеточный компартмент любой клетки любого животного, включая эндосомальный компартмент или внутриклеточную везикулу, либо отпочковывающуюся везикулу. Эндосомальный компартмент может иметь pH приблизительно 5 или 5,0. Лиганды, описанные здесь, могут содержать один или более отдельные вариабельные домены, включая домены иммуноглобулинов и/или неиммуноглобулиновые домены, где связывание сывороточного альбумина с отдельным вариабельным доменом, по существу, не оказывает конкурентного ингибирования на связывание FcRn с сывороточным альбумином. Эти один или более отдельные вариабельные домены могут предпочтительно специфично связывать сывороточный альбумин с равновесной константой диссоциации (K_d), меньшей или равной 300 нМ.

Здесь описан способ селекции лиганда, содержащего отдельный вариабельный домен, содержащего один отдельный вариабельный домен (мономера) или более чем один отдельный вариабельный домен (мультимера, слитого белка, конъюгата, лиганда с двойной специфичностью, как определено здесь), специфично связывающего, сывороточный альбумин, где отдельный вариабельный домен специфично связывает человеческий сывороточный альбумин при естественном pH сыворотки, где отдельный вариабельный домен не оказывает конкурентного ингибирования на связывание человеческого сывороточного альбумина с FcRn и где отдельный вариабельный домен специфично связывает человеческий сывороточный альбумин при pH внутриклеточного компартмента, включающий стадии: (а) селекции лигандов, содержащих отдельный вариабельный домен, не связывающий области человеческого сывороточного альбумина, связывающие FcRn; (б) селекции, из лигандов, селектированных на стадии (а), лигандов, содержащих отдельный вариабельный домен, связывающий сывороточный альбумин при указанном естественном pH сыворотки; (в) селекции лигандов, селектированных на стадии (б), на лиганды, содержащие отдельный вариабельный домен, связывающий сывороточный альбумин при pH указанного внутриклеточного компартмента. Альтернативно, стадии (а)

и (б) можно поменять местами следующим образом: (а) селекция лигандов, содержащих отдельный вариабельный домен, связывающий человеческий сывороточный альбумин при указанном естественном рН сыворотки; (б) селекция, из лигандов, селективированных на стадии (а), лигандов, содержащих отдельный вариабельный домен, связывающий человеческий сывороточный альбумин вне областей HSA, связывающих FcRn; и (в) селекция, из лигандов, селективированных на стадии (б), лигандов, связывающих сывороточный альбумин при указанном рН указанного внутриклеточного компартмента. Также описан способ селекции лиганда, содержащего отдельный вариабельный домен, где отдельный вариабельный домен специфично связывает человеческий сывороточный альбумин при естественном рН сыворотки, где отдельный вариабельный домен не оказывает конкурентного ингибирования на связывание человеческого сывороточного альбумина с FcRn и где отдельный вариабельный домен специфично связывает человеческий сывороточный альбумин при рН внутриклеточного компартмента, включающий стадии: (а) селекции лигандов, содержащих отдельный вариабельный домен, не связывающий области человеческого сывороточного альбумина, связывающие FcRn; (б) селекции, из лигандов, селективированных на стадии (а), лигандов, содержащих отдельный вариабельный домен, связывающий сывороточный альбумин при указанном естественном рН сыворотки; и (в) генетической модификации отдельного вариабельного домена стадии (б) таким образом, чтобы он связывал сывороточный альбумин при указанном рН указанного внутриклеточного компартмента. Альтернативно, стадии (а) и (б) можно поменять местами следующим образом: (а) селекция лигандов, содержащих отдельный вариабельный домен, связывающий сывороточный альбумин при указанном естественном рН сыворотки; (б) селекция, из лигандов, селективированных на стадии (а), лигандов, содержащих отдельный вариабельный домен, не связывающий области человеческого сывороточного альбумина, связывающие FcRn; и (в) генетическая модификация отдельного вариабельного домена стадии (б) таким образом, чтобы он связывал сывороточный альбумин при указанном рН указанного внутриклеточного компартмента.

Исследование для определения того, что отдельный вариабельный домен не оказывает конкурентного ингибирования на связывание человеческого сывороточного альбумина с FcRn. Конкурентный эксперимент Biacore может быть использован для определения того, оказывает ли отдельный вариабельный домен конкурентное ингибирование на связывание сывороточного альбумина с FcRn. Один экспериментальный протокол для такого примера представляет собой следующий. После покрытия сенсорного чипа CM5 (Biacore AB) при 25°C приблизительно 1100 резонансными единицами (RU) очищенного FcRn при рН 7,4, человеческий сывороточный альбумин (HSA) наносят на антигенную поверхность в одной концентрации (например, 1 мкМ) сам по себе и в комбинации с серийными разведениями смесей, каждая из которых содержит HSA и возрастающие количества рассматриваемого отдельного вариабельного домена. Получаемые RU связывания определяют для HSA самого по себе и каждой из смесей HSA/отдельный вариабельный домен. При сравнении связанных RU HSA самого по себе со связанными RU HSA + отдельный вариабельный домен можно будет видеть, конкурирует ли FcRn с отдельным вариабельным доменом за связывание HSA. Если он конкурирует, то с увеличением концентрации отдельного вариабельного домена в растворе RU HSA, связанного с FcRn, будут уменьшаться. Если конкуренции нет, то добавление отдельного вариабельного домена не будет оказывать влияния на то, какое количество HSA связывается с FcRn. Это конкурентное исследование может, возможно, быть повторено при рН 5,0 для отдельного вариабельного домена, связывающего HSA при рН 5,0, для определения того, оказывает ли отдельный вариабельный домен конкурентное ингибирование на связывание сывороточного альбумина с FcRn при рН 5,0.

Эти лиганды, имеющие отдельный вариабельный домен, содержащий один отдельный вариабельный домен (мономер) или более чем один отдельный вариабельный домен (мультимер, слитый белок, конъюгат, лиганд с двойной специфичностью, как определено здесь), специфично связывающий сывороточный альбумин, где отдельный вариабельный домен специфично связывает сывороточный альбумин как при естественном рН сыворотки, так и при рН внутриклеточной везикулы, могут дополнительно содержать по меньшей мере один дополнительный отдельный вариабельный домен, где каждый дополнительный отдельный вариабельный домен специфично связывает антиген, отличный от сывороточного альбумина, при естественном рН сыворотки, но не связывает антиген при рН внутриклеточной везикулы. Естественный рН сыворотки составляет приблизительно 7,4, и рН указанной внутриклеточной везикулы варьирует от приблизительно 4,8 до 5,2, и в некоторых воплощениях рН указанной внутриклеточной везикулы составляет приблизительно 5.

Способ, основанный на изложенных выше замыслах, включает применение биспецифичного связывающего агента с аффинностью к сывороточному альбумину для увеличения периода полувыведения и аффинностью к желаемому антигену-мишени, как описано выше, для направления связанного антигена на деградацию или рециклинг. Как описано выше, группировку, связывающую сывороточный альбумин, селективируют таким образом, что аффинность связывания высока при рН 5,0 таким образом, что молекула будет отсортирована, чтобы не быть направленной на деградацию в эндосоме посредством FcRn-опосредованного процесса. Группировку, связывающую желаемый антиген-мишень, затем селективируют с применением сходной методики, как описано выше, за исключением того,

что вместо селекции на высокую аффинность связывания при рН 7,4 и рН 5, как описано выше, проводят селекцию на высокую аффинность связывания при рН 7,4 и низкую или нулевую аффинность к антигену-мишени при рН 5. Одним способом достижения этого является селекция группировок с гистидинами на контактной поверхности. Слитый белок из 2 молекул затем получают обычными молекулярно-биологическими методиками, либо химической дериватизацией и перекрестным сшиванием, либо генетическим слиянием. Результатом является увеличение активности данного AlbuAb™ (dAb, специфично связывающего сывороточный альбумин) *in vivo*, разработкой SA-связывающего dAb, связывающего SA при рН 5, имеющего в то же время dAb-партнера, связывающего лиганд, имеющего низкую или нулевую аффинность при рН 5. Без желания быть связанными теорией, после эндосомального рециклинга молекула-мишень будет высвобождена и направлена в эндосому для деградации и разрушена, в то время как AlbuAb™ (dAb, специфично связывающее сывороточный альбумин) рециклирует со связыванием свежего лиганда посредством FcRn-опосредованного рециклинга. В этом способе предложено ключевое преимущество над связанными с полиэтиленгликолем (ПЭГилированными) молекулами или другими технологиями увеличения периода полувыведения, где этот метаболический путь недоступен для регенерации. Предположительно, в этих случаях связанный лиганд просто расположен на ПЭГилированной группировке и занимает ее.

Здесь описан способ направления антигена на деградацию, включающий введение лиганда, имеющего по меньшей мере один отдельный вариабельный домен, где отдельный вариабельный домен специфично связывает сывороточный альбумин как при естественном рН сыворотки, так и при рН внутриклеточной везикулы, и дополнительно имеющий по меньшей мере один дополнительный отдельный вариабельный домен, где отдельный вариабельный домен связывает антиген, отличный от сывороточного альбумина, при естественном рН сыворотки, но не связывает антиген при рН внутриклеточной везикулы, направляя, таким образом, антиген, отличный от сывороточного альбумина, на деградацию. Также здесь описан лиганд, дополнительно содержащий по меньшей мере один дополнительный отдельный вариабельный домен, где указанный отдельный вариабельный домен специфично связывает антиген, отличный от сывороточного альбумина, при естественном рН сыворотки, но не связывает указанный антиген при рН внутриклеточной везикулы.

Селекция dAb *in vitro* в присутствии метаболитов

Лиганды, описанные здесь, включают лиганд, содержащий отдельный вариабельный домен, содержащий один отдельный вариабельный домен (мономер) или более чем один отдельный вариабельный домен (например, мультимер, слитый белок, конъюгат и лиганд с двойной специфичностью, как определено здесь), специфично связывающий сывороточный альбумин, где отдельный вариабельный домен специфично связывает человеческий сывороточный альбумин и где связывание лекарственных средств и/или метаболитов, и/или малых молекул с одной или более областями сывороточного альбумина существенно не блокирует специфичное связывание сывороточного альбумина отдельным вариабельным доменом. Одна или более области человеческого сывороточного альбумина включают область Sudlow 1 и область Sudlow 2. Одна или более области могут быть расположены на любой комбинации одного или более доменов человеческого сывороточного альбумина, выбранных из группы, состоящей из I домена, II домена и III домена.

Лиганды, описанные здесь, включают лиганд, содержащий отдельный вариабельный домен, содержащий один отдельный вариабельный домен (мономер) или более чем один отдельный вариабельный домен (например, мультимер, слитый белок, конъюгат и лиганд с двойной специфичностью, как определено здесь), специфично связывающий сывороточный альбумин, где отдельный вариабельный домен специфично связывает человеческий сывороточный альбумин и где специфичное связывание сывороточного альбумина указанным отдельным вариабельным доменом не изменяет характеристики связывания сывороточного альбумина для лекарственных средств и/или метаболитов, и/или малых молекул, связываемых с SA. В одном воплощении отдельный вариабельный домен лиганда связывает сывороточный альбумин как в присутствии, так и в отсутствие лекарственного средства, метаболита или другой малой молекулы. И в другом воплощении специфичное связывание сывороточного альбумина указанным отдельным вариабельным доменом, по существу, не изменяет характеристики связывания сывороточного альбумина для лекарственных средств и/или метаболитов, и/или малых молекул, связываемых с SA в природе *in vivo*, включая, предпочтительно без ограничения, те лекарственные средства и/или метаболиты, и/или малые молекулы, описанные в Fasano et al. (2005), 57(12):787-96. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin, и Bertucci, C. et al. (2002), 9(15): 1463-81, Reversible and covalent binding of drugs to human serum albumin: methodological approaches and physiological relevance.

Лекарственные средства, и/или метаболиты, и/или малые молекулы, связываемые с SA, могут перекрываться или могут не перекрываться с лекарственными средствами, и/или метаболитами, и/или малыми молекулами, по существу, не ингибирующими или не конкурирующими с сывороточным альбумином за связывание с отдельным вариабельным доменом. Лекарственные средства и/или метаболиты включают, предпочтительно без ограничения, варфарин, ибупрофен, витамин B6, тета-

билирубин, гемин, тироксин, жирные кислоты, ацетальдегид, метаболиты жирных кислот, ацилглюкуронид, метаболиты билирубина, галотан, салицилат, бензодиазепины и 1-О-гемифиброзил-В-Д-глюкуронид. Это ингибирование или конкуренция малых молекул с сывороточным альбумином за связывание с отдельным переменным доменом может происходить как посредством прямого вытеснения, так и посредством аллостерических эффектов, как описано для изменений связывания одних малых молекул, индуцированных связыванием другой малой молекулы, см. Ascenzi et al. (2006), *Mini Rev. Med. Chem.* 6(4):483-9. Allosteric modulation of drug binding to human serum albumin, и Ghuman J. et al. (2005), *J. Mol. Biol.* 353(1):38-52 Structural basis of the drug-binding to human serum albumin. В одном воплощении малая молекула, либо сама по себе, либо совместно с одной или более другими малыми молекулами и/или метаболитами, и/или белками, и/или лекарственными средствами, связывает сывороточный альбумин. В другом воплощении малая молекула, либо сама по себе, либо совместно с одной или более другими малыми молекулами и/или метаболитами, и/или белками, и/или лекарственными средствами, по существу, не ингибирует или не конкурирует с сывороточным альбумином за связывание с отдельным переменным доменом. В другом воплощении малая молекула, либо сама по себе, либо совместно с одной или более другими малыми молекулами и/или метаболитами, и/или белками, и/или лекарственными средствами, существенно ингибирует или конкурирует с сывороточным альбумином за связывание с отдельным переменным доменом.

Отдельный переменный домен может представлять собой отдельный переменный домен антитела. Отдельный переменный домен антитела может представлять собой домен V_H3 . Отдельный переменный домен антитела может представлять собой домен V-каппа. Отдельный переменный домен может содержать один или более неиммуноглобулиновые каркасы. Неиммуноглобулиновый каркас может включать одно или более из, предпочтительно без ограничения, CTLA-4, липокалина, SpA, GroEl и фибронектина и включает Affibody™ и Avimer™.

Здесь описан способ селекции отдельного переменного домена, связывающего сывороточный альбумин, включающий селекцию первого отдельного переменного домена по его способности связывать сывороточный альбумин в присутствии одного или более метаболитов и/или лекарственных средств, где селекцию проводят в присутствии одного или более метаболитов и/или лекарственных средств. Также здесь описан способ получения лиганда с двойной специфичностью, содержащего первый отдельный переменный домен иммуноглобулина, имеющий первую специфичность связывания в отношении сывороточного альбумина в присутствии одного метаболита и/или лекарственного средства, и второй отдельный переменный домен иммуноглобулина, имеющий вторую специфичность связывания, включающий стадии: а) селекции первого переменного домена по его способности связывать первый эпитоп в присутствии одного или более метаболитов и/или лекарственных средств; б) селекции второго переменного домена по его способности связывать второй эпитоп; в) комбинирования переменных доменов и г) селекции лиганда по его способности связывать сывороточный альбумин в присутствии указанных одного или более метаболитов и/или лигандов и способности связывать указанные вторые эпитопы. Этот способ может также включать стадию, где первый переменный домен селекционируют для связывания указанного первого эпитопа в отсутствие комплементарного переменного домена и/или где первый переменный домен селекционируют для связывания указанного первого эпитопа в присутствии третьего комплементарного переменного домена, где указанный третий переменный домен отличается от указанного второго переменного домена. Эти стадии селекции могут быть проведены в присутствии смеси метаболитов и/или лекарственных средств, и/или белков, и/или малых молекул. Стадии селекции могут также быть проведены следующим образом: (а) селекция отдельных переменных доменов, связывающих сывороточный альбумин в присутствии первого метаболита и/или лекарственного средства, и/или малой молекулы; и (б) из доменов, селекционированных на стадии (а) селекционируют домен в присутствии второго метаболита и/или лекарственного средства, и/или малой молекулы. Также включен способ получения лиганда с двойной специфичностью, имеющего первый отдельный переменный домен иммуноглобулина, имеющий первую специфичность связывания в отношении сывороточного альбумина в присутствии одного метаболита и/или лекарственного средства, и/или малой молекулы, и второй отдельный переменный домен иммуноглобулина, имеющий вторую специфичность связывания, включающий стадии: а) селекции первых переменных доменов по их способности связывать сывороточный альбумин в присутствии одного или более метаболитов и/или лекарственных средств, и/или малых молекул; б) селекции вторых переменных доменов по их способности связывать эпитоп; в) комбинирования переменных доменов для предоставления лигандов, содержащих первый и второй отдельный переменный домен; и г) селекции, из лигандов предоставленных на стадии (в), лиганда по его способности связывать сывороточный альбумин в присутствии одного или более метаболитов и/или лекарственных средств и его способности связывать указанные эпитопы, с получением посредством этого лиганда с двойной специфичностью. В одном воплощении первый переменный домен селекционируют для связывания сывороточного альбумина в отсутствие комплементарного переменного домена. В другом воплощении первый переменный домен селекционируют для связывания первого эпитопа в присутствии комплементарного переменного домена, где комплементарный переменный

домен отличается от второго переменного домена.

Здесь описан лиганд, содержащий отдельный переменный домен, где отдельный переменный домен специфично связывает сывороточный альбумин *in vitro* как при pH 7, так и при pH внутриклеточного компартмента, и где отдельный переменный домен представляет собой отдельный переменный домен, не встречающийся в природе. Также здесь описан лиганд, содержащий отдельный переменный домен антитела, где отдельный переменный домен антитела специфично связывает сывороточный альбумин *in vitro* как при pH 7, так и при pH внутриклеточного компартмента. В одном воплощении pH внутриклеточного компартмента составляет от 4,8 до 5,2. В другом воплощении связывание сывороточного альбумина с отдельным переменным доменом антитела, по существу, не ингибирует связывание FcRn с сывороточным альбумином, как определено в *in vitro* конкурентном исследовании поверхностного плазмонного резонанса. В другом воплощении отдельный переменный домен антитела представляет собой отдельный переменный домен тяжелой цепи антитела. В дополнительных воплощениях отдельный переменный домен тяжелой цепи антитела может представлять собой отдельный переменный домен V_{H3}, и отдельный переменный домен V_{H3} может представлять собой человеческий отдельный переменный домен V_{H3}. В другом воплощении отдельный переменный домен антитела представляет собой отдельный переменный домен легкой цепи антитела. В одном воплощении отдельный переменный домен легкой цепи антитела представляет собой отдельный переменный домен V-каппа, и в другом воплощении представляет собой отдельный переменный домен V-лямбда.

В другом воплощении отдельный переменный домен содержит одну или более из CDR-областей антитела, выбранных из группы, состоящей из CDR1, CDR2 и CDR3. В другом воплощении отдельный переменный домен содержит каркас, выбранный из группы, состоящей из CTLA-4, липокалина, стафилококкового белка A (SpA), GroEl, GroEs, трансферрина и фибронектина. В одном воплощении связывание сывороточного альбумина с отдельным переменным доменом, по существу, не конкурирует со связыванием FcRn с сывороточным альбумином, и в другом воплощении отдельный переменный домен антитела специфично связывает сывороточный альбумин с равновесной константой диссоциации (K_d) менее или равной 300 нМ.

В другом воплощении отдельный переменный домен антитела дополнительно включает по меньшей мере один дополнительный отдельный переменный домен антитела, где дополнительный отдельный переменный домен антитела специфично связывает антиген, отличный от сывороточного альбумина, при pH 7, но не связывает антиген при pH внутриклеточного компартмента. Также здесь описан способ направления антигена на деградацию у индивида, включающий введение индивиду лиганда, содержащего отдельный переменный домен, такой как отдельный переменный домен антитела, специфично связывающий сывороточный альбумин *in vitro* как при pH 7, так и при pH внутриклеточного компартмента, и дополнительно содержащего по меньшей мере один дополнительный отдельный переменный домен антитела, включающий отдельный переменный домен, например отдельный переменный домен антитела, где антиген, отличный от сывороточного альбумина, направляется на деградацию.

В одном воплощении лигандов по изобретению связывание predetermined лекарственного средства и/или метаболита и/или малой молекулы с одной или более областями человеческого сывороточного альбумина не блокирует специфичное связывание человеческого сывороточного альбумина с отдельным переменным доменом антитела. В этих воплощениях дополнительный отдельный переменный домен антитела может представлять собой отдельный переменный домен тяжелой цепи антитела или отдельный переменный домен легкой цепи антитела, содержащий одну или более CDR антитела, выбранные из группы, состоящей из CDR1, CDR2 и/или CDR3. Отдельные переменные домены могут содержать каркас, выбранный из группы, состоящей из CTLA-4, липокалина, стафилококкового белка A (SpA), GroEl, GroEs, трансферрина и фибронектина.

Другое воплощение лиганда, описанного здесь, представляет собой лиганд, содержащий отдельный переменный домен, где отдельный переменный домен представляет собой отдельный переменный домен, не встречающийся в природе, где отдельный переменный домен специфично связывает сывороточный альбумин *in vitro* как при pH 7, так и при pH внутриклеточного компартмента, где связывание predetermined лекарственного средства и/или метаболита и/или малой молекулы с одной или более областями человеческого сывороточного альбумина не блокирует специфичное связывание человеческого сывороточного альбумина отдельным переменным доменом антитела, где одна или более области человеческого сывороточного альбумина включают область Sudlow 1 и область Sudlow 2 или одна или более области расположены на одном или более доменах человеческого сывороточного альбумина, выбранных из группы, состоящей из I домена, II домена и III домена.

Линкеры

Соединение AlbuAbTM (dAb, специфично связывающего сывороточный альбумин) (доменного антитела или отдельного переменного домена против сывороточного альбумина) с другой биологически активной группировкой может быть осуществлено методиками рекомбинантного конструирования. В большинстве случаев гены, кодирующие оба интересующих белка, слиты в одной

рамке считывания. Можно рассматривать несколько форматов, где доменное антитело против сывороточного альбумина расположено либо на N-конце слитого белка (т.е. AlbuAbTM-Y, где Y представляет собой биологически активный полипептид), либо на C-конце слитого белка (т.е. Z-AlbuAbTM, где Y представляет собой биологически активный пептид). В некоторых случаях можно рассматривать слияние более чем одного биологически активного полипептида с AlbuAbTM (dAb, специфично связывающим сывороточный альбумин), что делает возможным несколько конструкций слитого белка. Например, слитый белок может представлять собой следующее: Z-Y-AlbuAbTM, 2-AlbuAbTM-Y или AlbuAbTM-Z-Y.

Во всех этих слитых молекулах два полипептида ковалентно связаны друг с другом через по меньшей мере одну пептидную связь. В наиболее простом способе AlbuAbTM (dAb, специфично связывающее сывороточный альбумин) и биологический полипептид (полипептиды) связаны непосредственно. Таким образом, соединение между AlbuAbTM (dAb, специфично связывающим сывороточный альбумин) и полипептидом будет следующим:

а) для AlbuAbTM (dAb, специфично связывающего сывороточный альбумин) на C-конце, где AlbuAbTM представляет собой V_κ:-

xxxDIQ
xxxNIQ
xxxAIQ
xxxAIR
xxxVIW
xxxDIV
xxxDVV
xxxEIV
xxxETT

где AlbuAbTM (dAb, специфично связывающее сывороточный альбумин) представляет собой V_λ:-

xxxQSV
xxxQSA
xxxSYE
xxxSSE
xxxSYV
xxxLPV
xxxQPV
xxxQLV
xxxQAV
xxxNFM
xxxQTV
xxxQAG

где AlbuAbTM (dAb, специфично связывающее сывороточный альбумин) представляет собой V_H (например, человеческий V_H):-

xxxQVQ
xxxQMQ
xxxEVQ
xxxQIT
xxxQVT
xxxQLQ

где AlbuAbTM (dAb, специфично связывающее сывороточный альбумин) представляет собой V_{HH} (например, вариабельный домен тяжелой цепи представителя семейства верблюдовых):-

xxxEVQ
xxxQVQ
xxxDVQ
xxxQVK
xxxAVQ

б) для AlbuAbTM (dAb, специфично связывающего сывороточный альбумин) на N-конце,

где AlbuAbTM (dAb, специфично связывающее сывороточный альбумин) представляет собой V_κ:-

KVEIKxxx
KLEIKxxx
KVDIKxxx
RLEIKxxx
EIKRxxx

где AlbuAbTM (dAb, специфично связывающее сывороточный альбумин) представляет собой V_λ:-
KVDVLxxx

KLDVLxxx

QLDVLxxx

где AlbuAbTM (dAb, специфично связывающее сывороточный альбумин) представляет собой V_H (например, человеческий V_H):-

VTVSSxxx

где AlbuAbTM (dAb, специфично связывающее сывороточный альбумин) представляет собой V_{HH} (например, переменный домен тяжелой цепи представителя семейства Верблюдовых):-

VTVSSxxx

"xxx" представляет собой первые или последние три аминокислоты (первого) биологически активного полипептида, слитого с AlbuAbTM (dAb, специфично связывающим сывороточный альбумин).

Тем не менее, возможны случаи, когда получение рекомбинантного слитого белка, сохраняющего функциональные активности обоих полипептидов, может быть облегчено соединением кодирующих генов мостиковым сегментом ДНК, кодирующим пептидный линкер, сплайсированный между полипептидами, соединенными в тандеме. Оптимальную длину линкера обычно определяют эмпирически: она может быть небольшой, как одна аминокислота, или увеличиваться до 50 аминокислот. Были предложены линкеры различных конструкций, и они хорошо известны в данной области техники. Следующие примеры призваны представить обширный, но не исчерпывающий, список возможных линкерных способов.

1. Гибкие линкеры.

Гибкие линкеры разработаны для придания стабильной вторичной структуры при соединении двух полипептидных группировок, таким образом, делая возможным ряд конформаций слитого белка. Эти линкеры по своей природе предпочтительно гидрофильны для предотвращения их взаимодействия с одним или обоими слитыми полипептидами. Обычно в этих линкерах преобладают малые полярные остатки, такие как глицин и серин, для увеличения гибких и гидрофильных свойств пептидного каркаса соответственно. Длина этих линкеров различна, и ее лучше всего определять либо эмпирически, либо с помощью компьютерных 3D-способов. В большинстве случаев предпочтительная длина линкера будет наименьшей совместимой с хорошей экспрессией, хорошей растворимостью и полным восстановлением интересующих нативных функций и структур. Ввиду их гибких свойств гибкие линкеры могут составлять хорошие субстраты для эндогенных протеаз. В большинстве случаев, если это не является желаемым свойством, гибкие линкеры лишены таких аминокислот, как заряженные аминокислоты или крупные гидрофобные/ароматические аминокислоты, легко распознаваемые эндогенными протеазами с широкой субстратной специфичностью. В дополнение, предпочтительно избегают цистеиновых остатков, поскольку свободные цистеины могут взаимодействовать друг с другом с образованием цистеинов, приводя посредством этого к (1) связыванию двух слитых белков через линкеры и/или (2) неправильной экспрессии/фолдингу слитого белка, если один или более биоактивные полипептиды содержат один или более цистеиновый остаток ("цистеиновое запутывание").

Примерами гибких линкеров являются: (1) линкеры, богатые глицином, на основе повторения мотива (GGGS)_y, где y составляет по меньшей мере 1, хотя y может составлять 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9 или более (см. международные публикации PCT № EP 0753551, US 5258498, EP 0623679), (2) линкеры, богатые серином, на основе повторения мотива (SSSSG)_y, где y составляет по меньшей мере 1, хотя y может составлять 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9 или более (см. международные публикации PCT № EP 0573551, US 5525491).

2. Ригидные линкеры.

Ригидные линкеры разработаны для придания стабильной вторичной структуры при соединении двух полипептидных группировок, ограничивая, таким образом, ряд конформаций слитого белка. Такие линкеры обычно придают спиральную структуру с несколькими изгибами. Снова, длина этих линкеров различна, и ее лучше всего определять либо эмпирически, либо с помощью компьютерных способов. Основной причиной выбора ригидных линкеров является поддержание наибольшего расстояния между полипептидами слитого белка. Это особенно уместно, когда оба полипептида имеют тенденцию к образованию гетероагрегатов. В силу их структуры ригидные линкеры могут также быть более устойчивы к протеолитической деградации, предлагая посредством этого преимущество при введении *in vivo*.

Примеры ригидных линкеров приведены в международных публикациях PCT № WO 00/24884 (например, SSSASASSA, GSPGSPG или ATTTGSSPGPT), US 6132992 (например, спиральные пептидные линкеры).

3. "Природные" линкеры.

Природные линкеры представляют собой полипептидные последовательности (различной длины), которые, напротив, не являются синтетическими, т.е. полипептидные последовательности, составляющие линкеры, обнаруживают в природе. Природные линкеры могут быть либо гибкими, либо ригидными, и могут быть очень разнообразны по аминокислотной последовательности и составу. Степень их устойчивости к протеолизу зависит от белков, от которых они имеют происхождение, и биологической

среды, в которой эти белки существуют в природе (внеклеточной, внутриклеточной, прокариотической, эукариотической и т.п.). Один класс линкеров особенно важен для разработки биологических лекарственных средств у человека: линкеры на основе пептидов, обнаруживаемых в человеческих белках. В самом деле, такие линкеры по природе неиммуногенны или очень слабо иммуногенны, и, таким образом, потенциально безопаснее для терапии у человека.

Примерами природных линкеров являются: (1) KESGSVSSEQLAQFRSLD (см. Bird et al. (1988), Science, 242, 423-426), (2) последовательности, соответствующие шарнирному домену иммуноглобулинов, лишенных легких цепей (см. Hamers-Casterman et al. (1993), Nature, 363, 446-448 and PCT International Publication No: WO 096/34103). Примерами линкеров для использования с доменными антителами против альбумина (например, человеческими, гуманизированными, человеческими камелизированными ("camelized") доменными антителами или доменными антителами на основе V_{H1} представителей семейства верблюдовых) являются ЕРКІРQРQРKРQРQРQРKРQРKРЕРЕСТСРKСР и GTNEVCKCPKCP. Другие линкеры, имеющие происхождение от человеческих шарнирных областей или шарнирных областей представителей семейства верблюдовых, раскрыты в EP 0656946, включенной сюда посредством ссылки. Линкеры, имеющие происхождение от шарнирных областей, могут иметь различную длину, например от 0 до приблизительно 50 аминокислот, включая 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 или 49 аминокислот.

При использовании здесь "лекарственное средство" относится к любому соединению (например, малой органической молекуле, нуклеиновой кислоте, полипептиду), которое может быть введено индивиду для оказания полезного, терапевтического или диагностического эффекта посредством связывания и/или изменения функции биологической молекулы-мишени у индивида. Молекула-мишень может представлять собой эндогенную молекулу-мишень, кодируемую геномом индивида (например, фермент, рецептор, фактор роста, цитокин, кодируемый геномом индивида) или экзогенную молекулу-мишень, кодируемую геномом патогена (например, фермент, кодируемый геномом вируса, бактерии, гриба, нематоды или другого патогена).

Лекарственная композиция может представлять собой конъюгат, в котором лекарственное средство ковалентно или нековалентно связано с полипептидной связывающей группировкой. Лекарственное средство может быть ковалентно или нековалентно связано с полипептидной связывающей группировкой непосредственно или косвенно (например, посредством подходящего линкера и/или нековалентного связывания комплементарных партнеров по связыванию (например, биотина и авидина)). При использовании комплементарных партнеров по связыванию один из партнеров по связыванию может быть ковалентно связан с лекарственным средством непосредственно или через подходящую линкерную группировку, и ковалентный партнер по связыванию может быть ковалентно связан с полипептидной связывающей группировкой непосредственно или через подходящую линкерную группировку. Когда лекарственное средство представляет собой полипептид или пептид, лекарственная композиция может представлять собой слитый белок, где полипептид или пептид, лекарственное средство и полипептидная связывающая группировка являются отдельными частями (группировками) непрерывной полипептидной цепи. Как описано здесь, полипептидные связывающие группировки и полипептидные лекарственные группировки могут быть непосредственно связаны друг с другом через пептидную связь или связаны через подходящую аминокислоту, или пептидный или полипептидный линкер.

Сниженная иммуногенность

Здесь описан способ снижения иммуногенности фармацевтического агента, включающий модификацию указанного агента таким образом, что агент дополнительно содержит область отдельного переменного домена, где отдельный переменный домен специфично связывает сывороточный альбумин *in vivo* и/или *ex vivo*, и где агент может включать лекарственное средство, метаболит, лиганд, антиген и белок. Сывороточный альбумин может представлять собой человеческий сывороточный альбумин. Отдельный переменный домен может представлять собой отдельный переменный домен иммуноглобулина. Отдельный переменный домен иммуноглобулина может представлять собой отдельный переменный домен антитела V_H . Отдельный переменный домен V_H может представлять собой отдельный переменный домен V_{H3} . Отдельный переменный домен V_{H3} может представлять собой человеческий отдельный переменный домен V_{H3} . Отдельный переменный домен антитела может представлять собой отдельный переменный домен антитела V-каппа или V-лямбда. Отдельный переменный домен антитела может включать набор из четырех каркасных областей (FR) Kabat, кодируемых сегментами генов каркасных областей V_{H3} антител зародышевого типа. Каркасная область V_{H3} выбрана из группы, состоящей из DP47, DP38 и DP45. Отдельный переменный домен антитела может включать набор из четырех каркасных областей (FR) Kabat, кодируемых сегментами генов каркасных областей V-каппа антител зародышевого типа. Неограничивающим примером каркасной области каппа является DPK9. Отдельный переменный домен может содержать иммуноглобулиновый или неиммуноглобулиновый каркас, содержащий CDR1-, CDR2- и/или CDR3-области, где по меньшей мере одна из CDR1-, CDR2- и CDR3-областей имеет происхождение из отдельного переменного

домена антитела, связывающего сывороточный альбумин. Неиммуноглобулиновый каркас может включать, предпочтительно без ограничения, CTLA-4, липокалин, SpA, Affibody™, GroEl, Avimer™ и фибронектин. Сывороточный альбумин может представлять собой человеческий сывороточный альбумин. Отдельный переменный домен иммуноглобулина и/или неиммуноглобулиновый отдельный переменный домен может специфично связывать человеческий сывороточный альбумин с K_d менее 300 нМ. Отдельный переменный домен иммуноглобулина и/или неиммуноглобулиновый отдельный переменный домен может специфично связывать как человеческий сывороточный альбумин, так и один или более сывороточных альбумина от источника, не являющегося человеком, со значениями K_d , отличающимися друг от друга не более чем в 10 раз. Отдельный переменный домен иммуноглобулина и/или неиммуноглобулиновый отдельный переменный домен может специфично связывать как человеческий сывороточный альбумин, так и один или более сывороточных альбумина от источника, не являющегося человеком, и где период полувыведения $T_{1/2}$ лиганда и период полувыведения $T_{1/2}$ человеческого сывороточного альбумина у человека-хозяина, по существу, одинаковы. Кроме того, отдельный переменный домен иммуноглобулина и/или неиммуноглобулиновый отдельный переменный домен может специфично связывать II домен человеческого сывороточного альбумина. Отдельный переменный домен иммуноглобулина и/или неиммуноглобулиновый отдельный переменный домен может дополнительно специфично связывать сывороточный альбумин как при естественном pH сыворотки, так и при pH внутриклеточной везикулы. Связывание лекарственных средств и/или метаболитов с одной или более областями сывороточного альбумина, по существу, не блокирует специфичное связывание сывороточного альбумина отдельным переменным доменом иммуноглобулина и/или неиммуноглобулиновым отдельным переменным доменом. В одном воплощении специфичное связывание сывороточного альбумина отдельным переменным доменом не изменяет характеристики связывания сывороточного альбумина для лекарственных средств и/или метаболитов, и/или малых молекул, связываемых с SA. В одном воплощении способ модификации агента приводит к образованию модифицированного агента, имеющего формулу включая: a-(X) n_1 -b-(Y) n_2 -c-(Z) n_3 -d или a-(Z) n_3 -b-(Y) n_2 -c-(X) n_1 -d, где X представляет собой полипептидное лекарственное средство, имеющее специфичность связывания в отношении первой мишени; Y представляет собой отдельный переменный домен, например отдельный переменный домен антитела, специфично связывающий сывороточный альбумин *in vivo* и/или *ex vivo*; Z представляет собой полипептидное лекарственное средство, имеющее специфичность связывания в отношении второй мишени; a, b, c и d независимо представляют собой полипептид, содержащий от одной до нескольких аминокислот, или отсутствуют; n_1 представляет собой от 1 до приблизительно 10; n_2 представляет собой от 1 до приблизительно 10; n_3 представляет собой от 0 до приблизительно 10. В другом воплощении, где n_1 и n_2 представляют собой 1 и n_3 представляет собой 0, X не включает цепь антитела или фрагмент цепи антитела.

Здесь описан способ снижения иммуногенности фармацевтического агента, включающий модификацию агента таким образом, что агент дополнительно содержит отдельный переменный домен, где отдельный переменный домен специфично связывает сывороточный альбумин, где отдельный переменный домен представляет собой отдельный переменный домен, не встречающийся в природе, и где агент выбран из группы, состоящей из лекарственного средства, метаболита, лиганда, антигена и белка. Также здесь описан способ снижения иммуногенности фармацевтического агента, включающий модификацию агента таким образом, что агент дополнительно содержит отдельный переменный домен антитела, где отдельный переменный домен антитела специфично связывает сывороточный альбумин и где агент выбран из группы, состоящей из лекарственного средства, метаболита, лиганда, антигена и белка. В одном воплощении отдельный переменный домен антитела представляет собой отдельный переменный домен тяжелой цепи антитела, например отдельный переменный домен V_H3 антитела или человеческий отдельный переменный домен V_H3 антитела. В другом воплощении отдельный переменный домен антитела представляет собой отдельный переменный домен легкой цепи антитела, например отдельный переменный домен V-каппа или V-лямбда антитела. В одном воплощении отдельный переменный домен содержит CDR1-, CDR2- и CDR3-области, где по меньшей мере одна из CDR1-, CDR2- и CDR3-областей имеет происхождение из переменного домена антитела, специфично связывающего сывороточный альбумин, и возможно, дополнительно содержит каркас, выбранный из группы, состоящей из CTLA-4, липокалина, стафилококкового белка A (SpA), GroEl, GroEs, трансферрина и фибронектина. В другом воплощении этих способов отдельный переменный домен, например отдельный переменный домен антитела, специфично связывает человеческий сывороточный альбумин с K_d менее 300 нМ, и в другом воплощении этих способов отдельный переменный домен, например отдельный переменный домен антитела, специфично связывает человеческий сывороточный альбумин и один или более сывороточных альбуминов от источника, не являющегося человеком, со значениями K_d , отличающимися друг от друга не более чем в 10 раз. В другом воплощении этих способов отдельный переменный домен, например отдельный переменный домен антитела, специфично связывает человеческий сывороточный альбумин и сывороточный альбумин от источника,

не являющегося человеком, и период полувыведения T β лиганда и период полувыведения T β человеческого сывороточного альбумина у человека-хозяина, по существу, одинаковы. В другом воплощении этих способов отдельный переменный домен, например отдельный переменный домен антитела, специфично связывает II домен человеческого сывороточного альбумина. В другом воплощении этих способов отдельный переменный домен, например отдельный переменный домен антитела, специфично связывает сывороточный альбумин как при pH 7, так и при pH внутриклеточного компартмента.

Изобретение дополнительно описано, лишь с целью иллюстрации, в следующих примерах. При использовании здесь в целях номенклатуры dAb человеческий TNF α называют TAR1 и рецептор человеческого TNF α 1 типа (рецептор p55) называют TAR2.

Пример 1. Селекция scFv антитела с двойной специфичностью (K8), направленного против человеческого сывороточного альбумина (HSA) и β -галактозидазы (β -gal).

В этом примере раскрыт способ получения антитела с двойной специфичностью, направленного против β -gal и HSA, в котором репертуар переменных доменов V_к, связанных с доменом V_н (модельным доменом) зародышевого типа, селекционируют для связывания β -gal, и репертуар переменных доменов V_н, связанных с доменом V_н (модельным доменом) зародышевого типа, селекционируют для связывания HSA. Селектированные переменные домены V_н HSA и V_к β -gal затем комбинируют и антитела селекционируют для связывания β -gal и HSA. HSA является белком, увеличивающим период полувыведения, обнаруженным в крови людей.

В этом эксперименте использовали четыре фаговые библиотеки человеческих антител.

Библиотека 1	V _к зародышевой линии/DVT V _н	8,46 x 10 ⁷
Библиотека 2	V _к зародышевой линии/NNK V _н	9,64 x 10 ⁷
Библиотека 3	V _н зародышевой линии/DVT V _н	1,47 x 10 ⁸
Библиотека 4	V _н зародышевой линии/NNK V _н	1,45 x 10 ⁸

Все библиотеки основаны на одной человеческой каркасной области для V_н (V3-23/DP47 и J_н4b) и V_к (O12/O2/DPK9 и J_к1) с разнообразием боковых цепей, заключенным в областях, определяющих комплементарность (CDR2 и CDR3).

Библиотека 1 и библиотека 2 содержат последовательность модельного V_к, в то время как в последовательности V_н разнообразие заключено в положениях H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H96, H97 и H98 (кодированных DVT или NNK соответственно) (фиг. 1). Библиотека 3 и библиотека 4 содержат последовательность модельного V_н, в то время как в последовательности V_к разнообразие заключено в положениях L50, L53, L91, L92, L93, L94 и L96 (кодированных DVT или NNK соответственно) (фиг. 1). Библиотеки представлены в формате фагамиды pIT2/ScFv (фиг. 2) и были предварительно селекционированы для связывания лигандов общего типа, белка A и белка L, таким образом, что большинство клонов в неселектированных библиотеках являются функциональными. Размеры библиотек, показанные выше, соответствуют размерам после предварительной селекции. Библиотека 1 и библиотека 2 были смешаны перед селекциями на антигене для образования библиотеки отдельных V_н/модельных V_к, и библиотека 3 и библиотека 4 были смешаны для образования библиотеки отдельных V_к/модельных V_н.

Проводили три раунда селекции на β -gal с использованием библиотеки V_к/модельных V_н и проводили три раунда селекции на HSA с использованием библиотеки V_н/модельных V_к. В случае β -gal фаговые титры увеличивались с 1,1x10⁶ в первом раунде до 2,0x10⁸ в третьем раунде. В случае HSA фаговые титры увеличивались с 2x10⁴ в первом раунде до 1,4x10⁹ в третьем раунде. Селекции проводили, как описано Griffith et al. (1993), за исключением того, что использовали хелперный фаг KM13 (содержащий белок рIII с протеазным сайтом расщепления между доменами D2 и D3) и фаг элюировали с использованием 1 мг/мл трипсина в PBS. Добавление трипсина приводит к расщеплению белков рIII, имеющих происхождение от хелперного фага (но не тех, которые имеют происхождение от фагамиды), и элюированию связанных слитых белков scFv-фаг посредством расщепления в метке с-мус (фиг. 2), обеспечивая посредством этого дальнейшее обогащение для фагов, экспрессирующих функциональные scFv, и соответствующее уменьшение фона (Kristensen & Winter, *Folding & Design* 3: 321-328, Jul 9, 1998). Селекции проводили с использованием иммунологических пробирок, покрытых либо HSA, либо β -gal в концентрации 100 мкг/мл.

Для проверки связывания 24 колонии от третьего раунда каждой селекции подвергали скринингу моноклональным фаговым ELISA. Фаговые частицы получали, как описано Harrison et al., *Methods Enzymol.* 1996; 267:83-109. 96-луночные планшеты для ELISA покрывали 100 мкл HSA или β -gal в концентрации 10 мкг/мл в PBS на ночь при 4°C. Следовали стандартному протоколу ELISA (Hoogenboom et al., 1991) с использованием выявления связанного фага конъюгатом анти-M13-HRP. Селекция клонов давала ELISA-сигналы, превышающие 1,0 с использованием 50 мкл супернатанта.

Затем готовили образцы ДНК от библиотеки V_н/модельных V_к, селекционированной на HSA, и от

библиотеки V_k /модельных V_H , селектированной β -gal, с использованием набора QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Для оценки большей части разнообразия образцы ДНК готовили от каждого из трех раундов селекции и затем объединяли друг с другом для каждого из антигенов. Затем образцы ДНК расщепляли SalI/NotI в течение ночи при 37°C. После гель-очистки фрагменты цепи V_k из библиотеки V_k /модельных V_H , селектированной на β -gal, лигировали вместо цепей модельных V_k библиотеки V_H /модельных V_k , селектированной на HSA, с образованием библиотеки из $3,3 \times 10^9$ клонов.

Эту библиотеку затем либо селектировали на HSA (первый раунд) и β -gal (второй раунд), селекция HSA/ β -gal, либо на β -gal (первый раунд) и HSA (второй раунд), селекция β -gal/HSA. Селекции проводили, как описано выше. В каждом случае после второго раунда 48 клонов тестировали на связывание HSA и β -gal моноклональным фаговым ELISA (как описано выше) и ELISA растворимых фрагментов scFv. Растворимые фрагменты антител получали, как описано Harrison et al. (1996), и следовали стандартному протоколу ELISA, Hoogenboom et al. (1991), Nucleic Acids Res., 19: 4133, за исключением того, что в качестве блокирующего буфера использовали 2% Tween/PBS и связанные scFv выявляли белком L-HRP. Три клон (E4, E5 и E8) от селекции селекции HSA/ β -gal и два клон (K8 и K10) от селекции β -gal/HSA были способны связывать оба антигена. scFv от этих клонов амплифицировали с использованием ПЦП и секвенировали, как описано Ignatovich et al. (1999), J. Mol Biol 1999 Nov 26; 294(2):457-65, с использованием праймеров LMB3 и pHENseq. При анализе последовательностей было выявлено, что все клоны были идентичны. Таким образом, для дальнейшей работы был выбран только клон, кодирующий антитело с двойной специфичностью (K8) (фиг. 3).

Пример 2. Описание связывающих свойств антитела K8.

Во-первых, связывающие свойства антитела K8 были охарактеризованы моноклональным фаговым ELISA. 96-луночный планшет покрывали 100 мкл HSA и β -gal наряду с щелочной фосфатазой (APS), бычьим сывороточным альбумином (BSA), арахисовым агглютинином, лизоцимом и цитохромом c (для проверки на перекрестную реактивность) в концентрации 10 мкг/мл в PBS на ночь при 4°C. Фагмиду от клон K8 извлекали с использованием KM13, как описано Harrison et al. (1996), и супернатант (50 мкл), содержащий фаг, анализировали непосредственно. Следовали стандартному протоколу ELISA (Hoogenboom et al., 1991) с использованием выявления связанного фага конъюгатом анти-M13-HRP. Было обнаружено, что антитело с двойной специфичностью K8 связывало HSA и β -gal при их представлении на поверхности фага с сигналами абсорбции, превышающими 1,0 (фиг. 4). Также наблюдали сильное связывание с BSA (фиг. 4). Поскольку HSA и BSA на 76% гомологичны на аминокислотном уровне, не удивительно, что антитело K8 распознавало оба этих структурно родственных белка. Перекрестной реактивности с другими белками выявлено не было (фиг. 4).

Во-вторых, связывающие свойства антитела K8 тестировали в ELISA растворимого scFv. Образование растворимого фрагмента scFv индуцировали IPTG, как описано Harrison et al. (1996). Для определения уровней экспрессии scFv K8 растворимые фрагменты антител очищали из супернатанта 50 мл индукций с использованием колонок белок А-сефароза, как описано Harlow and Lane, Antibodies: a Laboratory Manual (1988), Cold Spring Harbor. Затем измеряли оптическую плотность при 280 нм (OD280) и вычисляли концентрацию белка, как описано Sambrook et al. (1989). ScFv K8 получали в супернатанте в концентрации 19 мг/л.

Затем проводили ELISA растворимого scFv с использованием известных концентраций фрагмента антитела K8. 96-луночный планшет покрывали 100 мкл HSA, BSA и β -gal в концентрации 10 мкг/мл и 100 мкл белка А в концентрации 1 мкг/мл. Наносили 50 мкл серийных разведений scFv K8 и связанные фрагменты антитела выявляли белком L-HRP. Результаты ELISA подтвердили двойную специфичность антитела K8 (фиг. 5).

Для подтверждения того, что связывание β -gal определяет домен V_k , а связывание HSA/BSA - домен V_H scFv антитела K8, домен V_k выделяли из ДНК scFv K8 расщеплением SalI/NotI и лигировали в расщепленный SalI/NotI вектор pIT2, содержащий цепь модельного V_H (фиг. 1 и 2). Характеристики связывания полученного клон K8VK/модельный V_H анализировали посредством ELISA растворимого scFv. Образование растворимого фрагмента scFv индуцировали IPTG, как описано Harrison et al. (1996), и супернатант (50 мкл), содержащий scFv, анализировали непосредственно. ELISA растворимого scFv проводили, как описано в примере 1, и связанные scFv выявляли белком L-HRP. Результаты ELISA показали, что этот клон был еще способен связывать β -gal, в то время как связывания с BSA не было (фиг. 6).

Пример 3. Селекция антител из одного домена V_H , направленных против антигенов А и В, и антител из одного домена V_k , направленных против антигенов С и D.

В этом примере описан способ получения антител из одного домена V_H , направленных против антигенов А и В, и антител из одного домена V_k , направленных против антигенов С и D, селекцией репертуаров интактных отдельных переменных доменов антител для связывания этих антигенов в отсутствие комплементарных переменных доменов.

Селекции и описания связывающих клонов проводят, как описано ранее (см. пример 5, PCT/GB 02/003014). Для дальнейшей работы выбраны четыре клон:

V_{H1} - V_H против А;

V_{H2} - V_H против В;

V_{K1} - V_K против С;

V_{K2} - V_K против D.

Способы, описанные выше в примерах 1-3, могут быть применены так, как они описаны, для образования димерных молекул, содержащих комбинации доменов V_H (т.е. лиганды V_H - V_H) и комбинации доменов V_L (лиганды V_L - V_L).

Пример 4. Образование и описание антител ScFv с двойной специфичностью (V_{H1}/V_{H2} , направленных против антигенов А и В, и V_{K1}/V_{K2} , направленных против антигенов С и D).

В этом примере показано, что антитела ScFv с двойной специфичностью (V_{H1}/V_{H2} , направленные против антигенов А и В, и V_{K1}/V_{K2} , направленные против антигенов С и D) могут быть образованы комбинированием отдельных доменов V_K и V_H , селективированных против соответствующих антигенов в векторе ScFv.

Для образования антитела с двойной специфичностью V_{H1}/V_{H2} , отдельный домен V_{H1} выделяют из 1 вектора переменного домена (фиг. 7) расщеплением NcoI/XhoI и лигируют в расщепленный NcoI/XhoI 2 вектор переменного домена (фиг. 7) для образования $V_{H1}/2$ вектор переменного домена. Отдельный домен V_{H2} амплифицируют с использованием ПЦР из 1 вектора переменного домена с использованием праймеров для введения сайта рестрикции SalI в 5'-конец и сайта рестрикции NotI в 3'-конец. ПЦР-продукт затем расщепляют SalI/NotI и лигируют в расщепленный SalI/NotI $V_{H1}/2$ вектор переменного домена для образования $V_{H1}/V_{H2}/2$ вектор переменного домена.

$V_{K1}/V_{K2}/2$ вектор переменного домена создают сходным образом. Двойную специфичность образованных ScFv V_{H1}/V_{H2} и ScFv V_{K1}/V_{K2} проверяют в ELISA растворимого ScFv, как описано ранее (см. пример 6, PCT/GB 02/003014). Конкурентный ELISA проводят, как описано ранее (см. пример 8, PCT/GB 02/003014).

Возможные результаты:

ScFv V_{H1}/V_{H2} способно связывать антигены А и В одновременно;

ScFv V_{K1}/V_{K2} способно связывать антигены С и D одновременно;

связывание ScFv V_{H1}/V_{H2} конкурентно (во время связывания антигена А, ScFv V_{H1}/V_{H2} не способно связывать антиген В);

связывание ScFv V_{K1}/V_{K2} конкурентно (во время связывания антигена С, ScFv V_{K1}/V_{K2} не способно связывать антиген D).

Пример 5. Конструирование Fab V_{H1}/V_{H2} и Fab V_{K1}/V_{K2} с двойной специфичностью и анализ их связывающих свойств.

Для образования Fab V_{H1}/V_{H2} , отдельный домен V_{H1} лигируют в расщепленный NcoI/XhoI вектор СН (фиг. 8) для образования $V_{H1}/СН$ и отдельный домен V_{H2} лигируют в расщепленный SalI/NotI вектор СК (фиг. 9) для образования $V_{H2}/СК$. Плазмидную ДНК от $V_{H1}/СН$ и $V_{H2}/СК$ используют для со-трансформации компетентных клеток E.coli, как описано ранее (см. пример 8, PCT/GB02/003014).

Клон, содержащий плазмиды $V_{H1}/СН$ и $V_{H2}/СК$, затем индуцируют IPTG для образования растворимого Fab V_{H1}/V_{H2} , как описано ранее (см. пример 8, PCT/GB 02/003014).

Fab V_{K1}/V_{K2} получают сходным образом.

Связывающие свойства образованных Fab исследуют конкурентным ELISA, как описано ранее (см. пример 8, PCT/GB 02/003014).

Возможные результаты:

Fab V_{H1}/V_{H2} способен связывать антигены А и В одновременно;

Fab V_{K1}/V_{K2} способен связывать антигены С и D одновременно;

связывание Fab V_{H1}/V_{H2} конкурентно (во время связывания антигена А, Fab V_{H1}/V_{H2} не способен связывать антиген В);

связывание Fab V_{K1}/V_{K2} конкурентно (во время связывания антигена С, Fab V_{K1}/V_{K2} не способен связывать антиген D).

Пример 6. Хелатообразующие димеры dAb.

Краткое изложение.

Гомодимеры V_H и V_K создают в формате dAb-линкер-dAb с использованием гибких полипептидных линкеров. Векторы создавали в формате dAb линкер-dAb, содержащем глицин-сериновые линкеры разной длины, 3U:(Gly₄Ser)₃, 5U:(Gly₄Ser)₅, 7U:(Gly₄Ser)₇. Библиотеки димеров создавали с использованием ведущих dAb ближе к 5'-концу линкера: TAR1-5(V_K), TAR1-27(V_K), TAR2-5(V_H) или TAR2-6(V_K), и библиотеки соответствующих вторых dAbs после линкера. С применением этого способа селективировали новые димерные dAb. Эффект димеризации на связывание антигена определяли посредством ELISA и исследований Biacore и в исследованиях нейтрализации клеток и связывания рецепторов. Димеризация как TAR1-5, так и TAR1-27, приводила к значимому улучшению аффинности связывания и уровней нейтрализации.

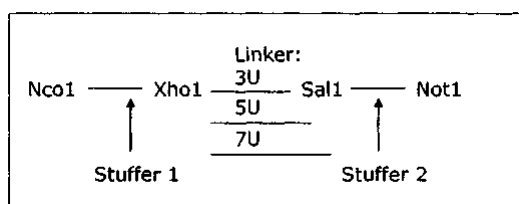
1.0. Методы.

1.1. Образование библиотек.

1.1.1. Векторы.

Векторы pEDA3U, pEDA5U и pEDA7U разрабатывали для введения различных длин линкеров, совместимых с форматом dAb-линкер-dAb. Для pEDA3U смысловые и антисмысловые олиголинкеры из 73 пар оснований отжигали с применением программы медленного отжига (95°C - 5 мин, 80°C - 10 мин, 70°C - 15 мин, 56°C - 15 мин, 42°C до использования) в буфере, содержащем 0,1 М NaCl, 10 мМ трис-НСl, рН 7,4, и клонировали с использованием сайтов рестрикции Xho1 и Not1. Линкеры включали 3 единицы (Gly₄Ser) и "лишнюю" область (stuffer region), расположенную между сайтами клонирования Sal1 и Not1 (схема 1). Для уменьшения возможности селекции мономерных dAb фаговым дисплеем "лишняя" область была разработана содержащей 3 стоп-кодона, сайт рестрикции SacI и мутацию со сдвигом рамки считывания, чтобы вывести область из рамки считывания при отсутствии второго dAb. Для pEDA5U и 7U, ввиду необходимой длины линкеров, для каждого вектора были разработаны перекрывающиеся олиголинкеры и проведены их отжиг и элонгация с применением Klenow. Затем фрагмент очищали и расщепляли с использованием подходящих ферментов перед клонированием с использованием сайтов рестрикции Xho1 и Not1.

Схема 1



1.1.2. Образование библиотек.

N-концевой V-ген, соответствующий ведущему dAb, клонировали ближе к 5'-концу вектора с использованием сайтов рестрикции Nco1 и Xho1. Гены V_H имеют существующие совместимые сайты, хотя для клонирования генов V_K было необходимо введение подходящих сайтов рестрикции. Это было осуществлено с использованием модифицирующих ПЦП-праймеров (VK-DLIBF: 5' cggccatggcgtcaacggacat; VKXho1R: 5' atgtgcgctcgagcgttgattt 3') в 30 циклах ПЦП-амплификации с использованием смеси 2:1 SuperTaq (HTBiotechnology Ltd) и pfu turbo (Stratagene). Это сохраняло сайт Nco1 на 5'-конце, разрушая в то же время близлежащий сайт Sal1, и вводило сайт Xho1 в 3'-конец. 5 ведущих dAb клонировали в каждый из 3 димерных векторов: TAR1-5(V_K), TAR1-27(V_K), TAR2-5(V_H), TAR2-6(V_K) и TAR2-7(V_K). Все конструкции подтверждали секвенированием.

После клонирования ведущих dAb ближе к 5'-концу линкера в каждый из векторов (pEDA3U, 5U и 7U): TAR1-5(V_K), TAR1-27(V_K), TAR2-5(V_H) или TAR2-6(V_K) после линкера клонировали библиотеку вторых dAb. Для осуществления этого библиотеки комплементарных dAb ПЦП-амплифицировали из фага, полученного из селекции 1 раунда либо библиотеки V_K против человеческого TNFα (при разнообразии приблизительно 1×10⁶ после 1 раунда), когда TAR1-5 или TAR1-27 являются ведущими dAb, либо библиотеки V_H или V_K против человеческого рецептора TNF p55 (каждой при разнообразии приблизительно 1×10⁵ после 1 раунда), когда TAR2-5 или TAR2-6 соответственно являются ведущими dAb. Для библиотек V_K проводили ПЦП-амплификацию с использованием праймеров в 30 циклах ПЦП-амплификации с использованием смеси 2:1 SuperTaq и pfu turbo. Библиотеки V_H ПЦП-амплифицировали с использованием праймеров с целью введения сайта рестрикции Sal1 в 5'-конец гена. Продукты ПЦП библиотек dAb расщепляли подходящими рестриктазами, лигировали в соответствующие векторы ближе к 3'-концу линкера с использованием сайтов рестрикции Sal1/Not1 и подвергали электропорации в свежеприготовленные компетентные клетки TG1.

Титры, полученные для каждой библиотеки, были следующими:

$$\text{TAR1-5: pEDA3U} = 4 \times 10^8, \text{ pEDA5U} = 8 \times 10^7, \text{ pEDA7U} = 1 \times 10^8;$$

$$\text{TAR1-27: pEDA3U} = 6,2 \times 10^8, \text{ pEDA5U} = 1 \times 10^8, \text{ pEDA7U} = 1 \times 10^9;$$

$$\text{TAR2h-5: pEDA3U} = 4 \times 10^7, \text{ pEDA5U} = 2 \times 10^8, \text{ pEDA7U} = 8 \times 10^7;$$

$$\text{TAR2h-6: pEDA3U} = 7,4 \times 10^8, \text{ pEDA5U} = 1,2 \times 10^8, \text{ pEDA7U} = 2,2 \times 10^8.$$

1.2. Селекции.

1.2.1. TNFα.

Селекции проводили с использованием человеческого TNFα, пассивно нанесенного на иммунологические пробирки. Кратко, иммунологические пробирки покрывали на ночь 1-4 мл необходимого антигена. Иммунологические пробирки затем промывали 3 раза PBS и блокировали 2% молочным порошком в PBS в течение 1-2 ч и промывали еще 3 раза PBS. Раствор фага разводили в 2% молочном порошке в PBS и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. Пробирки затем промывали PBS и фаг элюировали 1 мг/мг трипсином-PBS. Для библиотек димеров TAR1-5 исследовали

три стратегии селекции. Селекции первого раунда проводили в иммунологических пробирках с использованием человеческого TNF α , нанесенного в концентрации 1 мкг/мл или 20 мкг/мл с 20 промываниями в PBS 0,1% Tween. Клетки TG1 инфицировали элюированным фагом и определяли титры (например, Marks et al. J. Mol Biol. 1991 Dec 5; 222(3):581-97, Richmann et al. Biochemistry. 1993 Aug 31; 32(34):8848-55).

Полученные титры составляли:

$$pEDA3U = 2,8 \times 10^7 \text{ (1 мкг/мл TNF)}, 1,5 \times 10^8 \text{ (20 мкг/мл TNF)};$$

$$pEDA5U = 1,8 \times 10^7 \text{ (1 мкг/мл TNF)}, 1,6 \times 10^8 \text{ (20 мкг/мл TNF)};$$

$$pEDA7U = 8 \times 10^6 \text{ (1 мкг/мл TNF)}, 7 \times 10^7 \text{ (20 мкг/мл TNF)}.$$

Селекции второго раунда проводили с применением 3 различных способов.

1. В иммунологических пробирках, 20 промываний с инкубацией в течение ночи с последующими дополнительными 10 промываниями.

2. В иммунологических пробирках 20 промываний с последующей инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре (RT) в буфере для промывания с (1 мкг/мл TNF α) и дополнительными 10 промываниями.

3. Селекция на стрептавидиновых гранулах с использованием 33 пмоль биотинилированного человеческого TNF α (Henderikx et al., 2002, Selection of antibodies against biotinylated antigens. Antibody Phage Display: Methods and protocols, Ed. O'Brien and Atkin, Humana Press). Отдельные клоны от селекции 2 раунда отбирали в 96-луночные планшеты и образцы необработанного супернатанта приготавливали в формате 2 мл 96-луночного планшета.

	1 раунд	Селекция 2	Селекция 2	Селекция 2
	Концентрация	раунда, 1	раунда, 2	раунда, 3
	человеческого	способ	способ	способ
	TNF α ,			
	покрывающего			
	иммунологические			
	пробирки			
pEDA3U	1 мкг/мл	1×10^9	$1,8 \times 10^9$	$2,4 \times 10^{10}$
pEDA3U	20 мкг/мл	6×10^9	$1,8 \times 10^{10}$	$8,5 \times 10^{10}$
pEDA5U	1 мкг/мл	9×10^8	$1,4 \times 10^9$	$2,8 \times 10^{10}$
pEDA5U	20 мкг/мл	$9,5 \times 10^9$	$8,5 \times 10^9$	$2,8 \times 10^{10}$
pEDA7U	1 мкг/мл	$7,8 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$	4×10^{10}
pEDA7U	20 мкг/мл	1×10^{10}	8×10^9	$1,5 \times 10^{10}$

Для TAR1-27 селекции проводили, как описано ранее, со следующими изменениями. Селекции первого раунда проводили в иммунологических пробирках с использованием человеческого TNF α , нанесенного в концентрации 1 мкг/мл или 20 мкг/мл с 20 промываниями в PBS 0,1% Tween. Селекции второго раунда проводили в иммунологических пробирках с использованием 20 промываний с инкубацией в течение ночи с последующими дополнительными 20 промываниями. Отдельные клоны от селекции 2 раунда отбирали в 96-луночные планшеты и образцы необработанного супернатанта приготавливали в формате 2 мл 96-луночного планшета.

Титры TAR1-27 являются следующими.

	Концентрация	1 раунд	2 раунд
	человеческого		
	покрывающего		
	иммунологические		
	пробирки		
pEDA3U	1 мкг/мл	4×10^9	6×10^9
pEDA3U	20 мкг/мл	5×10^9	$4,4 \times 10^{10}$
pEDA5U	1 мкг/мл	$1,5 \times 10^9$	$1,9 \times 10^{10}$
pEDA5U	20 мкг/мл	$3,4 \times 10^9$	$3,5 \times 10^{10}$
pEDA7U	1 мкг/мл	$2,6 \times 10^9$	5×10^9
pEDA7U	20 мкг/мл	7×10^9	$1,4 \times 10^{10}$

1.2.2. Рецептор TNF 1 (рецептор p55; TAR2).

Селекции проводили, как описано ранее только для библиотек TAR2h-5. Три раунда селекции проводили в иммунологических пробирках с использованием либо 1 мкг/мл человеческого рецептора TNF p55, либо 10 мкг/мл человеческого рецептора TNF p55 с 20 промываниями в PBS 0,1% Tween с инкубацией в течение ночи с последующими дополнительными 20 промываниями. Отдельные клоны от селекции 2 и 3 раунда отбирали в 96-луночные планшеты и образцы необработанного супернатанта

приготавливали в формате 2 мл 96-луночного планшета.

Титры TAR2h-5 являются следующими.

	Концентрация человеческого рецептора TNF р55, покрывающего иммунологические пробирки в 1 раунде	1 раунд	2 раунд	3 раунд
pEDA3U	1 мкг/мл	$2,4 \times 10^6$	$1,2 \times 10^7$	$1,9 \times 10^9$
pEDA3U	10 мкг/мл	$3,1 \times 10^7$	7×10^7	1×10^9
pEDA5U	1 мкг/мл	$2,5 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$5,7 \times 10^9$
pEDA5U	10 мкг/мл	$3,7 \times 10^7$	$2,3 \times 10^8$	$2,9 \times 10^9$
pEDA7U	1 мкг/мл	$1,3 \times 10^6$	$1,3 \times 10^7$	$1,4 \times 10^9$
pEDA7U	10 мкг/мл	$1,6 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	3×10^{10}

1.3. Скрининг.

По необходимости отдельные клоны от селекции 2 или 3 раунда отбирали от каждой из библиотек 3U, 5U и 7U от разных способов селекции. Клоны выращивали в 2хТУ со 100 мкг/мл ампициллина и 1% глюкозы в течение ночи при 37°C. Разведения этой культуры 1/100 заседали в 2 мл 2хТУ со 100 мкг/мл ампициллина и 1% глюкозы в формате 2 мл 96-луночных планшетов и выращивали при 37°C, встряхивая до оптической плотности при 600 нм (OD600) приблизительно 0,9. Культуру затем индуцировали 1 mM IPTG в течение ночи при 30°C. Супернатанты осветляли центрифугированием при 4000 оборотов в минуту (об/мин) в течение 15 мин в центрифуге для планшетов. Образцы супернатанта использовали для начального скрининга.

1.3.1. ELISA.

Связывающую активность димерных рекомбинантных белков сравнивали с мономером посредством ELISA с белком A/L или посредством ELISA с антигеном. Кратко, 96-луночный планшет покрывают антигеном или белком A/L в течение ночи при 4°C. Планшет промывают 0,05% Tween-PBS, блокируют в течение 2 ч 2% Tween-PBS. Образец добавляют на планшет и инкубируют в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшет промывают и инкубируют с вторичным реагентом в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшет промывают и проявляют субстратом TMB. В качестве вторичного реагента использовали белок A/L-HRP или India-HRP. Для ELISA с антигеном концентрации антигена составляли 1 мкг/мл в PBS для человеческого TNF α и рецептора человеческого TNF 1 типа. Ввиду присутствия ведущего dAb в большинстве случаев димеры давали положительный сигнал при ELISA, таким образом, определение уровня отсечки проводили посредством Biacore.

1.3.2. Biacore.

Анализ Biacore проводили для клонов TAR1-5 и TAR2h-5. Для скрининга человеческий TNF α наносили на чип CM5 с высокой плотностью (приблизительно 10000 RU). 50 мкл человеческого TNF α (50 мкг/мл) наносили на чип со скоростью 5 мкл/мин в ацетатном буфере - pH 5,5. Регенерация чипа после анализа с применением стандартных способов невозможна ввиду нестабильности человеческого TNF α , таким образом, после анализа каждого образца чип промывали буфером в течение 10 мин.

Для клонов TAR1-5 проводили скрининг супернантантов от селекции 2 раунда посредством Biacore.

Проводили скрининг 48 клонов от каждой из библиотек 3U, 5U и 7U, полученных с применением следующих способов селекции.

R1: иммунологическая пробирка с 1 мкг/мл человеческого TNF α ; R2: иммунологическая пробирка с 1 мкг/мл человеческого TNF α , промывание в течение ночи.

R1: иммунологическая пробирка с 20 мкг/мл человеческого TNF α ; R2: иммунологическая пробирка с 20 мкг/мл человеческого TNF α , промывание в течение ночи.

R1: иммунологическая пробирка с 1 мкг/мл человеческого TNF α ; R2: 33 пмоль биотинилированного человеческого TNF α на зернах.

R1: иммунологическая пробирка с 20 мкг/мл человеческого TNF α ; R2: 33 пмоль биотинилированного человеческого TNF α на зернах.

Для скрининга человеческий рецептор TNF р55 наносили на чип CM5 с высокой плотностью (приблизительно 4000 RU). 100 мкл человеческого рецептора TNF р55 (10 мкг/мл) наносили на чип со скоростью 5 мкл/мин в ацетатном буфере - pH 5,5. Использовали стандартные условия регенерации (глицин, pH 2 или pH 3), но в каждом случае антиген удаляли с поверхности чипа, таким образом, аналогично TNF α , по этой причине после анализа каждого образца чип промывали буфером в течение 10 мин.

Для клонов TAR2-5 проводили скрининг супернантантов от селекции 2 раунда.

Проводили скрининг 48 клонов от каждой из библиотек 3U, 5U и 7U, с применением следующих

способов селекции.

R1: иммунологическая пробирка с 1 мкг/мл человеческого рецептора TNF p55; R2: иммунологическая пробирка с 1 мкг/мл человеческого рецептора TNF p55, промывание в течение ночи.

R1: иммунологическая пробирка с 10 мкг/мл человеческого рецептора TNF p55; R2: иммунологическая пробирка с 10 мкг/мл человеческого рецептора TNF p55, промывание в течение ночи.

1.3.3. Исследования на клетках и рецепторах.

Способность димеров к нейтрализации в исследовании на рецепторах проводили следующим образом.

Связывание рецепторов

dAb против TNF исследовали на способность ингибировать связывание TNF с рекомбинантным рецептором TNF 1 типа (p55). Кратко, планшеты Maxisorp инкубировали в течение ночи с 30 мг/мл мышинового моноклонального антитела против человеческого Fc (Zymed, San Francisco, USA). Лунки промывали забуференным фосфатом физиологическим раствором (PBS), содержащим 0,05% Tween-20, и затем блокировали 1% BSA в PBS перед инкубацией со 100 нг/мл слитого белка рецептора TNF 1 типа и Fc (R&D Systems, Minneapolis, USA). dAb против TNF смешивали с TNF, который добавляли в промытые лунки в конечной концентрации 10 нг/мл. Связывание TNF выявляли с использованием 0,2 мг/мл биотинилированного антитела против TNF (HyCult biotechnology, Uben, Netherlands) с последующим разведением 1 к 500 стрептавидина, меченного пероксидазой хрена (Amersham Biosciences, UK), и затем инкубацией с субстратом TMB (KPL, Gaithersburg, USA). Реакцию останавливали добавлением HCl и считывали поглощение при 450 нм. Активность dAb против TNF приводила к уменьшению связывания TNF, и, следовательно, к уменьшению поглощения по сравнению с контролем TNF самим по себе.

Исследование цитотоксичности на клетках L929

dAb против TNF исследовали на способность нейтрализовать цитотоксическую активность TNF на мышинных фибробластах L929 (Evans, T. (2000), *Molecular Biotechnology* 15, 243-248). Кратко, клетки L929, высеянные на титрационный микропланшет инкубировали в течение ночи с dAb против TNF, 100 пг/мл TNF и 1 мг/мл актиномицина D (Sigma, Poole, UK). Жизнеспособность клеток оценивали считыванием поглощения при 490 нм с последующей инкубацией с [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолием (Promega, Madison, USA). Активность dAb против TNF приводила к уменьшению цитотоксичности TNF и, следовательно, к увеличению поглощения по сравнению с контролем TNF самим по себе.

При начальном скрининге супернатанты, приготовленные для анализа Biacore, описанного выше, использовали также для исследования на рецепторах. Дальнейший анализ выбранных димеров также проводили в исследованиях на клетках и рецепторах с использованием очищенных белков.

Исследование на клетках HeLa IL-8

dAb против TNFR1 или против TNF-альфа исследовали на способность нейтрализовать индукцию секреции IL-8 посредством TNF в клетках HeLa (способ представляет собой адаптированный способ Akeson, L. et al. (1996), *Journal of Biological Chemistry* 271, 30517-30523, описывающих индукцию IL-8 посредством IL-1 в HUVEC; здесь авторы изобретения наблюдают индукцию человеческого TNF-альфа и используют клетки HeLa вместо клеточной линии HUVEC). Кратко, клетки HeLa, высеянные на титрационные микропланшеты инкубировали в течение ночи с dAb и 300 пг/мл TNF. После инкубации супернатант аспирировали от клеток и измеряли концентрацию IL-8 посредством сэндвич-ELISA (R&D Systems). Активность dAb против TNFR1 приводила к уменьшению секреции IL-8 в супернатант по сравнению с контролем TNF самим по себе.

Исследование на клетках L929 применяют в последующих экспериментах; тем не менее, применение исследования IL-8 на клетках HeLa предпочтительно для оценки лигандов против рецептора TNF 1 типа (p55); присутствие мышинового p55 в исследовании на клетках L929 накладывает определенные ограничения на его применение.

1.4. Секвенирование.

Проводили секвенирование димеров, интересующие свойства которых были подтверждены в исследованиях на рецепторах и Biacore. Последовательности подробно изложены в перечне последовательностей.

1.5. Форматирование.

1.5.1. Димеры TAR1-5-19.

Димеры TAR1-5, для которых были показаны хорошие нейтрализующие свойства, форматировали повторно и анализировали в исследованиях на клетках и рецепторах. Ведущее dAb TAR1-5 было заменено клоном TAR1-5-19 с созревшей аффинностью. Для осуществления этого TAR1-5 клонировали из отдельной димерной пары и заменяли на TAR1-5-19, амплифицированный посредством ПЦР. В дополнение, также конструировали гомодимеры TAR1-5-19 в векторах 3U, 5U и 7U. N-концевую копию гена амплифицировали посредством ПЦР и клонировали, как описано выше, и C-концевой фрагмент гена клонировали с использованием существующих сайтов рестрикции SalI и NotI.

1.5.2. Мутагенез.

Амбер-стоп-кодон, присутствующий в dAb2, одном из C-концевых dAb в димерных парах TAR1-5,

заменяли на глутамин сайт-направленным мутагенезом.

1.5.3. Fab.

Димеры, содержащие TAR1-5 или TAR1-5-19, повторно форматировали в векторы экспрессии Fab. dAb клонировали в векторы экспрессии, содержащие гены либо СК, либо СН, с использованием сайтов рестрикции Sfi1 и Not1 и верифицировали секвенированием. Вектор СК имеет происхождение от основанного на pUC устойчивого к ампициллину вектора, и вектор СН от вектора pACYC, устойчивого к хлорамфениколу. Для экспрессии Fab клетки HB2151 со-трансформировали конструкциями dAb-СН и dAb-СК и выращивали в 2хТУ, содержащем 0,1% глюкозы, 100 мкг/мл ампициллина и 10 мкг/мл хлорамфеникола.

1.5.4. Димеризация через шарнирную область.

dAb димеризовали образованием цистеиновых связей. На С-концевой области dAb конструировали короткую аминокислотную последовательность EPKSGDKTHTCPPCP, модифицированную форму шарнирной области человеческого IgGc1. Олигонуклеотидный линкер, кодирующий эту последовательность синтезировали и отжигали, как описано ранее. Линкер клонировали в вектор pEDA, содержащий TAR1-5-19, с использованием сайтов рестрикции Xho1 и Not1. Димеризация происходит *in situ* в периплазме.

1.6. Экспрессия и очистка.

1.6.1. Экспрессия.

Супернатанты приготавливали в формате 2 мл 96-луночных планшетов для начального скрининга, как описано ранее. После начального скрининга проводили дальнейший анализ выбранных димеров. Димерные конструкции экспрессировали в клетках TOP10F' или HB2151 в виде супернатантов. Кратко, отдельную колонию из свежезасеянного планшета выращивали в течение ночи при 37°C в 2хТУ со 100 мкг/мл ампициллина и 1% глюкозы. Разведение 1/100 этой культуры засеивали в 2хТУ со 100 мкг/мл ампициллина и 0,1% глюкозы и выращивали при 37°C, встряхивая до OD600 приблизительно 0,9. Культуру затем индуцировали 1 mM IPTG в течение ночи при 30°C. Клетки удаляли центрифугированием и супернатант очищали с использованием агарозы с белком А или L.

Fab и цистеиновые димеры шарнирных областей экспрессировали как периплазматические белки в клетках HB2152. Разведение 1/100 культуры, инкубированной в течение ночи, засеивали в 2хТУ с 0,1% глюкозы и подходящими антибиотиками и выращивали при 30°C, встряхивая до OD600 приблизительно 0,9. Культуру затем индуцировали 1 mM IPTG в течение 3-4 ч при 25°C. Клетки собирали центрифугированием и осадок ресуспендировали в буфере препарата периплазмы (30 mM трис-HCl, pH 8,0, 1 mM этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), 20% сахарозы). После центрифугирования супернатант сохраняли и осадок ресуспендировали в 5 mM MgSO₄. Супернатант вновь собирали центрифугированием, объединяли и очищали.

1.6.2. Очистка с использованием белка A/L.

Использовали оптимизацию очистки димерных белков от агарозы с белком L (Affitech, Norway) или агарозы с белком А (Sigma, UK). Белок элюировали серией или в колонке с использованием перистальтического насоса. Использовали три буфера, 0,1 M фосфатно-цитратный буфер pH 2,6, 0,2 M глицин pH 2,5 и 0,1 M глицин pH 2,5. Было определено, что оптимальным условием было нахождение под действием перистальтического насоса с использованием 0,1 M глицина, pH 2,5, более 10 объемов колонки. Очистку от белка А проводили под действием перистальтического насоса с использованием 0,1 M глицина, pH 2,5.

1.6.3. Очистка жидкостной хроматографией быстрого разрешения (FPLC-очистка).

Дальнейшую очистку проводили посредством FPLC-анализа на системе АКТА Explorer 100 (Amersham Biosciences Ltd). Димеры TAR1-5 и TAR1-5-19 фракционировали катионообменной хроматографией (1 мл Resource S -Amersham Biosciences Ltd) и элюировали с использованием градиента 0-1 M NaCl в 50 mM ацетатном буфере, pH 4. Димеры шарнирных областей очищали ионообменной хроматографией (1 мл Resource Q Amersham Biosciences Ltd) и элюировали с использованием градиента 0-1 M NaCl в 25 mM трис-HCl pH 8,0. Fab очищали гель-хроматографией с использованием колонки с суперозой 12 (Amersham Biosciences Ltd) при скорости потока 0,5 мл/мин в PBS с 0,05% tween. После очистки образцы концентрировали с использованием концентраторов vivaspin 5K (Vivascience Ltd).

2.0. Результаты.

2.1. Димеры TAR1-5.

6×96 клонов были отобраны от селекции 2 раунда, включая все библиотеки и условия селекции. Образцы супернатантов приготавливали и анализировали посредством ELISA с антигеном и белком L, исследований Viacore и исследований связывания рецепторов. При ELISA определяли положительные связывающие клоны от каждого способа селекции и распределяли их между библиотеками 3U, 5U и 7U. Тем не менее, ввиду постоянного присутствия ведущего dAb не представлялось возможным разделить клоны с высокой и низкой аффинностью связывания этим способом, по этой причине проводили анализ Viacore.

Анализ Viacore проводили с использованием 2 мл супернатантов. Анализ Viacore выявил, что значения K_{off} димеров были значительно лучше по сравнению с мономерным TAR1-5. Значение K_{off}

мономера составляло более 10^{-1} М, для сравнения, значения K_{off} димеров составляли 10^{-3} - 10^{-4} М. Были выбраны шестнадцать клонов, которые, по-видимому, имели очень низкие скорости диссоциации, они имели происхождение от библиотек 3U, 5U и 7U и были отсекуены. В дополнение, супернатанты анализировали на способность нейтрализовать человеческий TNF α в исследовании на рецепторах.

6 наиболее удачных клонов (d1-d6 ниже), нейтрализовавшие в этих исследованиях, были отсекуены. Результаты показали, что из 6 полученных клонов было только 3 разных вторых dAb (dAb1, dAb2 и dAb3); тем не менее, там, где второе dAb обнаруживают более одного раза, они связаны линкерами разной длины.

TAR1-5d1: 3U линкер, второе dAb=dAb1 - иммунологическая пробирка с 1 мкг/мл антигена, промывание в течение ночи.

TAR1-5d2: 3U линкер, второе dAb=dAb2 - иммунологическая пробирка с 1 мкг/мл антигена, промывание в течение ночи.

TAR1-5d3: 5U линкер, второе dAb=dAb2 - иммунологическая пробирка с 1 мкг/мл антигена, промывание в течение ночи.

TAR1-5d4: 5U линкер, второе dAb=dAb3 - иммунологическая пробирка с 20 мкг/мл антигена, промывание в течение ночи.

TAR1-5d5: 5U линкер, второе dAb=dAb1 - иммунологическая пробирка с 20 мкг/мл антигена, промывание в течение ночи.

TAR1-5d6: 7U линкер, второе dAb=dAb1 - R1: иммунологическая пробирка с 1 мкг/мл антигена, промывание в течение ночи, R2: гранулы.

Шесть наиболее удачных клонов исследовали далее. Белок получали из периплазмы и супернатанта, очищали агарозой с белком L и исследовали в анализах на клетках и рецепторах. Уровни нейтрализации были различны (Таблица 1). Определяли оптимальные условия приготовления белка. Белок получали из клеток HB2151, поскольку супернатанты давали наибольший выход (приблизительно 10 мг/л культуры). Супернатанты инкубировали с агарозой с белком L в течение 2 ч при комнатной температуре или в течение ночи при 4°C. Гранулы промывали PBS/NaCl и вносили в колонку для FPLC с использованием перистальтического насоса. Гранулы промывали 10 объемами колонки PBS/NaCl и элюировали 0,1 М глицином, pH 2,5. В большинстве случаев димерный белок элюируют после мономера.

Димеры TAR1-5d1-6 очищали посредством FPLC. FPLC-очисткой получали три разновидности и идентифицировали их посредством электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS PAGE). Одна разновидность соответствует мономеру, и две разновидности соответствуют димерам различных размеров. Присутствие большей из двух разновидностей, возможно, обусловлено присутствием C-концевых меток. Эти белки исследовали в анализе на рецепторах. Данные, представленные в табл. 1, отражают оптимальные результаты, полученные от двух димерных разновидностей (фиг. 11).

Три вторых dAb из димерных пар (т.е. dAb1, dAb2 и dAb3) клонировали в виде мономеров и исследовали посредством ELISA и в исследованиях на клетках и рецепторах. Все три dAb специфично связывают TNF при ELISA с антигеном и не демонстрируют перекрестного взаимодействия с пластиком или BSA. В виде мономеров ни одно из dAb не является нейтрализующим в исследованиях на клетках или рецепторах.

2.1.2. Димеры TAR1-5-19.

TAR1-5-19 был заменен на TAR1-5 в шести наиболее удачных клонах. Анализ всех димеров TAR1-5-19 в исследованиях на клетках и рецепторах проводили с использованием всего белка (очищенного только белком L), если не указано иное (табл. 2). TAR1-5-19d4 и TAR1-5-19d3 имели наилучшие ND_{50} (приблизительно 5 нМ) в исследовании на клетках, это согласуется с результатами исследования на рецепторах и является улучшением по сравнению с мономером TAR1-5-19 (ND_{50} приблизительно 30 нМ). Несмотря на то что очищенные димеры TAR1-5 дают различные результаты в исследованиях на клетках и рецепторах, димеры TAR1-5-19 более непротиворечивы. Вариабельность была продемонстрирована при использовании различных элюирующих буферов в процессе очистки белка. Элюирование с использованием 0,1 М фосфатно-цитратного буфера, pH 2,6, или 0,2 М глицина, pH 2,5, хотя и удаляло весь белок из агарозы с белком L, в большинстве случаев приводило к уменьшению его функциональности.

TAR1-5-19d4 экспрессировали в ферментере и очищали катионо-обменной FPLC для получения полностью очищенного димера. Как с TAR1-5d4, FPLC-очисткой были получены три разновидности, соответствующие мономерной и двум димерным разновидностям. Определяли аминокислотную последовательность этого димера. Мономер TAR1-5-19 и TAR1-5-19d4 затем исследовали в анализах на рецепторах, и полученная IC_{50} для мономера составляла 30 нМ и для димера составляла 8 нМ. Результаты исследования на рецепторах для сравнения мономера TAR1-5-19, TAR1-5-19d4 и TAR1-5d4 показаны на фиг. 10.

Гомодимеры TAR1-5-19 изготавливали в векторах 3U, 5U и 7U, экспрессировали и очищали с использованием белка L. Белки исследовали в анализах на клетках и рецепторах, и определяли получаемые IC_{50} (для исследования на рецепторах) и ND_{50} (для исследования на клетках) (табл. 3, фиг. 12).

2.2. Fab.

Димеры TAR1-5 и TAR1-5-19 также клонировали в формат Fab, экспрессировали и очищали с использованием агарозы с белком L. Fab оценивали в анализах связывания рецепторов (табл. 4). Результаты показали, что для обоих димеров TAR1-5-19 и TAR1-5 уровни нейтрализации были сходны с исходными димерами с линкером Gly₄Ser, от которых они имели происхождение. TAR1-5-19 Fab, где TAR1-5-19 был представлен как на CH, так и на СК, экспрессировали, очищали с использованием белка L и оценивали в исследовании на рецепторах. Полученная IC₅₀ составляла приблизительно 1 нМ.

2.3. Димеры TAR1-27.

3×96 клонов отбирали от селекции 2 раунда, включая все библиотеки и условия селекции. 2-мл образцы супернатанта приготавливали для анализа в ELISA и биологических исследованиях. В ELISA с антигеном был получен 71 положительный клон. В исследовании неочищенных супернатантов на рецепторах были получены 42 положительных клон с ингибиторными свойствами (связывание TNF 0-60%). В большинстве случаев ингибиторные свойства коррелировали с интенсивным сигналом при ELISA. 42 клон были отсекуены, 39 из них имели уникальные последовательности второго dAb. Далее анализировали 12 димеров с наилучшими ингибиторными свойствами.

12 нейтрализующих клонов экспрессировали в виде 200-мл образцов супернатанта и очищали с использованием белка L. Их оценивали посредством ELISA с белком L и с антигеном, Biacore и в исследовании на рецепторах. Во всех случаях были получены интенсивные сигналы при ELISA. Анализ Biacore выявил, что все клоны имели высокие скорости ассоциации и диссоциации. Скорости ассоциации были улучшены по сравнению с мономерным TAR1-27, тем не менее, скорость диссоциации димеров TAR1-27 была больше (K_{off} составляет приблизительно от 10^{-1} до 10^{-2} М) больше, чем димеров TAR1-5, исследованных ранее (K_{off} составляет приблизительно 10^{-3} - 10^{-4} М). Стабильность очищенных димеров вызывала сомнения и, таким образом, для улучшения стабильности в очистку димеров TAR1-27 (d2 и d16) включали добавление 5% глицерина, 0,5% Triton X100 или 0,5% NP40 (Sigma). Добавление NP40 или Triton X100™ увеличивало выход очищенного продукта приблизительно в 2 раза. Оба димера оценивали в исследовании на рецепторах. Для TAR1-27d2 была получена IC₅₀ приблизительно 30 нМ при всех условиях очистки. Для TAR1-27d16 было показано отсутствие нейтрализующего эффекта при очистке без применения стабилизаторов, но для него была получена IC₅₀ приблизительно 50 нМ при очистке в стабилизирующих условиях. Других анализов проведено не было.

2.4. Димеры TAR2-5.

3×96 клонов отбирали от селекции второго раунда, включая все библиотеки и условия селекции. 2-мл образцы супернатанта приготавливали для анализа. ELISA с белком A и антигеном проводили для каждого планшета. Посредством Biacore были идентифицированы 30 интересных клонов с хорошими скоростями диссоциации (K_{off} варьирует от 10^{-2} до 10^{-3} М). Клоны секвенировали, и 13 уникальных димеров были идентифицированы посредством анализа последовательностей.

Таблица 1

Димеры TAR1-5

Димер	Тип клеток	Очистка	Белковая фракция	Условия элюирования	Исследование на клетках/исследование на рецепторах
TAR1-5d1	HB2151	Белок L + FPLC	Малая димерная разновидность	0,1 М глицин рН 2,5	RA приблизительно 30 нМ
TAR1-5d2	HB2151	Белок L + FPLC	Малая димерная разновидность	0,1 М глицин рН 2,5	RA приблизительно 50 нМ
TAR1-5d3	HB2151	Белок L + FPLC	Большая димерная разновидность	0,1 М глицин рН 2,5	RA приблизительно 300 нМ
TAR1-5d4	HB2151	Белок L + FPLC	Малая димерная	0,1 М глицин рН 2,5	RA приблизительно 3 нМ

			разновидность		
TAR1-5d5	HB2151	Белок L + FPLC	Большая димерная разновидность	0,1 М глицин рН 2,5	RA приблизительно 200 нМ
TAR1-5d6	HB2151	Белок L + FPLC	Большая димерная разновидность	0,1 М глицин рН 2,5	RA приблизительно 100 нМ

* Следует отметить, что 2 димер и 3 димер имеют одинаковое второе dAb (называемое dAb2), тем не менее, они имеют разные длины линкеров ($d2=(Gly_4Ser)_3$, $d3=(Gly_4Ser)_3$). dAb1 является dAb-партнером для 1, 5 и 6 димеров. dAb3 является dAb-партнером для 4 димера. Ни один из dAb-партнеров не проявляет нейтрализующей активности сам по себе. FPLC-очистка является катионообменной, если не указано иное. Оптимальные димерные разновидности для каждого димера, полученные посредством FPLC, были определены в этих исследованиях.

Таблица 2

Димеры TAR1-5-19

Димер	Тип клеток	Очистка	Белковая фракция	Условия элюирования	Исследование на клетках/исследование на рецепторах
TAR1-5-19d1	TOP10F'	Белок L	Общий белок	0,1 М глицин рН 2,0	RA приблизительно 15 нМ
TAR1-5-19d2	TOP10F'	Белок L	Общий белок	0,1 М глицин рН 2,0 0,05% NP40	RA приблизительно 2 нМ
TAR1-5d3	TOP10F'	Белок L	Общий белок	0,1 М глицин рН 2,0 0,05% NP40	RA приблизительно 8 нМ
TAR1-5-19d4	TOP10F'	Белок L + FPLC	FPLC-очищенная фракция	0,1 М глицин рН 2,0	RA приблизительно 2-5 нМ CA приблизительно 12 нМ
TAR1-5-19d5	TOP10F'	Белок L	Общий белок	0,1 М глицин рН 2,0 + NP40	RA приблизительно 8 нМ CA приблизительно 10 нМ
TAR1-5-19d6	TOP10F'	Белок L	Общий белок	0,1 М глицин рН 2,0	RA приблизительно 10 нМ

Таблица 3

Гомодимеры TAR1-5-19

Димер	Тип клеток	Очистка	Белковая фракция	Условия элюирования	Исследование на клетках/исследование на рецепторах
Гомодимер TAR1-5-19 3U	HB2151	Белок L	Общий белок	0,1 М глицин рН 2,5	RA приблизительно 20 нМ CA приблизительно 30 нМ
Гомодимер TAR1-5-19 5U	HB2151	Белок L	Общий белок	0,1 М глицин рН 2,5	RA приблизительно 2 нМ CA приблизительно 3 нМ
Гомодимер TAR1-5-19 7U	HB2151	Белок L	Общий белок	0,1 М глицин рН 2,5	RA приблизительно 10 нМ CA приблизительно 15 нМ
TAR1-5-19 с дисульфидно связанной шарнирной областью	HB2151	Белок L + FPLC	FPLC-очищенная фракция	0,1 М глицин рН 2,5	RA приблизительно 2 нМ
TAR1-5-19CH/TAR1-5-19CK	HB2151	Белок	Общий белок	0,1 М глицин рН 2,5	RA приблизительно 1 нМ

Таблица 4

Fab TAR1-5/TAR1-5-19

Димер	Тип клеток	Очистка	Белковая фракция	Условия элюирования	Исследование на клетках/исследование на рецепторах
TAR1-5CH/dAb1 CK	HB2151	Белок L	Общий белок	0,1 М цитрат рН 2,6	RA приблизительно 90 нМ
TAR1-5CH/dAb2 CK	HB2151	Белок L	Общий белок	0,1 М глицин рН 2,5	RA приблизительно 30 нМ CA приблизительно 60 нМ
dAb3CH/TAR1-5CK	HB2151	Белок L	Общий белок	0,1 М цитрат рН 2,6	RA приблизительно 100 нМ
TAR1-5-19CH/dAb1 CK	HB2151	Белок L	Общий белок	0,1 М глицин рН 2,0	RA приблизительно 6 нМ
dAb1 CH/TAR1-5-19CK	HB2151	Белок L	0,1М глицин рН 2,0	Мус/flag	RA приблизительно 6 нМ
TAR1-5-19CH/dAb2 CK	HB2151	Белок L	Общий белок	0,1 М глицин рН 2,0	RA приблизительно 8 нМ CA приблизительно 12 нМ
TAR1-5-19CH/dAb3CK	HB2151	Белок L	Общий белок	0,1 М глицин рН 2,0	RA приблизительно 3 нМ

Пример 7. Димеризация dAb связыванием концевых цистеинов.

Краткое изложение

Для димеризации dAb на С-конце белка конструировали свободный цистеин. При экспрессии белок образует димер, который может быть очищен двухстадийным способом очистки.

ПЦР-конструирование димера TAR1-5-19CYS

См. пример 8, где описан тример dAb. При выполнении протокола тримера образуется смесь мономера, димера и тримера.

Экспрессия и очистка димера TAR1-5-19CYS

Димер очищали из супернатанта культуры захватом на агарозе с белком L, как описано в примере 8.

Отделение мономера TAR1-5-19CYS от димера TAR1-5-19CYS

Перед катионообменным разделением в смешанном образце мономера/димера заменяли буфер в буфере с 50 мМ ацетатом натрия, pH 4,0, с использованием колонки PD-10 (Amersham Pharmacia), следуя руководству изготовителя. Образец затем наносили на 1 мл Resource S колонку для катионообменной хроматографии (Amersham Pharmacia), которую предварительно уравнивали с использованием 50 мМ ацетата натрия, pH 4,0. Мономер и димер разделяли с использованием следующего солевого градиента в 50 мМ ацетате натрия pH 4,0:

150-200 мМ хлорида натрия - 15 объемов колонки;

200-450 мМ хлорида натрия - 10 объемов колонки;

450-1000 мМ хлорида натрия - 15 объемов колонки.

Фракции, содержащие только димер, устанавливали с применением SDS-PAGE, затем объединяли и pH увеличивали до 8 добавлением 1/5 объема 1 М трис, pH 8,0.

Функциональное исследование связывания *in vitro*: исследование на рецепторах TNF и исследование на клетках

Аффинность димера в отношении человеческого TNF α определяли с применением исследования на рецепторах TNF и исследования на клетках. IC₅₀ в исследовании на рецепторах составляла приблизительно 0,3-0,8 нМ; ND₅₀ в исследовании на клетках составляла приблизительно 3-8 нМ.

Другие возможные форматы димеров TAR1-5-19CYS

ПЭГ-димеры и специально изготовленные синтетические малеимидные димеры

Nektar (Shearwater) предлагают спектр бималеимидных полиэтиленгликолей (ПЭГ, PEG) [mPEG2-(MAL)2 или mPEG-(MAL)2], которые могут делать возможным придание мономеру формата димера с небольшим линкером, разделяющим dAb, оба из которых связаны с ПЭГ, размер которого составляет от 5 до 40 кДа. Было показано, что mPEG-(MAL)2 массой 5 кДа (т.е. [TAR1-5-19]-цис-малеимид-PEC \times 2, где малеимиды связаны друг с другом в димер) имеет аффинность в исследовании связывания рецепторов TNF приблизительно 1-3 нМ. Также димер может также быть изготовлен с использованием TMEA (трис[2-малеимидоэтил]амин) (Pierce Biotechnology) или других бифункциональных линкеров.

Также возможно изготовление дисульфидного димера с применением способа химического сочетания с использованием 2,2'-дитиопиридина (Sigma Aldrich) и восстановленного мономера.

Присоединение полипептидного линкера или шарнирной области к С-концу dAb

Между dAb и концевым цистеиновым остатком может быть конструирован небольшой линкер, любой из (Gly₄Ser)_n, где n=от 1 до 10, например 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7, иммуноглобулиновый линкер (например, шарнирная область IgG, либо случайная пептидная последовательность (например, выбранная из библиотеки случайных полипептидных последовательностей). Затем он может быть использован для изготовления димеров, как описано выше.

Пример 8. Тримеризация dAb.

Краткое изложение

Для тримеризации dAb необходим свободный цистеин на С-конце белка. Цистеиновый остаток, восстановленный с образованием свободного тиола, может затем быть использован для специфического сочетания белка с тримерной молекулой малеимида, например TMEA (трис[2-малеимидоэтил]амин).

ПЦР-конструирование TAR1-5-19CYS

Следующие олигонуклеотиды были использованы для специфического ПЦР TAR1-5-19 с сайтами SalI и BamHI для клонирования и также для введения С-концевого цистеинового остатка.

SalI

```

Trp Ser Ala Ser Thr Asp* Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 TGG AGC GCG TCG ACG GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCT CTG TCT GCA TCT GTA
ACC TCG CGC AGC TGC CTG TAG GTC TAC TGG GTC AGA GGT AGG AGA GAC AGA CGT AGA CAT

```

```

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Tyr Leu His Trp

```

```

61  GGA GAC CGT GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT GAT AGT TAT TTA CAT TGG
    CCT CTG GCA CAG TGG TAG TGA ACG GCC CGT TCA GTC TCG TAA CTA TCA ATA AAT GTA ACC

    Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Glu Leu Gln
121  TAC CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTG ATC TAT AGT GCA TCC GAG TTG CAA
    ATG GTC GTC TTT GGT CCC TTT CGG GGA TTC GAG GAC TAG ATA TCA CGT AGG CTC AAC GTT

    Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
181  AGT GGG GTC CCA TCA CGT TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC
    TCA CCC CAG GGT AGT GCA AAG TCA CCG TCA CCT AGA CCC TGT CTA AAG TGA GAG TGG TAG

    Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro
241  AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCT ACG TAC TAC TGT CAA CAG GTT GTG TGG CGT CCT
    TCG TCA GAC GTT GGA CTT CTA AAA CGA TGC ATG ATG ACA GTT GTC CAA CAC ACC GCA GGA

                                                BamHI
                                                ~~~~~~

    Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Cys *** ** Gly Ser Gly
301  TTT ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CGG TGC TAA TAA GGA TCC GGC
    AAA TGC AAG CCG GTT CCC TGG TTC CAC CTT TAG TTT GCC ACG ATT ATT CCT AGG CCG

```

(* начало последовательности TAR1-5-19CYS)

Прямой праймер:

5'-TGGAGCGCGTTCGACGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCA-3.'

Обратный праймер:

5'-TTAGCAGCCGGATCCTTATTAGCACCGTTTGATTTCCAC-3'.

ПЦР-реакцию (объем 50 мкл) ставили следующим образом: 200 мкМ дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dNTP), 0,4 мкМ каждого праймера, 5 мкл десятикратного буфера PfuTurbo (Stratagene), 100 нг матричной плазмиды (кодирующей TAR1-5-19), 1 мкл фермента PfuTurbo (Stratagene), и объем доводили до 50 мкл стерильной водой. Использовали следующие условия ПЦР: начальная стадия денатурации 94°C в течение 2 мин, затем 25 циклов 94°C в течение 30 с, 64°C течение 30 с и 72°C течение 30 с. Также включали конечную стадию удлинения при 72°C в течение 5 мин. Продукт ПЦР очищали и расщепляли с использованием SaI и BamHI и лигировали в вектор, который также расщепляли теми же рестриктазами. Правильные клоны верифицировали секвенированием ДНК.

Экспрессия и очистка TAR1-5-19CYS

Вектором TAR1-5-19CYS трансформировали химически компетентные клетки BL21 (DE3) pLysS (Novagen), следуя протоколу изготовителя. Клетки, несущие плазмиду dAb, селективировали для использования 100 мкг/мл карбенициллина и 37 мкг/мл хлорамфеникола. Культуры содержали в 2-л рифленных колбах, содержащих 500 мл Terrific Broth (Sigma-Aldrich), 100 мкг/мл карбенициллина и 37 мкг/мл хлорамфеникола. Культуры выращивали при 30°C при 200 об/мин до оптической плотности при 600 нм (O.D.600) 1-1,5 и затем индуцировали 1 мМ IPTG (изопропил-бета-D-тиогаляктопиранозид, от Melford Laboratories). Экспрессию dAb продолжали в течение 12-16 ч при 30°C. Было обнаружено, что большая часть dAb присутствовала в культуральной среде. По этой причине клетки отделяли от среды центрифугированием (8000 g в течение 30 мин) и супернатант использовали для очистки dAb. На литр супернатанта добавляли 30 мл агарозы с белком L (Affitech) и связывание dAb продолжали течение 2 ч. Затем смолу давали осесть под действием силы тяжести в течение еще 1 ч, перед тем как откачивали супернатант. Агарозу затем помещали в колонку XK 50 (Amersham Pharmacia) и промывали 10 объемами колонки PBS. Связанное dAb элюировали 100 мМ глицином, pH 2,0, и фракции, содержащие белок, нейтрализовали добавлением 1/5 объема 1 М трис pH 8,0. На 1 л супернатанта культуры выделяли 20 мг чистого белка, которые содержали соотношение мономера и димера 50:50.

Тримеризация TAR1-5-19CYS

2,5 мл 100 мкМ TAR1-5-19CYS восстанавливали 5 мМ дитиотриетолом и оставляли при комнатной температуре на 20 мин. Затем в образце заменяли буфер с использованием колонки PD-10 (Amersham Pharmacia). Колонку предварительно уравнивали с использованием 5 мМ EDTA, 50 мМ фосфата натрия, pH 6,5, и образец наносили и элюировали, следуя руководствам изготовителя. Образец замораживали до использования. TMEA (трис[2-малеимидоэтил]амин) приобретали от Pierce Biotechnology. 20 мМ исходный раствор TMEA приготавливали в 100% DMSO (диметилсульфоксиде). Было обнаружено, что концентрация TMEA более 3:1 (молярное соотношение dAb:TMEA) вызывала быстрое осаждение и перекрестное сшивание белка. Также интенсивность осаждения и перекрестного

сшивания увеличивалась с повышением pH. Таким образом, с использованием 100 мМ восстановленного TAR1-5-19CYS, добавляли 25 мкМ TMEA для тримеризации белка и реакции давали идти при комнатной температуре в течение 2 ч. Было обнаружено, что добавление добавок, таких как глицерин или этиленгликоль, до 20% (объемное отношение (v/v)) значительно уменьшало осаждение тримера по мере прохождения реакции сочетания. После сочетания анализом SDS-PAGE было показано присутствие в растворе мономера, димера и тримера.

Очистка тримерного TAR1-5-19CYS

40 мкл 40% ледяной уксусной кислоты добавляли на 1 мл реакции TMEA-TAR1-5-19cys для снижения pH до приблизительно 4. Образец затем наносили на 1 мл Resource S колонку для катионообменной хроматографии (Amersham Pharmacia), которую предварительно уравнивали с использованием 50 мМ ацетата натрия pH 4,0. Димер и тример частично разделяли с использованием солевого градиента 340-450 мМ хлорида натрия, 50 мМ ацетата натрия, pH 4,0, 30 объемов колонки. Фракции, содержащие только тример, устанавливали с применением SDS-PAGE и затем объединяли, и pH увеличивали до 8 добавлением 1/5 объема 1 М трис pH 8,0. Для предупреждения осаждения тримера в течение стадий концентрации (с применением концентраторов Viva spin с отсечкой 5K; Vivascience), к образцу добавляли 10% глицерин.

Функциональное исследование связывания in vitro: исследование на рецепторах TNF и исследование на клетках

Аффинность тримера в отношении человеческого TNF α определяли с применением исследования на рецепторах TNF и исследования на клетках. IC₅₀ в исследовании связывания рецепторов составляла приблизительно 0,3 нМ; ND₅₀ в исследовании на клетках составляла от 3 до 10 нМ (например, 3 нМ).

Другие возможные форматы тримеров TAR1-5-19CYS

TAR1-5-19CYS можно также придать формат тримера с использованием следующих реагентов.

ПЭГ-тримеры и специально изготовленные синтетические малеимидные димеры

Nektar (Shearwater) предлагают спектр разветвленных ПЭГ, которые могут быть химически модифицированы на конце ПЭГ. Таким образом, использование ПЭГ-тримера с малеимидной функциональной группой на конце каждой цепи может сделать возможной тримеризацию dAb сходным образом с тем, как описано выше с применением TMEA. ПЭГ может также иметь преимущество увеличенной растворимости тримера, предупреждая, таким образом, проблему агрегации. Таким образом, можно получить тример dAb, где каждое dAb имеет C-концевой цистеин, связанный с малеимидной функциональной группой, где малеимидные функциональные группы связаны с ПЭГ-тримером.

Присоединение полипептидного линкера или шарнирной области к C-концу dAb

Между dAb и концевым цистеиновым остатком может быть конструирован небольшой линкер, любой из (Gly₄Ser)_n, где n=от 1 до 10, например 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7, иммуноглобулиновый линкер (например, шарнирная область IgG, либо случайная пептидная последовательность (например, выбранная из библиотеки случайных полипептидных последовательностей)). Кроме того, при использовании для изготовления мультимеров (например, димеров или тримеров), это может приводить к большей степени гибкости и большему расстоянию между отдельными мономерами, что может улучшить характеристики связывания мишени, например мишени из нескольких субъединиц, такой как человеческий TNF α .

Пример 9. Селекция набора отдельных доменных антител (dAb), направленных против человеческого сывороточного альбумина (HSA) и мышинового сывороточного альбумина (MSA).

В этом примере пояснен способ изготовления отдельного доменного антитела (dAb), направленного против сывороточного альбумина. Описана селекция dAb как против мышинового сывороточного альбумина (MSA), так и против человеческого сывороточного альбумина (HSA). В этом эксперименте использовали три библиотеки человеческих антител для фагового дисплея, каждая из которых основана на отдельной человеческой каркасной области для V_H (см. фиг. 13: последовательность модельного V_H, основанного на V3-23/DP47 и JH4b) или V_K (см. фиг. 15: последовательность модельного V_K, основанного на o12/o2/DPK9 и Jk1), с разнообразием боковой цепи, кодируемым кодонами NNK, введенным в области, определяющие комплементарность (CDR1, CDR2 и CDR3).

Библиотека 1 (V_H)

Разнообразие в положениях: H30, H31, H33, H35, H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H97, H98.

Размер библиотеки: 6,2×10⁹.

Библиотека 2 (V_H)

Разнообразие в положениях: H30, H31, H33, H35, H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H97, H98, H99, H100, H100a, H100b.

Размер библиотеки: 4,3×10⁹.

Библиотека 3 (V_K)

Разнообразие в положениях: L30, L31, L32, L34, L50, L53, L91, L92, L93, L94, L96.

Размер библиотеки: 2×10^9 .

В библиотеках V_H и V_K проводили предварительную селекцию для связывания лигандов общего типа, белка А и белка L, соответственно, таким образом, что большинство клонов в неселектированных библиотеках являются функциональными. Размеры библиотек, показанные выше, соответствуют размерам после предварительной селекции.

Два раунда селекции проводили на сывороточном альбумине с использованием каждой из библиотек по отдельности. Для каждой селекции антиген использовали для покрытия иммунологической пробирки (Nunc) в 4 мл PBS в концентрации 100 мкг/мл. В первом раунде селекции каждую из трех библиотек сортировали по отдельности против HSA (Sigma) и MSA (Sigma). Во втором раунде селекции фаг от каждой из шести селекции первого раунда сортировали против (1) того же антигена повторно (например, 1-й раунд MSA, 2-й раунд MSA) и (2) против реципрокного антигена (например, 1-й раунд MSA, 2-й раунд HSA), получая в результате двенадцать селекции 2-го раунда. В каждом случае после второго раунда селекции 48 клонов исследовали на связывание HSA и MSA. Растворимые фрагменты dAb получали, как описано для scFv-фрагментов Harrison et al., *Methods Enzymol.* 1996; 267:83-109, и следовали стандартному протоколу ELISA (Hoogenboom et al. (1991), *Nucleic Acids Res.*, 19: 4133), за исключением того, что в качестве блокирующего буфера использовали 2% tween PBS и связанные dAb выявляли либо белком L-HRP (Sigma) (для V_K), либо белком А-HRP (Amersham Pharmacia Biotech) (для V_H).

dAb, от которых получали сигнал интенсивнее фона, что указывало на связывание MSA, HSA или и того, и другого, исследовали в ELISA нерастворимой формы на связывание пластика самого по себе, но все были специфичны в отношении сывороточного альбумина. Клоны затем секвенировали (см. табл. 5), и при этом было выявлено, что была идентифицирована 21 уникальная последовательность dAb. Минимальное сходство (на аминокислотном уровне) между селектированными клонами V_K dAb составляло 86,25% ($(69/80) \times 100$; результат, когда все диверсифицированные остатки различны, например 24 и 34 клоны). Минимальное сходство между селектированными клонами V_H dAb составляло 94% ($(127/136) \times 100$).

Затем, dAb, связывающие сывороточный альбумин, исследовали на их способность к захвату биотинилированного антигена из раствора. Следовали протоколу ELISA (как описано выше), за исключением того, что планшеты для ELISA покрывали 1 мкг/мл белка L (для клонов V_K) и 1 мкг/мл белка А (для клонов V_H). Растворимый dAb захватывали из раствора, как описано в протоколе, и выявление проводили с использованием биотинилированного MSA или HSA и стрептавидина-HRP. Биотинилированный MSA и HSA готовили в соответствии с инструкциями изготовителя с целью получения в среднем 2 биотина на молекулу сывороточного альбумина. Были идентифицированы двадцать четыре клона, которые захватывали биотинилированный MSA из раствора при ELISA, табл. 5. Два из них (2 и 38 клоны ниже) также захватывали биотинилированный HSA. Затем, dAb исследовали на их способность связывать MSA, нанесенный на чип CM5 Biacore. Были обнаружены восемь клонов, которые связывали MSA на Biacore.

Таблица 5

dAb (все захватыва ют биотинили H рованный или MSA) к Библиотек а V _κ 3 матрицы (модели)	CDR1	CDR2	CDR3	Свя- зывает MSA в Биасоге	Свя- зывает биотини- рован- ный HSA
2, 4, 7, 41, к	SSYLN	RASPLQS	QQTYSVFPT	✓ все	4
38, 54, 46, 47, 52, 56, 13, 15, 30, 35, 19, 22, 23, 24, 31, 33, 34, 53, 11, 12, 17, 18, 16, 21, 25, 26, 27, 55, к	SSYLN FKSLK YYHLK RRYLK YNWLK LWHLR FRYLA FYHLA IWHLN YRYLR LKYLK LRYLR LRSLK FRHLK RKYLR RRYLN IKHLK YYHLK YKHLK FKSLK	RASPLQS NASYLQS KASTLQS QASVLQS RASSLQS HASLLQS HASHLQS PASKLQS RASRLQS KASSLQS NASHLQS KASWLQS AASRLQS AASRLQS TASSLQS AASSLQS GASRLQS KASTLQS NASHLQS NASYLQS	QQTYRIPPT QQVVYWPVT QQVRKVPRT QQGLYPFIT QQNVVIPRT QQSAVYPKT QQRLLYPKT QQRARWPRT QQVARVPRT QQYVGYPRT QQTTYYPIT QQVLYYPQT QQVVYWPAT QQVALYPKT QQNLEWPRT QQMLFYPKT QQGARWPQT QQVRKVPRT QQVGRYPKT QQVVYWPVT	✓	СВЯЗЫВА- ют ✓ оба СВЯЗЫВА- ют
1 (и 2) библио- тека V _H H матрица (модель)	XXYXXX G	XIXXXGXXTXYADSVK	XXXX (XXXX) FDY		
8, 10, 36, H	WVYQMD G SISAFGAKTLYADSVK SISSEFGSSTLYADSVK WSYQMT G		LSGKFDY GRDHNYSLFDY		

Во всех случаях каркасные области были идентичны каркасным областям в соответствующей модельной последовательности с разнообразием в CDR, как указано в табл. 5.

Из восьми клонов, связывавших MSA на Biacore, два клона, интенсивно экспрессируемых в *E. coli* (клоны MSA16 и MSA26), были выбраны для дальнейшего исследования (см. пример 10). Полные нуклеотидные и аминокислотные последовательности MSA16 и 26 даны на фиг. 16.

Пример 10. Определение аффинности и периода полувыведения MSA-связывающих dAb, MSA16 и MSA26, в сыворотке у мышей.

Как описано в US 20060251644, одним из обычных способов определения аффинности связывания

является оценка констант скорости ассоциации и диссоциации с применением системы поверхностного плазмонного резонанса Biacore™ (Biacore, Inc.). Биосенсорный чип активируют для ковалентного связывания мишени в соответствии с инструкциями изготовителя (Biacore). Мишень затем разводят и наносят на чип для получения сигнала в единицах резонанса (RU) иммобилизованного вещества. Поскольку сигнал в RU пропорционален массе иммобилизованного вещества, он отражает спектр плотностей иммобилизованной мишени на матрице. Данные о диссоциации согласуют с односайтовой моделью для получения K_{off} +/- s.d. (стандартное отклонение измерений). Константы скорости псевдопервого порядка (K_d) вычисляют для каждой кривой ассоциации, и наносят на график как функцию концентрации белка для получения K_{on} +/- s.e. (стандартная ошибка выравнивания). Равновесные константы диссоциации для связывания, K_d вычисляют на основе вычислений SPR как K_{off}/K_{on} .

dAb MSA16 и MSA26 экспрессировали в периплазме *E.coli* и очищали с использованием пакетной абсорбции на смоле для аффинной хроматографии с агарозой с белком L (Affitech, Norway) с последующим элюированием глицином при pH 2,2. Очищенные dAb затем анализировали ингибированием Biacore для определения K_d . Кратко, очищенные MSA16 и MSA26 исследовали для определения концентрации dAb, необходимой для достижения ответа в 200 RU на чипе Biacore CM5, покрытом MSA с большой плотностью. После определения необходимых концентраций dAb, антиген MSA в ряде концентраций, близких ожидаемой K_d , предварительно смешивали с dAb и инкубировали в течение ночи. Связывание dAb с покрытым MSA чипом Biacore в каждой предварительной смеси затем измеряли при высокой скорости потока 30 мкл/мин. Аффинности определяют с применением поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и Biacore (Karlsson et al., 1991). Система Biacore (Uppsala, Sweden) является предпочтительным способом определения аффинности связывания. В системе Biacore поверхностный плазмонный резонанс (SPR, Welford K. 1991, Opt. Quant. Elect. 23:1; Morton and Myszka, 1998, Methods in Enzymology 295: 268) использован для наблюдения биомолекулярных взаимодействий в реальном времени. При анализе Biacore легко генерируют константы скорости ассоциации, константы скорости диссоциации, равновесные константы диссоциации и константы аффинности. Получаемые кривые используют для создания графиков Klotz (Klotz, I.M. (1982), Science 217:1247-1249 и Klotz, I.M. (1983), J. Trends in Pharmacol. Sci. 4:253-255), которые дают расчетную K_d 200 нМ для MSA16 и 70 нМ для MSA26 (фиг. 17А и В).

Затем, клоны MSA16 и MSA26 клонировали в вектор экспрессии с НА-меткой (последовательность нуклеиновой кислоты: TATCCTTATGATGTTCCCTGATTATGCA, и аминокислотная последовательность: YPYDVPDYA) и количества 2-10 мг экспрессировали в *E.coli* и очищали из супернатанта с использованием аффинной смолы с агарозой с белком L (Affitech, Norway) и элюировали глицином при pH 2,2. Определяли период полувыведения dAb в сыворотке у мышей. MSA26 и MSA16 вводили как однократные внутривенные инъекции в дозе приблизительно 1,5 мг/кг мышам CD1. Анализ сывороточных концентраций проводили с использованием ловушки с козьими антителами против НА (Abeam, UK) и выявлением посредством ELISA с белком L-HRP (Invitrogen), который блокировали 4% Marvel. Для промывания использовали 0,05% tween PBS. Стандартные кривые известных концентраций dAb строили в присутствии 1x мышинной сыворотки для подтверждения сопоставимости с исследуемыми образцами. Моделирование с применением 2-компарментной модели показало, что MSA-26 имел $t_{1/2\alpha}$ 0,16 ч, $t_{1/2\beta}$ 14,5 ч и площадь под кривой (AUC) 465 ч×мг/мл (данные не показаны), и MSA-16 имел $t_{1/2\alpha}$ 0,98 ч, а $t_{1/2\beta}$ 36,5 ч и AUC 913 ч×мг/мл (фиг. 18). Оба клона MSA имели существенно продленный период полувыведения по сравнению с HEL4 (dAb против белого лизоцима куриного яйца), который имел $t_{1/2\alpha}$ 0,06 ч и $t_{1/2\beta}$ 0,34 ч.

Пример 11. Создание Fab-подобных фрагментов V_H - V_H и V_K - V_K с двойной специфичностью.

В этом примере описан способ изготовления V_H - V_H и V_K - V_K с двойной специфичностью как Fab-подобных фрагментов. Перед конструированием каждого из описанных Fab-подобных фрагментов, dAb, связывающие выбранные мишени, селективировали из библиотек dAb, сходных с описанными в примере 9. Выделяли V_H dAb, HEL4, связывающее лизоцим куриного яйца (Sigma), и также выделяли второе V_H dAb (TAR2h-5), связывающее рецептор TNF α (R and D systems). Их последовательности приведены в перечне последовательностей. V_K dAb, связывающее TNF α (TAR1-5-19), выделяли селекцией и созреванием аффинности, и последовательность также изложена в перечне последовательностей. В этих экспериментах было использовано второе V_K dAb (MSA 26), описанное в примере 9, последовательность которого представлена на фиг. 17б.

ДНК от векторов экспрессии, содержащих четыре dAb, описанных выше, расщепляли ферментами SalI и NotI для выделения ДНК, кодирующей dAb. Полоску ожидаемого размера (300-400 пар оснований (bp)) очищали расщеплением на агарозном геле и выделением полоски с последующей очисткой из геля с использованием набора для очистки из геля Qiagen gel purification kit (Qiagen, UK). ДНК, кодирующую dAb, затем вводили либо в векторы C_H , либо в векторы C_K (фиг. 8 и 9), как указано в табл. 6.

Таблица 6

dAb	Антиген-мишень	dAb V _H или dAb V _K	Введен- ие в вектор	Метка (С- конец)	Антибиотико- резистент- ность
HEL4	Лизоцим куриного яйца	V _H	C _H	тус	Хлорамфе- никол
TAR2-5	Рецептор TNF	V _H	C _K	flag	Ампициллин
TAR1-5- 19	TNF α	V _K	C _H	тус	Хлорамфе- никол
MSA 26	Мышиный сывороточный альбумин	V _K	C _K	flag	Ампициллин

Конструкциями V_H C_H и V_H C_K котрансформировали клетки HB2151. Отдельно, конструкциями V_K C_H и V_K C_K котрансформировали клетки HB2151. Культуры каждой из котрансформированных клеточных линий выращивали в течение ночи (в 2xТу, содержащем 5% глюкозы, 10 мкг/мл хлорамфеникола и 100 мкг/мл ампициллина для поддержания селекции антибиотиками как для плазмид C_H, так и для плазмид C_K). Культуры, выращиваемые в течение ночи, затем использовали для засева в свежую среду (2xТу, 10 мкг/мл хлорамфеникола и 100 мкг/мл ампициллина) и выращивали до OD 0,7-0,9 перед индукцией добавлением IPTG для экспрессии их конструкций C_H и C_K. Экспрессированный Fab-подобный фрагмент затем очищали из периплазмы посредством очистки с использованием белка А (для котрансформированных V_H C_H и V_H C_K) и очисткой на смоле с MSA для аффинной хроматографии (для котрансформированных V_K C_H и V_K C_K).

V_H-V_H с двойной специфичностью

Экспрессию V_H C_H и V_H C_K с двойной специфичностью исследовали электрофорезом белков на геле. Гель подвергали блоттингу и полоску ожидаемого размера для Fab-фрагмента можно было выявить при вестерн-блоттинге посредством как тус-метки, так и flag-метки, что указывало на присутствие как V_H C_H, так и V_H C_K частей Fab-подобного фрагмента. Затем, с целью определения присутствия двух половин лиганда с двойной специфичностью в одном и том же Fab-подобном фрагменте на планшетах для ELISA в течение ночи при 4°C наносили 100 мкл на лунку лизоцима куриного яйца (HEL) в концентрации 3 мг/мл в буфере с бикарбонатом натрия. Планшет затем блокировали (как описано в примере 1) 2% Tween PBS с последующей инкубацией с Fab-подобным фрагментом V_H C_H/V_H C_K с двойной специфичностью. Выявление связывания лиганда с двойной специфичностью с HEL проводили посредством некогатной цепи с использованием 9e10 (моноклонального антитела, связывающего тус-метку, Roche) и антитела против мышинового IgG-HRP (Amersham Pharmacia Biotech). Сигнал Fab-подобного фрагмента V_H C_H/V_H C_K с двойной специфичностью составлял 0,154 по сравнению с фоновым сигналом 0,069 для цепи V_H C_K, экспрессированной самой по себе. Это демонстрирует, что Fab-подобный фрагмент имеет специфичность связывания в отношении антигена-мишени.

V_K-V_K с двойной специфичностью

После очистки котрансформированного Fab-подобного фрагмента V_K C_H и V_K C_K с двойной специфичностью на смоле с MSA для аффинной хроматографии получаемый белок использовали для зондирования планшета для ELISA, покрытого 1 мкг/мл TNF α , и планшета для ELISA, покрытого 10 мкг/мл MSA. Как предсказывали, при выявлении белком L-HRP сигнал обоих планшетов для ELISA превышал фоновый (данные не показаны). Это указывало на то, что фракция белка, способного связывать MSA (и, таким образом, очищаемая на колонке с MSA для аффинной хроматографии), была также способна связывать TNF α в последующем ELISA, подтверждая двойную специфичность фрагмента антитела. Эту фракцию белка затем использовали для двух последующих экспериментов. Во-первых, планшет для ELISA, покрытый 1 мкг/мл TNF α , зондировали Fab-подобным фрагментом V_K C_H и V_K C_K с двойной специфичностью и также контрольным dAb, связывающим TNF α , в концентрации, которая, согласно вычислениям, дает сходный сигнал при ELISA. Как лиганды с двойной специфичностью, так и контрольное dAb, использовали для зондирования планшета для ELISA в присутствии и в отсутствие 2 мг/мл MSA. Сигнал от лунки с лигандом с двойной специфичностью был снижен более чем на 50%, но сигнал от лунки с dAb не был снижен вообще (см. фиг. 19а). Тот же белок подвергали исследованию на рецепторах с и без MSA, и также была показана конкуренция с MSA (см. фиг. 19в). Это показывает, что связывание MSA с лигандом с двойной специфичностью конкурирует со связыванием TNF α .

Пример 12. Создание связанных дисульфидными связями лигандов V_K-V_K с двойной специфичностью, специфичных в отношении мышинового сывороточного альбумина и TNF α .

В этом примере описан способ изготовления фрагмента антитела с двойной специфичностью, специфичного как в отношении мышинового сывороточного альбумина, так и TNF α , посредством химического связывания через дисульфидную связь. Как dAb MSA16 (из примера 1), так и dAb TAR1-5-19, повторно клонировали в вектор на основе pET с C-концевым цистеином и без меток. Два dAbs экспрессировали на уровне 4-10 мг и очищали из супернатанта с использованием аффинной смолы с агарозой с белком L (Affittech, Norway). Меченные цистеином dAb затем восстанавливали дитиотреитолом. dAb TAR1-5-19 затем связывали с дитиопиридином для блокирования повторного образования дисульфидных связей, приводящего к образованию гомодимеров PEP 1-5-19. Два разных dAb затем смешивали при pH 6,5 для стимулирования образования дисульфидной связи и формирования дисульфидно связанных гетеродимеров TAR1-5-19 и MSA16. Этот способ получения конъюгатов двух разных белков был изначально описан King et al. (King TP, Li Y Kochoumian L Biochemistry. 1978 vol 17:1499-506 Preparation of protein conjugates via intermolecular disulfide bond formation). Гетеродимеры отделяли от мономерных разновидностей катионообменной хроматографией. Разделение подтверждали по присутствию полосы ожидаемого размера на геле с додецилсульфатом натрия (SDS). Получаемые гетеродимерные разновидности исследовали в анализе на рецепторах TNF, и было обнаружено, что они имеют IC₅₀ нейтрализации TNF приблизительно 18 нМ. Затем, исследования на рецепторах повторяли с постоянной концентрацией гетеродимера (18 нМ) и серией разведений MSA и HSA. Присутствие HSA в ряде концентраций (до 2 мг/мл) не вызывало снижения способности димера ингибировать TNF α . Тем не менее, добавление MSA вызывало дозозависимое снижение способности димера ингибировать TNF α (фиг. 20). Это показывает, что MSA и TNF α конкурируют за связывание связанного дисульфидными связями димера TAR1-5-19 и MSA16.

Краткое изложение данных

Краткое изложение данных, полученных в экспериментах, изложенных в предыдущих примерах, приведено в приложении 4.

Пример 13. Селекция и описание dAb для связывания сывороточного альбумина от ряда видов.

dAb против человеческого сывороточного альбумина, мышинового сывороточного альбумина и свиного сывороточного альбумина селективировали, как описано ранее для dAb против MSA, за исключением следующих изменений протокола. Фаговые библиотеки синтетических доменов V_H представляли собой библиотеки 4G и 6G, которые основаны на человеческом V_{H3}, содержащем ген зародышевого типа DP47 и сегмент J_{H4}, для V_H и человеческом V_{K1} содержащем ген зародышевого типа DPK9 и сегмент J_{K1}, для V_K. Библиотеки содержат 1×10¹⁰ отдельных клонов. Субпопуляцию из библиотек V_H и V_K подвергали предварительной селекции для связывания лигандов общего типа, белка A и белка L, соответственно, таким образом, что большинство клонов в неселектированных библиотеках являлись функциональными. Размеры библиотек, показанные выше, соответствуют размерам после предварительной селекции.

Проводили два или три раунда селекции на мышинном, свином и человеческом сывороточном альбумине с использованием субпопуляций из библиотек V_H и V_K по отдельности. Для каждой селекции антиген был либо (1) нанесен на иммунологическую пробирку (Nunc) в 4 мл PBS в концентрации 100 мкг/мл, либо (2) биотинилирован и затем использован для селекции в растворе с последующим захватом на стрептавидиновые гранулы или нейтравидиновые гранулы. В каждом случае после второго или третьего раунда селекции, селективную ДНК клонировали в вектор экспрессии для получения растворимого dAb и собирали отдельные колонии. Растворимые фрагменты dAb получали, как описано для scFv-фрагментов Harrison et al. (Methods Enzymol. 1996; 267:83-109), и для каждой селекции 96 растворимых клонов исследовали на связывание ряда сывороточных альбуминов.

Скрининг клонов на связывание сывороточного альбумина от ряда видов проводили с использованием аппарата для поверхностного плазмонного резонанса Biacore (Biacore AB). Чип CM-5 Biacore покрывали сывороточным альбумином от разных видов с высокой плотностью в каждой из 2-4 проточных ячеек. dAb, демонстрировавшие связывание с одним или более рассматриваемыми сывороточными альбуминами, секвенировали и экспрессировали в объеме 50 мл, очищали с использованием белка L и затем подвергали скринингу в известной концентрации для связывания набора сывороточных альбуминов на чипе CM-5 Biacore, покрытом сывороточным альбумином с низкой плотностью во 2-4 проточных ячейках. Было обнаружено несколько dAb, связывавших сывороточный альбумин от ряда различных видов, и предпочтительные кандидаты, вместе с их профилями связывания, перечислены в табл. 7.

Таблица 7

	HSA (аффинность, если ее измеряли)	RSA (аффинность, если ее измеряли)	MSA (аффинность, если ее измеряли)	Сывороточный альбумин яванского макака (аффинность, если ее измеряли)
DOM7h-9	связывает 200 нМ	связывает	связывает	связывает
DOM7h-10	связывает	ND	ND	ND
DOM7h-11	связывает	связывает	связывает	связывает
DOM7h-12	связывает	ND	связывает	связывает
DOM7h-13	связывает	связывает	связывает	
DOM7h-14	связывает 38 нМ	связывает	связывает 27 нМ	связывает 123 нМ

Таким образом, в этом эксперименте авторы изобретения выделили dAb, связывающие HSA и альбумин от одного или более из ряда видов, не являющихся людьми. Например, авторы изобретения обнаружили dAb, связывающие (1) человеческий и мышинный альбумин, (2) человеческий альбумин и альбумин яванского макака, (3) человеческий и крысиный альбумин и (4) человеческий, мышинный, крысиный альбумин и альбумин яванского макака.

Пример 14. Определение периода полувыведения слитых белков dAb/HA-метка-эпитоп или dAb/мус-метка-эпитоп, связывающих сывороточный альбумин, в сыворотке у крысы и яванского макака, и определение периода полувыведения в сыворотке.

dAb против сывороточного альбумина яванского макака экспрессировали с С-концевыми HA- или мус-метками в периплазме *E.coli* и очищали с использованием пакетной абсорбции на смоле для аффинной хроматографии с агарозой с белком L (Affitech, Norway) для V_k dAb и пакетной абсорбции на смоле для аффинной хроматографии с агарозой с белком A для V_H dAb, с последующим элюированием глицином при pH 2,0. Для определения периода полувыведения в сыворотке группам из 3 яванских макаков однократно внутривенно вводили 2,5 мг/кг DOM7h-9, DOM7h-11 или DOM7h-14. Образцы крови получали серией заборов крови из бедренной вены или артерии в течение периода из 21 дня и из каждого образца приготавливали сыворотку. Образцы сыворотки анализировали посредством сэндвич-ELISA с применением козьих антител против HA (Abcam, Cambridge UK) или козьих антител против мус (Abeam, Cambridge UK), нанесенных на планшет для ELISA, с последующим выявлением белком L-HRP. Стандартные кривые известных концентраций dAb строили в присутствии сыворотки яванского макака в такой же концентрации, как для экспериментальных образцов, для подтверждения сопоставимости исследуемых образцов. Согласование двойного экспоненциального моделирования с 2-хкомпаратментной моделью (с использованием программного обеспечения Kaleidograph (Synergy software, PA, USA)) использовали для вычисления $t_{1/2\beta}$, см. табл. 8.

dAb против крысиного сывороточного альбумина экспрессировали с С-концевыми HA- или мус-метками в периплазме *E.coli* и очищали с использованием пакетной абсорбции на смоле для аффинной хроматографии с агарозой с белком L (Affitech, Norway) с последующим элюированием глицином при pH 2,0. dAb затем метили 3H с применением следующего способа. На каждый белок готовили один флакон: 300 мкл NSP распределяли по флакону и растворитель удаляли в мягком потоке азота при $\leq 30^\circ C$. Остаток затем ресуспендировали в диметилсульфоксиде (DMSO) (100 мкл). Аликвоту раствора белка (2,5 мл) добавляли к DMSO-раствору и смесь инкубировали в течение 6 мин при комнатной температуре. Ровно 2,5 мл раствора затем помещали на предварительно уравновешенную колонку PD10 (предварительно уравновешенную 25 мл забуференного фосфатом физиологического раствора, PBS) и элюат удаляли. Будут добавлять забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS, 3,5 мл) и собирать элюат. Таким образом получали раствор меченного белка в концентрации приблизительно 2 мг/мл. Определяли специфичную активность вещества и в зависимости от эффективного мечения раствор использовали немедленно или хранили при $-20^\circ C$ до востребования.

Для определения периода полувыведения в сыворотке группам из 4 крыс однократно внутривенно вводили 2,5 мг/кг DOM7h-9, DOM7h-11, DOM7h-13 или DOM7h-14. Образцы крови получали из хвостовой вены или артерии в течение периода из 7 дней и приготавливали сыворотку. Уровни 3H определяли жидкостно-сцинтилляционным измерением активности и концентрацию меченного белка в каждом образце вычисляли в соответствии с известной специфичной активностью белка, введенного в начале эксперимента. Согласование двойного экспоненциального моделирования с 2-хкомпаратментной моделью (с использованием программного обеспечения Kaleidograph (Synergy software, PA, USA)) использовали для вычисления $t_{1/2\beta}$, см. табл. 8.

Таблица 8

Агент	Каркас	t1/2β (у яванского макака)	t1/2β (у крысы)
DOM7h-9	V _к	3,8 суток	66 часов
DOM7h-11	V _к	5,2 суток	61 час
DOM7h-13	V _к	не исследовано	73 часа
DOM7h-14	V _к	6,8 суток	56 часов
DOM7r-3	V _к		53 часа
DOM7r-16	V _к		43 часа
Агент	Каркас	t1/2β (у яванского макака)	t1/2β (у крысы)
DOM7h-9	V _к	3,8 суток	66 часов
DOM7h-11	V _к	5,2 суток	61 час
DOM7h-13	V _к	не исследовано	73 часа
DOM7h-14	V _к	6,8 суток	56 часов
DOM7r-3	V _к		53 часа
DOM7r-16	V _к		43 часа

Период полувыведения альбумина у крысы и яванского макака составляет 53 ч (определено экспериментально) и 7-8 дней (согласно оценкам) соответственно. Из табл. 8 можно видеть, что период полувыведения dAb DOM7r-3, DOM7h-9, DOM7h-11, DOM7h-13 и DOM7h-14 у крысы близок или, по существу, одинаков с периодом полувыведения альбумина у крысы. Также можно видеть, что период полувыведения dAb DOM7h-11 и DOM7h-14 у яванского макака близок или, по существу, одинаков с периодом полувыведения альбумина у яванского макака. dAb DOM7h-14 имеет период полувыведения как у крысы, так и у яванского макака, по существу, одинаковый с периодом полувыведения альбумина у обоих видов.

Пример 15. Картирование эпитопов.

Три домена человеческого сывороточного альбумина были ранее экспрессированы в *Pichia pastoris* (Dockal Carter and Ruker (1999), *J. Biol. Chem.* 2000 Feb 4; 275(5):3042-50). Авторы изобретения экспрессировали те же домены с использованием вектора pPICZaA для *Pichia pastoris* и там, где необходимо, очищали их до гомогенности на матрице Mimetic Blue SA (поставщик: Prometic Biosciences), фиг. 21. Идентификацию домена сывороточного альбумина, связываемого dAb, оценивали одним из двух способов, иммунопреципитации доменных антител и конкурентного исследования ViaCore. Результаты показаны ниже на фиг. 22 и 23.

Для исследования иммунопреципитации 1 мл супернатанта *Pichia pastoris*, экспрессирующего какой-либо из I, II или III доменов HSA адаптировали к pH 7,4, и смешивали с 1 мкг dAb, и 10 мкл агарозы с белком A или белком L (для V_H или V_K dAb соответственно). Смесь перемешивали перевертыванием в течение 1 ч, чтобы сделать возможным образование комплекса, затем комплекс, связанный с агарозой, выделяли центрифугированием при 13000 g в течение 10 мин, супернатант фильтровали и осадочный материал промывали один раз с использованием PBS, и выделяли центрифугированием. Гранулы затем ресуспендировали в буфере для введения образцов при SDS-PAGE, содержащем дитиотреитол (DTT), нагретом до 70°C, в течение 10 мин, затем проводили электрофорез в 4-12% гелях NuPAGE для SDS-PAGE (поставщик: Invitrogen), и окрашивали SimplyBlue safestain.

Для конкурентного исследования ViaCore очищенные dAb готовили в концентрации до 1 мкМ в HBS-EP при pH 7,4, или 1 мкМ в 50 мМ цитратно-фосфатном буфере, 150 мМ NaCl, pH 5,0, и там, где необходимо, с 7 мкМ очищенного домена HSA. Исследования ViaCore при скорости потока 30 мкл/мин на поверхности чипа CM5, покрытого 500-1000 RU человеческого сывороточного альбумина, и чистой эталонной ячейке, использованной для субтракции исходного уровня.

В табл. 9 представлен список dAb, специфичных в отношении человеческого сывороточного альбумина и домена (доменов) человеческого сывороточного альбумина, которым они соответствуют при картировании (как определено посредством иммунопреципитации и/или ViaCore).

Таблица 9

Клон	Н/К	Картированный домен HSA
DOM7h-1	К	II домен
DOM7h-2	К	Nd
DOM7h-6	К	Nd
DOM7h-7	К	Nd
DOM7h-8	К	II домен
DOM7h-9	К	II домен
DOM7h-10	К	Nd
DOM7h-11	К	II домен
DOM7h-12	К	II домен
DOM7h-13	К	II домен
DOM7h-14	К	II домен
DOM7h-21	Н	Nd
DOM7h-22	Н	I+III домены
DOM7h-23	Н	Nd
DOM7h-24	Н	Nd
DOM7h-25	Н	Nd
DOM7h-26	Н	Nd
DOM7h-27	Н	III домен
DOM7h-30	Н	III домен
DOM7h-31	Н	Nd

Nd: не определено.

В заключение, большинство dAb связывают 2-й домен HSA, и, таким образом, ожидают, что они не конкурируют со связыванием человеческого сывороточного альбумина с FcRn. Два dAb (DOM7h-27 и DOM7h-30) связывают III домен.

dAb	Связываемый домен HSA	RU связывания HSA при 1 мкМ, pH 7,4	RU связывания HSA при 1 мкМ, pH 5,0	His в CDR
DOM7h-1	II	600с	150	нет
DOM7h-3	NI	0	0	
DOM7h-4	NI	0	0	
DOM7h-8	II	1000	250	нет
DOM7h-9	II	150	0	CDR1
DOM7h-11	II	250	0	CDR3
DOM7h-12	IIa	55	0	нет
DOM7h-13	II	300	40	2 в CDR3
DOM7h-14	II	20	0	нет
DOM7h-22	I + IIIb	100с	0	CDR2
DOM7h-27	III	50	0	нет
DOM7h-30	III	320	35	нет

Краткое изложение результатов картирования эпитопов AlbuAb™ (dAb, специфично связывающих сывороточный альбумин), связывающих HSA, и данных Вiasоге при pH 7,4 и 5,0.

Пример 16. Селекция dAb in vitro в присутствии метаболитов.

Молекулы альбумина аккумулируют эффекты воздействия других соединений в сыворотке в течение времени их жизни, составляющего приблизительно 19 дней. Эти эффекты включают связывание множества молекул, имеющих аффинность в отношении альбумина, включая, предпочтительно без ограничения, цистеин и глутатион как смешанные дисульфиды, витамин B₆, δ-билирубин, гемин, тироксин, длинноцепочечные и среднецепочечные жирные кислоты и глюкозу на ε-аминогруппах. Также, метаболиты, такие как ацетальдегид (продукт метаболизма этанола в печени), метаболиты жирных кислот, ацилглюкуронид и метаболиты билирубина. В дополнение, многие лекарственные

средства, такие как варфарин, галотан, салициловая кислота, бензодиазепины и другие (см. обзор в Fasano et al. 2005, IUBMB Life), и также 1-О-гемфибозил-β-D-глюкуронид, связывают сывороточный альбумин.

Соединения, которые, как обнаружено, связывают сывороточный альбумин, имеют тенденцию к связыванию определенных областей на молекуле альбумина, потенциально блокируя посредством этого эти области для связывания других молекул, таких как AlbuAb™ (dAb, специфично связывающих сывороточный альбумин). Для многих лигандов были идентифицированы области связывания, основные и наиболее полно охарактеризованные области связывания называют "область Sudlow 1" и "область Sudlow 2". Согласно этой номенклатуре 1 область расположена в субдомене HA и связывает варфарин и другие лекарственные средства, которые обычно представляют собой крупные гетероциклические анионные молекулы. 2 область расположена в субдомене IIIA и связывает ароматические карбоновые кислоты с растянутой конформацией, с отрицательным зарядом у одного конца молекулы, такие как стереотипичная 2 область лиганда, ибупрофен. Второстепенные области связывания как для варфарина, так и для ибупрофена, были идентифицированы на I и II доменах соответственно. Также существуют другие области связывания и их подобласти, что означает, что в циркуляции сывороточный альбумин существует в сложной смеси связанных лигандов с аффинностями, варьирующими от 1×10^{-2} М до 1×10^{-8} М. Олеиновая кислота, например, связывает до 7 областей на SA (J. Mol Biol. 2001, 314:955-60).

Человеческий сывороточный альбумин был в кристаллизованном комплексе с жирными кислотами (Petitpas I., Grune T., Bhattacharya A.A., Curry S. Nat. Struct Biol. (1998), 5:827-35). Области связывания для этих молекул расположены в гидрофобных углублениях у поверхности SA и распределены асимметрично, несмотря на почти трехмерную симметрию молекулы HSA. Позднее, использование различных рекомбинантных фрагментов сывороточного альбумина помогло более точно установить роль доменов в образовании областей связывания (например, Protein Sci (2000), 9:1455-65; J. Biol Chem. (1999), 274:29303-10). Вытеснение связанных лигандов из SA играет важную роль во взаимодействии лекарственных средств, например, период полувыведения варфарина уменьшается при его вытеснении из SA этанолом (J. Biol Chem. (2000), 275:38731-8). Аффинность других лекарственных средств в отношении SA изменяется присутствием других лекарственных средств в других областях связывания. Например, связывание диазепама со 2 областью увеличивает аффинность 1 области к теноксикаму в результате конформационных изменений при связывании. Это значимо влияет на фармакокинетические свойства (Fundam Clin Pharmacol. (1989), 3:267-79).

Таким образом, для AlbuAb™ (dAb, специфично связывающего сывороточный альбумин) является желательным выбрать такое, которое не изменяет характеристики связывания сывороточного альбумина для лекарственных средств, связываемых SA. В дополнение, там, где было показано, что связывание лекарственного средства изменяет конформацию SA, желательно иметь AlbuAb™ (dAb, специфично связывающее сывороточный альбумин), связывающее SA как в присутствии, так и в отсутствие лекарственного средства. Эти способы означают, что будет возможным идентифицировать такое AlbuAb™ (dAb, специфично связывающего сывороточный альбумин), у которого не будет значимых положительных или отрицательных лекарственных взаимодействий с ключевыми лекарственными средствами. Таким образом, в этом примере описана селекция фага для идентификации dAb, связывающих сывороточный альбумин в присутствии соединений и метаболитов, которые, вероятно, присутствуют, связанные с альбумином, *in vivo*. Селекции фагов проводят в присутствии одного или нескольких метаболитов или соединений, о которых известно, что они взаимодействуют с сывороточным альбумином *in vivo*. В этих селекциях идентифицируют AlbuAb™ (dAb, специфично связывающие сывороточный альбумин), которые будут связывать сывороточный альбумин таким образом, что, вероятно, этому связыванию не будет мешать присутствие метаболитов или других соединений.

Фаговые библиотеки, описанные в примере 1, используют, как описано в примере 1, для селекции против альбумина от одного или более из ряда видов, включая человека, яванского макака, крысу и мышь. Альбумин, используемый в качестве антигена, отличается от описанного в примере 1 тем, что его будут предварительно инкубировать с метаболитом или соединением в концентрации в 10-100 раз большей, чем концентрация самого альбумина. Это может быть проведено либо с одним соединением или метаболитом, либо с более чем одним соединением или метаболитом. В частности, это может быть проведено в присутствии соединений, занимающих I область альбумина или II область альбумина, или обе области. Эта концентрация метаболита также присутствует в буфере, используемом для покрытия иммунологических пробирок антигеном, и в буферах, используемых в течение ключевых стадий селекции. Стадии с присутствием метаболитов включают блокирующий буфер MPBS, используемый для блокирования иммунологических пробирок, покрытых антигеном, или биотинилированного антигена (для селекции в растворе), и также буфер, в котором блокируют фаговую библиотеку. В этом способе при добавлении заблокированного фага в иммунологическую пробирку или к биотинилированному антигену концентрацию метаболита сохраняют. Таким образом, в течение этапов селекции, на которых селекционируют фаг, связывающий альбумин, также присутствуют метаболиты, способные блокировать определенные области молекулы альбумина *in vivo*, конкурируя с фагом за связывание и направляя

селекцию в пользу тех dAb, которые связывают области альбумина, отличающиеся от блокируемых метаболитами.

В другой группе селекции проводят чередующиеся раунды селекции против сывороточного альбумина в присутствии и отсутствии связанных соединений или метаболитов. Это подтверждает селекцию тех dAb, которые могут связывать сывороточный альбумин как в присутствии, так и в отсутствие связанных соединений. В обеих схемах селекции возможна селекция dAb, способных вытеснять лекарственное средство, связанное с сывороточным альбумином, и на это проводят скрининг посредством измерения способности AlbuAbTM (dAb, специфично связывающего сывороточный альбумин) вытеснять связанное с SA лекарственное средство. Такие исследования хорошо обоснованы для лекарственных средств с малым размером молекул, и их легко адаптировать для этой цели. Для определения способности AlbuAbTM (dAb, специфично связывающего сывороточный альбумин) вытеснять связанные с SA лекарственные средства может быть использовано множество способов, хорошо известных в данной области техники. Они включают равновесный диализ, хроматографические способы на иммобилизованных лигандах или сывороточном альбумине, анализ ядерного магнитного резонанса (ЯМР). В следующем примере описано применение наиболее простого способа равновесного диализа. Другие технически более сложные способы позволяют получить по существу ту же информацию.

Раствор сывороточного альбумина готовят в определенной концентрации в физиологическом буфере, например буфере с 20 мМ фосфатом натрия, 150 мМ NaCl, pH 7,4. Лекарственное средство готовят в сходном буфере и оно синтезировано таким образом, что оно сохраняет свои исходные фармакологические свойства, но имеет радиоактивную метку, например тритий или ¹⁴C. Фрагмент антитела, связывающий сывороточный альбумин, готовят в определенной концентрации в сходном буфере.

В серию пробирок помещают раствор сывороточного альбумина и добавляют возрастающее количество AlbuAbTM (dAb, специфично связывающего сывороточный альбумин) таким образом, что концентрация сывороточного альбумина в каждой пробирке является фиксированной (например, 1% (процентное соотношение массы и объема (w/v)), приблизительно 150 мкМ), в то время как концентрация (dAb, специфично связывающего сывороточный альбумин)TM варьирует от 0 до 150 мкМ в серии пробирок. Это включает один экспериментальный набор.

Для каждого набора к пробирке добавляют пробирку или контейнер для диализа, содержащий фиксированную концентрацию лиганда с радиоактивной меткой. Диапазон концентраций от 0,2 до 10 мМ может быть подходящим, в зависимости от используемого лиганда, его аффинности и растворимости.

Размер молекул, способных проникать через мембрану, используемую для диализа должен быть таким, чтобы сывороточный альбумин и AlbuAbTM (dAb, специфично связывающее сывороточный альбумин) не диффундировали через нее, но лиганд с радиоактивной меткой диффундировал бы через нее свободно. Для этой цели достаточен пороговый размер 3,5 кДа.

Смесь перемешивают при фиксированной температуре, например 37°C, в течение фиксированного периода времени для того, чтобы сделать возможным равновесие лекарственного средства с радиоактивной меткой в обоих компартментах, например, в течение 5 ч. После этого времени должно быть достигнуто равновесие, на что влияет способность AlbuAbTM (dAb, специфично связывающего сывороточный альбумин), связывающего сывороточный альбумин, ингибировать связывание лекарственного средства.

Из обоих компартментов берут образцы и вычисляют радиоактивность с использованием сцинтилляционного счетчика. Концентрация лиганда, связанного с альбумином, может быть определена по различию вычислений между двумя компартментами. Стехиометрическая константа связывания K' может быть вычислена на основании равновесной концентрации связанного лиганда, b, свободного лиганда, c, и альбумина, p, в соответствии с уравнением $K' = b/c(p-b)$. Это предполагает связывание 1 молекулы лиганда с одной молекулой сывороточного альбумина.

Данные связывания могут затем быть вычислены с использованием графика Scatchard в соответствии с уравнением $r/c = nk - rk$, где r представляет собой долю альбумина, с которой связан лиганд (т.е. b/p), и p представляет собой число областей связывания на молекулу альбумина, и k представляет собой константу ассоциации для областей. Значения n и k могут быть определены из графиков r/c против r.

Там, где связывание AlbuAbTM (dAb, специфично связывающего сывороточный альбумин) блокирует связывание радиоактивно меченного лиганда, это будет влиять как на стехиометрическую константу связывания лиганда, так и на вероятное число областей связывания для лиганда. Можно предположить, что поскольку связывание AlbuAbTM (dAb, специфично связывающего сывороточный альбумин) будет происходить в одной определенной области на поверхности сывороточного альбумина, и некоторые лиганды имеют более чем одну область связывания на сывороточном альбумине, не все области связывания будут заблокированы. В случае, когда AlbuAbTM (dAb, специфично связывающее сывороточный альбумин) специфично связывает сывороточный альбумин в комплексе с лекарственным

средством и вытесняет лекарственное средство, имеющее низкий терапевтический индекс и связываемое сывороткой, пороговое значение аффинности для различения между AlbuAb™ (dAb, специфично связывающим сывороточный альбумин), способным вытеснить лекарственное средство из связи с сывороточным альбумином, и AlbuAb™ (dAb, специфично связывающим сывороточный альбумин), не способным вытеснить лекарственное средство из связи с сывороточным альбумином, будет варьировать от 10 нМ до 100 нМ. Пример этого способа приведен в следующей публикации: Livesey and Lund *Biochem J.* 204(1): 265-272 Binding of branched-chain 2-oxo acids to bovine serum albumin.

Пример 17. Образование лиганда с двойной специфичностью, содержащего неиммуноглобулиновый каркас CTLA-4, связывающий сывороточный альбумин, посредством CDR-переноса.

Домены CDR dAb7h14 используют для конструирования полипептида с неиммуноглобулиновым каркасом антигена, ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами, 4 типа (CTLA-4), связывающего человеческий сывороточный альбумин, следующим образом.

Последовательности CDR1 (RASQWIGSQLS; SEQ ID NO.: __), CDR2 (WRSSLQS; SEQ ID NO.: __) и CDR3 (AQGAALPRT; SEQ ID NO.: __) dAb7h14 переносят в растворимый процессированный мутант CTLA-4, содержащий V-подобный домен CTLA-4 (как описано в WO 99/45110; возможно, конструированный из CTLA-4, например, где удалены домены A2 и A3) взамен аминокислотных остатков нативного CTLA-4, соответствующих CDR1 (SPGKATE; SEQ ID NO.: __) в пределах петли S1-S2 (петля BC), CDR2 (YMMGNELTF; SEQ ID NO.: __) и CDR3 (LMYPPYYL; SEQ ID NO.: __) в пределах петли S5-S6 соответственно (подробности состава и/или структуры каркаса CTLA-4 см. в WO 00/60070; WO 99/45110; Metzler et al. *Nat. Struct. Biol.* 4: 527-53; и Nuttall et al. *Proteins Struct. Funct. Genet.* 36:217-27, все полностью включенные сюда посредством ссылки). Проводят экспрессию этого полипептида, имеющего происхождение от CTLA-4, в системе экспрессии, основанной на pGC, pPOW, или другой принятой в данной области техники системе экспрессии, с ожидаемым получением преимущественно мономерного растворимого белка. Исследуют белковую растворимость этого полипептида, имеющего происхождение от CTLA-4, и ожидают, что она превышает растворимость нативного внеклеточного полипептида CTLA-4. ELISA-анализ применяют для изучения специфичного связывания человеческого сывороточного альбумина очищенным мономерным полипептидом по сравнению с неспецифичными антигенами и по сравнению с полипептидами, имеющими происхождение от внеклеточного CTLA-4, с перенесенными на них неспецифичными полипептидами (например, соматостатином, замещенным в пределах петлевой структуры CDR1). Анализ связывания в реальном времени посредством Biacore проводят для оценки специфичного связывания человеческого сывороточного альбумина с иммобилизованным полипептидом, имеющим происхождение от CTLA-4, содержащим домены CDR dAb7h14 против человеческого сывороточного альбумина (специалисту в данной области техники будет ясно, что аффинность связывания может быть оценена с применением любого подходящего способа, включая, например, преципитацию меченого человеческого сывороточного альбумина, конкурентное исследование Biacore и т.п.). Возможно, экспрессию полипептида CTLA-4 против человеческого сывороточного альбумина усиливают, адаптируя кодирующую последовательность с применением "splice overlap" ПЦР для включения кодонов, предпочтительных для экспрессии в *E.coli*. При выявлении низкой аффинности в отношении человеческого сывороточного альбумина (например, значения K_d в мкМ-диапазоне или выше) или ее отсутствия, по меньшей мере одну из нескольких стратегий используют для улучшения свойств связывания человеческого сывороточного альбумина полипептида CTLA-4 с перенесенными CDR, включая любой из следующих способов, способствующих аффинности связывания.

Связывание человеческого сывороточного альбумина полипептидом (полипептидами) CTLA-4 с перенесенными CDR, представляющим CDR dAb7h14, оптимизируют посредством мутагенеза, возможно, в комбинации со способами параллельной и/или повторной селекции, как описано ниже, и/или, в противном случае, как известно в данной области техники. Полипептидные домены каркаса CTLA-4, окружающие полипептидные последовательности перенесенных CDR dAb7h14, подвергают случайному и/или NNK-мутагенезу, проводимому, как описано ниже. Такой мутагенез проводят в пределах последовательности CTLA-4 в отношении аминокислотных остатков вне CDR с целью разработки новых или улучшенных полипептидов, связывающих человеческий сывороточный альбумин. Возможно, полипептидные домены CDR dAb7h14, представленные в полипептиде CTLA-4 с перенесенными CDR, подвергают мутагенезу посредством, например, случайного мутагенеза, NNK-мутагенеза, "look-through" мутагенеза и/или другого способа, принятого в данной области техники. Возможно, для проведения таких способов мутагенеза используют ПЦР, что приводит к появлению разнообразия последовательностей в целевых последовательностях в полипептидах CTLA-4 с перенесенными CDR. Такие способы сходны с описанными ниже для образования библиотек dAb. В дополнение к случайному и/или "look-through" способам мутагенеза используют направленный мутагенез целевых аминокислотных остатков, где по структурной информации установлено, что определенные аминокислотные остатки имеют критическое значение для связывания человеческого сывороточного альбумина.

Полипептиды CTLA-4, содержащие последовательности перенесенных CDR dAb7h14, конструированные, как описано выше, подвергают способам параллельной и/или повторной селекции для идентификации тех полипептидов CTLA-4, которые оптимизированы для связывания человеческого сывороточного альбумина. Например, после получения библиотеки последовательностей полипептидов CTLA-4 с перенесенными CDR dAb7h14, эту библиотеку таких полипептидов подвергают фаговому дисплею и нескольким раундам селекции, требующим связывания сывороточного альбумина и/или пролиферации, как описано ниже для селекции dAb, связывающих сывороточный альбумин, из библиотек dAb. Возможно, селекцию проводят против сывороточного альбумина, иммобилизованного на иммунологических пробирках или против биотинилированного сывороточного альбумина в растворе. Возможно, аффинность связывания определяют с применением поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и Biacore (Karlsson et al., 1991), с применением системы Biacore (Uppsala, Sweden), где для полностью оптимизированных полипептидов, имеющих происхождение от CTLA-4, в идеальном случае достигают значений K_d аффинности связывания с человеческим сывороточным альбумином в нМ-диапазоне или менее.

После идентификации полипептидов, имеющих происхождение от CTLA-4, связывающих человеческий сывороточный альбумин, такие полипептиды затем используют для образования композиций лигандов с двойной специфичностью любым из способов, описанных ниже.

Пример 18. Образование лиганда с двойной специфичностью, содержащего неиммуноглобулиновый каркас CTLA-4, связывающий сывороточный альбумин, посредством селекции группировок, связывающих сывороточный альбумин.

Растворимый процессированный мутант CTLA-4, содержащий V-подобный домен нативного CTLA-4 (как описано в WO 99/45110; возможно, конструированный из CTLA-4, например, где удалены домены A2 и A3) и который был конструирован, чтобы содержать вариабельную область (области), представляют в библиотеке и подвергают методикам селекции и, возможно, созревания аффинности с целью получения молекул с неиммуноглобулиновым каркасом CTLA-4, связывающих человеческий сывороточный альбумин, для использования в лигандах по изобретению.

Проводят экспрессию этого полипептида, имеющего происхождение от CTLA-4, в системе экспрессии, основанной на рGC, рPOW, или другой принятой в данной области техники системе экспрессии. Исследуют белковую растворимость этого полипептида, имеющего происхождение от CTLA-4, и проводят мутагенез для увеличения растворимости полипептида (полипептидов), имеющего происхождение от CTLA-4, относительно растворимости нативного внеклеточного полипептида CTLA-4.

ELISA-анализ применяют для изучения возможного специфичного связывания человеческого сывороточного альбумина очищенным мономерным полипептидом по сравнению с неспецифичными отдельными вариабельными доменами, содержащими каркас, имеющий происхождение от CTLA-4, и по сравнению с полипептидами, имеющими происхождение от внеклеточного CTLA-4, с перенесенными на них неспецифичными полипептидами (например, полипептидом CTLA-4 с соматостатином, замещенным в пределах петлевой структуры CDR1). Анализ связывания в реальном времени посредством Biacore проводят для оценки специфичного связывания человеческого сывороточного альбумина с иммобилизованным полипептидом, имеющим происхождение от CTLA-4. Возможно, экспрессию полипептида CTLA-4 против человеческого сывороточного альбумина усиливают, адаптируя кодирующую последовательность с применением "splice overlap" ПЦР для включения кодонов, предпочтительных для экспрессии в E.coli. После выявления низкой аффинности связывания полипептида CTLA-4 в отношении человеческого сывороточного альбумина (например, значения K_d в мкМ-диапазоне или выше) или ее отсутствия, по меньшей мере одну из нескольких стратегий используют для придания свойств связывания человеческого сывороточного альбумина полипептиду CTLA-4, включая один или более из следующих способов, способствующих аффинности связывания.

Связывание человеческого сывороточного альбумина полипептидом (полипептидами) с каркасом CTLA-4 достигают и оптимизируют посредством способов мутагенеза, возможно, в комбинации со способами параллельной и/или повторной селекции, как описано ниже, и/или, в противном случае, как известно в данной области техники. Полипептидные домены CTLA-4 подвергают случайному и/или NNK-мутагенезу, проводимому, как описано ниже. Такой мутагенез проводят в отношении всего полипептида CTLA-4 или в отношении определенных последовательностей в пределах полипептида CTLA-4, возможно, с направленным воздействием на аминокислоты, соответствующие CDR (например, последовательности CDR1 и/или CDR3 рандомизируют и полученные полипептиды подвергают селекции, например, как описано в примере 6 WO 99/45110). Возможно, мутагенез направлен на определенные аминокислотные остатки, в отношении которых определено или предсказано, что они являются структурно важными для представления CDR-подобной петли. Мутагенез, в особенности, случайный мутагенез, проводят с целью разработки новых или улучшенных полипептидов, связывающих человеческий сывороточный альбумин. Возможно, для проведения таких способов мутагенеза используют ПЦР, что приводит к появлению разнообразия последовательностей в целевых последовательностях в полипептидах CTLA-4. (Такие способы сходны с описанными ниже для образования библиотек dAb.) В дополнение к случайным способам мутагенеза используют

направленный мутагенез целевых аминокислотных остатков, где по структурной информации установлено, что определенные аминокислотные остатки полипептидов CTLA-4 имеют критическое значение для связывания человеческого сывороточного альбумина.

Полипептиды CTLA-4, конструированные, как описано выше, подвергаются способам параллельной и/или повторной селекции для идентификации тех полипептидов CTLA-4, которые оптимизированы для связывания человеческого сывороточного альбумина. Например, после получения библиотеки последовательностей мутированных полипептидов CTLA-4 указанные библиотеки полипептидов подвергаются фаговому дисплею и нескольким раундам селекции, требующим связывания сывороточного альбумина и/или пролиферации, как описано ниже для селекции dAb, связывающих сывороточный альбумин, из библиотек dAb. Возможно, селекцию проводят против сывороточного альбумина, иммобилизованного на иммунологических пробирках, или против биотинилированного сывороточного альбумина в растворе. Возможно, аффинность связывания определяют с применением поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и Biacore (Karlsson et al., 1991), с применением системы Biacore (Uppsala, Sweden), где для полностью оптимизированных полипептидов, имеющих происхождение от CTLA-4, в идеальном случае достигают значений K_d аффинности связывания с человеческим сывороточным альбумином в нМ-диапазоне или менее.

После идентификации полипептидов CTLA-4, связывающих человеческий сывороточный альбумин, такие полипептиды затем используют для образования композиций лигандов с двойной специфичностью любым из способов, описанных ниже.

V-подобные домены CTLA-4

CTLA-4 является примером неиммуноглобулинового лиганда, связывающего специфичный партнер по связыванию, и также содержит V-подобные домены. Эти V-подобные домены отличаются от V-доменов антител или T-клеточных рецепторов, поскольку у них нет склонности к объединению друг с другом в молекулы Fv-типа. Такой неиммуноглобулиновый лиганд предоставляет альтернативную каркасную область для разработки новых связывающих группировок с высокими аффинностями в отношении молекул-мишеней. Таким образом, желательны растворимые однодоменные V-подобные связывающие молекулы, имеющие происхождение от CTLA-4.

Антиген 4 типа, ассоциированный с цитотоксическими T-лимфоцитами, (CTLA-4) вовлечен в T-клеточную регуляцию в течение иммунного ответа. CTLA-4 представляет собой гомодимер массой 44 кДа, экспрессируемый первоначально и кратковременно на поверхности активированных T-клеток, где он взаимодействует с поверхностными антигенами CD80 и CD86 на антиген-представляющих клетках, влияя на регуляцию иммунного ответа (Waterhouse et al. 1996 Immunol Rev 153: 183-207, van der Merwe et al. 1997 J. Exp Med 185: 393-403). Каждая мономерная единица CTLA-4 состоит из N-концевого внеклеточного домена, трансмембранной области и C-концевого внутриклеточного домена. Внеклеточный домен содержит N-концевой V-подобный домен (VLD; с предсказываемой молекулярной массой приблизительно 14 кДа по гомологии с суперсемейством иммуноглобулинов) и стебелек из приблизительно 10 остатков, соединяющий VLD с трансмембранной областью. VLD содержит поверхностные петли, соответствующие CDR-1, CDR-2 и CDR-3 V-домена антитела (Metzler et al. 1997 Nat Struct Biol 4: 527-531). Недавние структурные и мутационные исследования CTLA-4 указывают, что связывание CD80 и CD86 происходит через поверхность VLD, образованную V-подобными бета-цепями A'GFCC' и также высококонсервативной последовательностью MYPPPY в CDR3-подобной поверхностной петле (Peach et al. 1994 J. Exp Med 180: 2049-2058; Morton et al. 1996 J. Immunol. 156: 1047-1054; Metzler et al. 1997 Nat Struct Biol 4: 527-531). Димеризация мономеров CTLA-4 происходит через дисульфидную связь между цистеиновыми остатками (CYS120) в двух стеблях, что приводит к связыванию двух внеклеточных доменов, но, вероятно, без непосредственного объединения V-подобных доменов (Metzler et al. 1997 Nat Struct Biol 4: 527-531).

Ранее было показано, что замещение петлевых структур CDR в пределах VLD приводит к образованию мономерных, правильно свернутых молекул с измененными специфичностями связывания и улучшенной растворимостью. Соответственно, в определенных воплощениях образуют связывающую группировку, содержащую по меньшей мере один мономерный V-подобный домен (VLD), имеющий происхождение от CTLA-4, где по меньшей мере один мономерный V-домен характеризуется тем, что по меньшей мере одна петлевая структура CDR или ее часть модифицирована или заменена таким образом, что растворимость модифицированного VLD улучшена по сравнению с немодифицированным VLD.

В определенных воплощениях по меньшей мере одна петлевая структура CDR или ее часть модифицирована или заменена таким образом, что (1) размер петлевой структуры CDR увеличен по сравнению с соответствующей петлевой структурой CDR в немодифицированном VLD; и/или (2) модификация или замещение приводит к образованию дисульфидной связи в пределах или между одной или более петлевыми структурами CDR.

В определенных воплощениях согласно настоящему изобретению предложена связывающая группировка, содержащая по меньшей мере один мономерный V-подобный домен (VLD), имеющий происхождение от CTLA-4, характеризующиеся тем, что по меньшей мере одна петлевая структура CDR или ее часть модифицирована или заменена таким образом, что (1) размер петлевой структуры CDR

изменен по сравнению с соответствующей петлевой структурой CDR в немодифицированном VLD; и/или (2) модификация или замещение приводит к образованию дисульфидной связи в пределах или между одной или более петлевыми структурами CDR.

В определенных воплощениях размер петлевой структуры CDR увеличивают по меньшей мере на два, более предпочтительно по меньшей мере на три, более предпочтительно по меньшей мере на шесть и более предпочтительно по меньшей мере на девять аминокислотных остатков. В других воплощениях модифицированная связывающая группировка по изобретению также демонстрирует измененную аффинность или специфичность связывания при сравнении с немодифицированной связывающей группировкой. Предпочтительно эффект замены или модификации петлевой структуры CDR состоит в снижении или устранении аффинности VLD в отношении одного или более природных лигандов немодифицированного VLD. Предпочтительно эффект замены или модификации петлевой структуры CDR также состоит в изменении специфичности связывания VLD (например, в образовании композиции, связывающей человеческий сывороточный альбумин). Таким образом, предпочтительно, что лиганд связывает специфичный партнер по связыванию (например, человеческий сывороточный альбумин), отличный от партнера по связыванию немодифицированного VLD.

Подразумевают, что фраза "VLD" относится к домену, имеющему сходные структурные характеристики с варибельным доменом тяжелой цепи (V_H) или варибельным доменом легкой цепи (V_L) антитела. Эти сходные структурные характеристики включают петлевые структуры CDR.

При использовании здесь термин "петлевые структуры CDR" относится к поверхностным полипептидным петлевым структурам или областям, сходным с областями, определяющими комплементарность, в V-доменах антител.

Будет ясно, что связывающие группировки, имеющие происхождение от CTLA-4, по настоящему изобретению могут быть соединены друг с другом, либо химически, либо генетически, для образования мультивалентных или мультифункциональных реагентов. Например, присоединение C-концевых хвостов, как, например, в нативном CTLA-4 с Cys²⁰, будет приводить к образованию димера. Связывающие группировки по настоящему изобретению могут также быть соединены с другими молекулами для различных композиций, включая содержащие лиганды с двойной специфичностью. Например, VLD CTLA-4 могут содержать C-концевой хвост или могут быть соединены со стрептавидином или биотином. VLD CTLA-4 могут также быть соединены с радиоактивными изотопами, маркерами-красителями или другими реагентами для визуализации для *in vivo* выявления и/или локализации злокачественных опухолей, сгустков крови и т.п. VLD CTLA-4 могут также быть иммобилизованы соединением с нерастворимыми устройствами и платформами для диагностических и биосенсорных применений.

В определенных воплощениях настоящего изобретения используют V-подобный домен внеклеточного CTLA-4. Одну или более поверхностные петли V-подобного домена CTLA-4 и предпочтительно петлевые структуры CDR1, CDR2 и CDR3 заменяют полипептидом, имеющим аффинность связывания в отношении сывороточного альбумина (например, доменами CDR dAb7h14 и последовательностями, имеющими происхождение от них, примеры которых приведены ниже). Будет ясно, что эти VLD CTLA-4 могут быть полиспецифичными и иметь аффинности, регулируемые как их природными поверхностями, так и модифицированными полипептидными петлями.

Одна или более петлевые структуры CDR VLD CTLA-4 могут быть заменены одной или более петлевыми структурами CDR, имеющими происхождение от антитела. Антитело может иметь происхождение от любого вида. В предпочтительном воплощении антитело имеет происхождение от человека, крысы, мыши, верблюда, ламы или акулы. Петлевые структуры CDR1 и CDR3 могут принимать неканонические конформации, крайне гетерогенные по длине. V-подобный домен может также обладать дисульфидной связью, соединяющей петлевые структуры CDR1 и CDR3 (как обнаружено в некоторых верблюжьих антителах V_{HH}) или петлевые структуры CDR2 и CDR3 (как обнаружено в некоторых антителах V_{HH} ламы).

Для применений *in vivo* предпочтительно, чтобы VLD были гомологичны субъекту, у которого проводят лечение или диагностику, и чтобы все возможные чужеродные антигены были удалены. Соответственно, предпочтительно, чтобы молекулы VLD для применения в клинических применениях были, по существу, гомологичны встречающимся в природе членам суперсемейства иммуноглобулинов человека.

Связывание сывороточного альбумина полипептидами CTLA-4 (например, VLD, имеющими происхождение от CTLA-4) может быть оптимизировано посредством селекции связывающей группировки с аффинностью в отношении сывороточного альбумина, например, включающей скрининг библиотеки полинуклеотидов для экспрессии связывающей группировки с аффинностью в отношении сывороточного альбумина, где полинуклеотиды подвергают мутагенезу, приводящему к модификации или замене по меньшей мере одной петлевой структуры CDR в по меньшей мере одном VLD, и где растворимость выделенного модифицированного VLD улучшена по сравнению с выделенным немодифицированным VLD.

Специалистам в данной области техники будет ясно, что в контексте такого способа скрининга

аффинности для введения модификаций в V-подобные домены может быть применен любой способ случайного или направленного мутагенеза. В предпочтительном воплощении мутагенез представляет собой направленный мутагенез. Возможно, направленный мутагенез включает замену по меньшей мере одной последовательности в пределах по меньшей мере одной петлевой структуры CDR с применением, например, "splice overlap" или другой ПЦР-технологии.

Специалистам в данной области техники также будет ясно, что библиотека полинуклеотидов может содержать последовательности, кодирующие VLD, содержащие петлевые структуры CDR, по существу, идентичные петлевым структурам CDR, обнаруживаемым во встречающихся в природе иммуноглобулинах, и/или последовательности, кодирующие VLD, содержащие петлевые структуры CDR, не встречающиеся в природе. Возможно, способ скрининга включает представление модифицированных V-доменов в виде слитых конструкций с белком III на поверхности частиц бактериофага.

Библиотека может содержать бактериофагальные векторы, такие как pHFA, fd-tet-dog или pFAB.5c, содержащие полинуклеотиды, кодирующие V-подобные домены. Способ скрининга может также включать представление модифицированных V-подобных доменов в рибосомальной дисплейной системе селекции.

Предпочтительные молекулы по изобретению, связывающие сывороточный альбумин, имеющие происхождение от CTLA-4, представляют следующие преимущества: (1) применение нативного человеческого белка устраняет необходимость последующей гуманизации рекомбинантной молекулы, стадии, часто необходимой для защиты от ответа иммунной системы при применении для лечения человека; (2) домен является мономерным по своему характеру, как описано выше (включение остатка Cys120 в С-концевой хвост приводит к образованию димерной молекулы); и (3) структурные модификации привели к улучшенным уровням экспрессии в *E.coli*.

Изначальное определение структуры нативного CTLA-4 сделало возможным моделирование и предсказание областей, соответствующих CDR1-, 2- и 3-областям антитела. Была выдвинута гипотеза, что такие области будут чувствительны к мутации или замене без существенного эффекта на каркасную область молекулы и, таким образом, сделают возможной экспрессию правильно свернутой молекулы. Опубликованная структура CTLA-4 (Metzler et al. 1997, *Nat Struct Biol* 4: 527-531) продемонстрировала точность этих предсказаний, за исключением неожиданного отделения CDR1 от лигандсвязывающей области и протяженного изгиба CDR3 с образованием плоской поверхности, расположенной рядом с лигандсвязывающей плоскостью.

V-подобные домены предоставляют основную каркасную область для конструирования растворимых однодоменных молекул, где специфичность связывания молекулы может быть изменена модификацией петлевых структур CDR. Остатки основной каркасной области V-подобного домена могут быть модифицированы в соответствии со структурными характеристиками антител представителей семейства верблюдовых. Верблюжий иммуноглобулин из тяжелых цепей отличается от структур "обычных" антител тем, что они состоят из цепей V_{HH} (Hamers-Casterman et al. 1993 *Nature* 363: 446-448). Антитела представителей семейства верблюдовых состоят из двух тяжелых цепей, каждая из которых содержит домен V_{HH} . Несколько уникальных свойств позволяют этим антителам преодолевать двойные проблемы растворимости и неспособности предоставить достаточно обширную антигенсвязывающую поверхность.

Во-первых, несколько необычных замен (преимущественно гидрофобных аминокислот на полярные по своему характеру) в подверженных воздействию остатках каркасных областей сокращают гидрофобную поверхность, сохраняя в то же время внутреннюю бета-складчатую структуру каркасной области (Desmyter et al. 1996 *Nat Struct Biol* 3:803-811). Кроме того, в пределах трех петель CDR несколько структурных характеристик компенсируют потерю антигенсвязывающей поверхности, обычно предоставляемой доменом VL. В то время как петля CDR2 существенно не отличается от других доменов V_H , петли CDR1 и CDR3 принимают неканонические конформации, крайне гетерогенные по длине. Например, петля H1 может содержать любое число остатков от 2 до 8 по сравнению с обычными пятью в молекулах Ig. Тем не менее, наибольшее разнообразие демонстрирует петля CDR3: у 17 описанных последовательностей верблюжьих антител длина этой области варьирует от 7 до 21 остатка (Muyldermans et al. 1994 *Protein Eng* 7: 1129-1135). В-третьих, многие домены V_{HH} представителей семейства верблюдовых обладают дисульфидной связью, соединяющей CDR1 и CDR3 в случае верблюдов и соединяющей CDR1 и CDR2 в случае лам (Vu et al. 1997 *Molec. Immunol.* 34: 1121-113). Функция этого структурного свойства, по-видимому, состоит в поддержании стабильности петель и обеспечении более контурированной, как отличной от плоской, конформации петель, которая как делает возможным связывание карманов в пределах антигена, так и дает увеличенную площадь поверхности. Тем не менее, не все антитела представителей семейства верблюдовых обладают этой дисульфидной связью, что указывает на то, что это не является абсолютным структурным требованием.

Настоящее изобретение также относится к способу образования и селекции отдельных молекул VLD с новыми аффинностями связывания в отношении молекул-мишеней (например, человеческого сывороточного альбумина). Этот способ включает применение хорошо известных методик молекулярной

эволюции к полипептидам, имеющим происхождение от CTLA-4. Способ может включать получение фаговых или рибосомальных дисплейных библиотек для скрининга большого числа мутированных полипептидов, имеющих происхождение от CTLA-4.

Геномы нитчатого fd-бактериофага конструируют таким образом, что фаг представляет, на его поверхности, такие белки, как Ig-подобные белки (scFv, Fab), кодируемые ДНК, которую содержит фаг (Smith, 1985 Science 228: 1315-1317; Huse et al. 1989 Science 246: 1275-81; McCafferty et al., 1990 Nature 348: 552-4; Hoogenboom et al., 1991 Nucleic Acids Res. 19: 4133-4137). Молекулы белка могут быть представлены на поверхности Fd-бактериофага, ковалентно связанные с белками оболочки фага, кодируемыми геном III или, реже, геном VIII. Введение генов антител в ген белка оболочки III приводит к экспрессии 3-5 молекул рекомбинантного белка на фаг, расположенных на концах. Наоборот, введение генов антител в ген VIII дает возможность представить приблизительно 2000 копий рекомбинантного белка на фаговую частицу, тем не менее, это мультивалентная система, способная маскировать аффинность отдельного представленного белка. Также используют Fd-фагмидные векторы, поскольку они могут быть легко переключены с представления функциональных Ig-подобных фрагментов на поверхности fd-бактериофага на секрецию растворимых Ig-подобных фрагментов в E.coli. Представленные на фаге рекомбинантные слитые белки с N-концом гена III белка оболочки делают возможными посредством терминирующего кодона, занимающего стратегическое положение между двумя генами белков. В штаммах E.coli с амбер-супрессором получаемые слитые белки домен IgG-ген III оказываются заякоренными в оболочке фага.

Способ селекции, основанный на аффинности белков, может быть применен к любым реагентам с высокой аффинностью связывания, таким как антитела, антигены, рецепторы и лиганды (см., например, Winter and Milstein, 1991 Nature 349: 293-299, полное содержание которой включено сюда посредством ссылки). Таким образом, селекцию белка с самой высокой аффинностью, представленного на бактериофаге, сочетают с получением гена кодирующего этот белок. Фаг, на котором представлен иммуноглобулиновый или неиммуноглобулиновый каркас, может быть селектирован по аффинности посредством связывания когнатных партнеров по связыванию, ковалентно связанных с гранулами или адсорбированных на пластиковые поверхности, способом, сходным с ELISA или твердофазными радиоиммунными анализами. В то же время как почти любая пластиковая поверхность будет адсорбировать белковые антигены, некоторые коммерческие продукты специально изготовлены для этой цели, как, например, Nunc Immunotubes.

Рибосомные дисплейные библиотеки включают полипептиды, синтезированные de novo в трансляционных системах, свободных от клеток, и представленные на поверхности рибосом в целях селекции (Hanes and Pluckthun, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 4937- 4942; He and Taussig, 1997, Nucl. Acids Res. 25: 5132-5134). "Трансляционная система, свободная от клеток" рибосомы, растворимые ферменты, необходимые для синтеза белка (обычно из той же клетки, что и рибосомы), транспортные РНК, аденозинтрифосфат, гуанозинтрифосфат, систему регенерации рибонуклеозидтрифосфатов (такую как фосфоенолпируват и пируваткиназа) и соли, и буфер, необходимые для синтеза белка, кодируемого экзогенной матричной РНК (мРНК). Можно сделать так, что трансляция полипептидов будет происходить в условиях, сохраняющих интактные полисомы, т.е. где рибосомы, молекула мРНК и транслируемые полипептиды объединены в единый комплекс. Это в сущности приводит к "рибосомальному дисплею" транслируемого полипептида. Для селекции, транслируемые полипептиды, объединенные с соответствующим рибосомным комплексом, находятся в смеси с молекулой-мишенью (например, сывороточным альбумином), которая связана с матрицей (например, Dynabeads). Рибосомы, на которых представлены транслируемые полипептиды, будут связывать молекулу-мишень, и эти комплексы будут селектировать, и мРНК будут реамплифицировать с применением ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР).

Хотя существует несколько альтернативных способов модификации связывающих молекул, общий способ для всех представляемых белков соответствует модели, в которой отдельные связывающие реагенты селектируют из дисплейных библиотек по аффинности к их когнатному лиганду и/или рецептору. Гены, кодирующие эти реагенты, модифицируют любой одной или комбинацией из нескольких *in vivo* и *in vitro* стратегий мутации и конструируют в виде нового пула генов для представления и селекции связывающих молекул с наиболее высокой аффинностью.

Оценка аффинностей связывания

В определенных воплощениях лиганды с двойной специфичностью по настоящему изобретению, включая их молекулы-компоненты (например, неиммуноглобулиновые молекулы, связывающие человеческий сывороточный альбумин), оценивают на аффинность связывания в отношении белка-мишени (например, человеческого сывороточного альбумина). Связывание эпитопов белка-мишени может быть измерено обычными исследованиями связывания антигена, такими как ELISA, методиками, основанными на флуоресценции, включая резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET), или такими методиками, как поверхностный плазмонный резонанс, посредством которых измеряют большое количество молекул. Специфичное связывание антигенсвязывающего белка с антигеном или эпитопом может быть определено подходящим исследованием, включая, например, анализ Scatchard и/или

исследования конкурентного связывания, такие как радиоиммунные анализы (RIA), ферментные иммунологические исследования, такие как ELISA и "сэндвич" конкурентные исследования, и их различные варианты.

Аффинность связывания предпочтительно определяют с применением поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и Biacore (Karlsson et al., 1991), с использованием системы Biacore (Uppsala, Sweden). В системе Biacore поверхностный плазмонный резонанс (SPR, Welford K. 1991, Opt. Quant. Elect. 23: 1; Morton and Mysza, 1998, Methods in Enzymology 295: 268) использован для наблюдения биомолекулярных взаимодействий в реальном времени, и использован поверхностный плазмонный резонанс, посредством которого можно выявлять изменение угла резонанса света на поверхности тонкой золотой пленки на стеклянной основе в результате изменений коэффициента преломления поверхности в радиусе до 300 нм. При анализе Biacore легко генерируют константы скорости ассоциации, константы скорости диссоциации, равновесные константы диссоциации и константы аффинности. Аффинность связывания получают посредством оценки константы скорости ассоциации и диссоциации с применением системы поверхностного плазмонного резонанса Biacore (Biacore, Inc.). Биосенсорный чип активируют для ковалентного связывания мишени в соответствии с инструкциями изготовителя (Biacore). Мишень затем разбавляют и вводят на чип для получения сигнала в единицах ответа (RU) иммобилизованного вещества. Поскольку сигнал в RU пропорционален массе иммобилизованного вещества, он отражает диапазон плотностей иммобилизованной мишени на матрице. Данные о диссоциации согласуют с односайтовой моделью для получения $K_{off} \pm$ s.d. (стандартное отклонение измерений). Константу скорости псевдопервого порядка (K_d) вычисляют для каждой кривой ассоциации, и наносят на график как функцию концентрации белка для получения $K_{on} \pm$ s.e. (стандартная ошибка выравнивания). Равновесные константы диссоциации для связывания, K_d , вычисляют на основе вычислений SPR как K_{off}/K_{on} .

Как описано Phizicky and Field в Microb. Rev. (1995), 59:114-115, подходящий антиген, такой как HSA, иммобилизуют на декстрановом полимере и раствор, содержащий лиганд для HSA, такой как отдельный переменный домен, проходит через камеру, контактируя с иммобилизованным HSA. Отдельный переменный домен, задержанный иммобилизованным HSA, изменяет угол резонанса падающего света, приводя к изменению коэффициента преломления, вызванному увеличенными количествами белка, т.е. отдельного переменного домена, вблизи декстранового полимера. Поскольку все белки имеют одинаковый коэффициент преломления и поскольку существует линейная зависимость между изменением угла резонанса и концентрацией белка у поверхности, могут быть измерены изменения концентрации белка на поверхности, обусловленные связыванием белок/белок, см. Phizicky and Field, supra. Для определения константы связывания увеличение в единицах резонанса (RU) измеряют как функцию времени, пропуская раствор белка отдельного переменного домена мимо иммобилизованного лиганда (HSA) до стабилизации значений RU, затем уменьшение в RU измеряют как функцию времени с использованием буфера без отдельного переменного домена. Эту процедуру повторяют при нескольких различных концентрациях белка отдельного переменного домена. Подробный теоретический предшествующий уровень техники и способы описаны R. Karlsson, et al. (1991) J. Immunol Methods, 145, 229.

Программное обеспечение прибора вычисляет равновесную константу диссоциации (K_d), как описано выше. Равновесную константу диссоциации определяют применением поверхностного плазмонного резонанса (SPR), как описано в патенте США № 5573957, на основании таблицы значений dR_A/dt и R_A , где R в этом примере представляет собой комплекс HSA/отдельный переменный домен, как измерено Biacore в резонансных единицах, и где dR/dt представляет собой скорость образования комплексов HSA/отдельный переменный домен, т.е. производную кривой связывания; при нанесении на график dR_A/dt против R_A для нескольких различных концентраций отдельного переменного домена, и затем нанесении на график угловых коэффициентов этих линий против концентрации отдельного переменного домена, угловой коэффициент этого второго графика представляет собой константу скорости ассоциации (M^{-1}, s^{-1}). Константа скорости диссоциации или скорость, с которой HSA и отдельный переменный домен отсоединяются друг от друга, может быть определена с использованием кривой диссоциации, построенной на Biacore. Константа скорости диссоциации может быть измерена нанесением на график логарифма уменьшения ответа против времени и определением углового коэффициента. Равновесная константа диссоциации K_d =константа скорости диссоциации/константа скорости ассоциации.

Лиганд по любому аспекту настоящего изобретения включает лиганд имеющий или состоящий из по меньшей мере одного отдельного переменного домена в форме отдельного переменного домена-мономера или в форме нескольких отдельных переменных доменов, т.е. мультимера. Лиганд может быть модифицирован для того, чтобы содержать дополнительные группировки, как, например, слитый белок или конъюгат. Такой мультимерный лиганд, например, в форме лиганда с двойной специфичностью, и/или такой лиганд, содержащий или состоящий из отдельного переменного домена, т.е. мономера dAb, применимый в конструировании такого мультимерного лиганда, могут преимущественно диссоциировать от их когнатной мишени (мишеней) с K_d 300 нМ или менее, от 300 нМ

до 5 пМ (т.е. от 3×10^{-7} до 5×10^{-12} М), предпочтительно от 50 нМ до 20 пМ или от 5 нМ до 200 пМ, или от 1 нМ до 100 пМ, 1×10^{-7} М или менее, 1×10^{-8} М или менее, 1×10^{-9} М или менее, 1×10^{-10} М или менее, 1×10^{-11} М или менее; и/или константой скорости K_{off} от 5×10^{-1} до 1×10^{-7} с⁻¹, предпочтительно от 1×10^{-6} до 1×10^{-8} с⁻¹, предпочтительно от 1×10^{-2} до 1×10^{-6} с⁻¹, или от 5×10^{-3} до 1×10^{-5} с⁻¹, или 5×10^{-1} с⁻¹ или менее, или 1×10^{-2} с⁻¹ или менее, или 1×10^{-3} с⁻¹ или менее, или 1×10^{-4} с⁻¹ или менее, или 1×10^{-5} с⁻¹ или менее, или 1×10^{-6} с⁻¹ или менее, как определено, например, поверхностным плазмонным резонансом. Константу скорости K_d определяют как K_{off}/K_{on} . Предпочтительно отдельный вариабельный домен будет специфично связывать антиген-мишень или эпитоп-мишень с аффинностью менее чем 500 нМ, предпочтительно менее чем 200 нМ и более предпочтительно менее чем 10 нМ, как, например, менее чем 500 пМ.

Липокалины

Пример 19. Образование лиганда с двойной специфичностью, содержащего неиммуноглобулиновый липокалиновый каркас, связывающий сывороточный альбумин посредством селекции группировок, связывающих сывороточный альбумин.

Билинсвязывающий белок (ВВР), липокалин, имеющий происхождение от *Pieris brassicae*, может быть реконструирован посредством конструирования гибридного белка, таким образом, что он распознает человеческий сывороточный альбумин. С этой целью нативный ВВР подвергают селекции из библиотеки и, возможно, созреванию аффинности, для получения молекул ВВР, связывающих человеческий сывороточный альбумин, для использования в лигандах с двойной специфичностью по изобретению.

Способность нативного ВВР связывать человеческий сывороточный альбумин изначально выявляют исследованием *Biacore*, как описано ниже для полипептидов, имеющих происхождение от CTLA-4 (специалисту в данной области техники будет ясно, что аффинность связывания может быть оценена любым подходящим способом, включая, например, осаждение меченного человеческого сывороточного альбумина, конкурентное исследование *Biacore* и т.п.). При выявлении низкой аффинности ВВР в отношении человеческого сывороточного альбумина (например, значения K_d в мкМ-диапазоне или выше) или ее отсутствия по меньшей мере одну из нескольких стратегий используют для придания ВВР свойств связывания человеческого сывороточного альбумина, включая любой из следующих способов, способствующих аффинности связывания.

Связывания человеческого сывороточного альбумина ВВР или полипептидом, имеющим происхождение от ВВР, достигают и оптимизируют посредством способов мутагенеза, возможно, в комбинации со способами параллельной и/или повторной селекции, как описано ниже, и/или, в противном случае, как известно в данной области техники. Полипептидные домены ВВР подвергают случайному и/или NNK-мутагенезу, проводимому, как описано ниже. Такой мутагенез проводят в отношении всего полипептида ВВР (или имеющего происхождение от ВВР) и/или проводят в отношении определенных последовательностей в пределах полипептида ВВР, включая 16 остатков, которые, как установлено, расположены в центре связывающей области нативного ВВР, образованной четырьмя петлями на верхушке бета-бочонка, состоящего из восьми цепей (Beste et al. 1999 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 1898-903). Возможно, такие способы мутагенеза рандомизированы для разработки новых или улучшенных полипептидов, связывающих человеческий сывороточный альбумин; и множество раундов мутагенеза могут быть проведены в процессе создания ВВР, оптимально связывающего человеческий сывороточный альбумин. Возможно, для проведения таких способов мутагенеза используют ПЦР, что приводит к формированию разнообразия последовательностей в целевых последовательностях в полипептидах ВВР (или имеющих происхождение от ВВР). (Такие способы сходны с описанными ниже для образования библиотек dAb.) В дополнение к случайным способам мутагенеза используют направленный мутагенез целевых аминокислотных остатков, где по структурной информации установлено, что определенные аминокислотные остатки полипептидов ВВР (или имеющих происхождение от ВВР) имеют критическое значение для связывания человеческого сывороточного альбумина.

Полипептиды ВВР или имеющие происхождение от ВВР, конструированные, как описано выше, подвергают способам параллельной и/или повторной селекции для идентификации тех полипептидов ВВР, которые оптимизированы для связывания человеческого сывороточного альбумина. Например, после получения библиотеки последовательностей мутированных полипептидов ВВР, указанную библиотеку полипептидов представляют на фаге и подвергают нескольким раундам селекции, требующим связывания человеческого сывороточного альбумина и/или пролиферации, как описано ниже для селекции dAb, связывающих сывороточный альбумин, из библиотек dAb. Возможно, селекцию проводят против сывороточного альбумина, иммобилизованного на иммунологических пробирках или против биотинилированного сывороточного альбумина в растворе. Возможно, аффинность связывания определяют с применением поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и *Biacore* (Karlsson et al., 1991), с применением системы *Biacore* (Uppsala, Sweden), где для полностью оптимизированных полипептидов, имеющих происхождение от ВВР, в идеальном случае достигают значений K_d аффинности связывания с человеческим сывороточным альбумином в нМ-диапазоне или менее.

После идентификации полипептидов ВВР, связывающих человеческий сывороточный альбумин, такие полипептиды затем используют для образования композиций лигандов с двойной специфичностью любым из способов, описанных ниже.

Белки с липокалиновым каркасом

Липокалины (Pervaiz and Brew, FASEB J. 1 (1987), 209-214) представляют собой семейство малых, часто мономерных, секреторных белков, которые были выделены от различных организмов, и чья физиологическая роль состоит в хранении или транспорте различных лигандов, а также в более сложных биологических функциях (Flower, Biochem. J. 318 (1996), 1-14). Липокалины демонстрируют относительно малое взаимное сходство последовательностей, и их принадлежность к одному структурному семейству белков была впервые выяснена рентгеноструктурным анализом (Sawyer et al., Nature 327 (1987), 659).

Первым липокалином с выясненной пространственной структурой был ретинолсвязывающий белок, Rbp, который осуществляет транспорт нерастворимого в воде витамина А в сыворотке крови (Newcomer et al., EMBO J. 3 (1984), 1451-1454). Через некоторое время была определена третичная структура билинсвязывающего белка, Bbp, от бабочки *Pieris brassicae* (Huber et al., J. Mol. Biol. 195 (1987), 423-434). Существенные структурные признаки этого класса белков описаны на примере пространственной структуры этого липокалина. Центральным элементом свернутой структуры липокалинов является цилиндрическая β -складчатая структура, так называемый β -бочонок, состоящая из восьми почти циркулярно расположенных антипараллельных β -цепей.

Этот элемент супервторичной структуры можно также рассматривать как "сэндвич"-образное расположение двух четырехцепочечных β -складчатых структур. Другими структурными элементами являются протяженный сегмент на N-конце полипептидной цепи и α -спираль вблизи C-конца, за которой, в свою очередь, следует протяженный сегмент. Эти дополнительные признаки, тем не менее, не обязательно были выявлены у всех липокалинов. Например, существенная часть N-концевого сегмента отсутствует в белке придатка яйца, связывающем ретиноевую кислоту (Newcomer, Structure (1993), 1: 7-18). Также известны дополнительные характерные структурные элементы, такие как, например, мембранные якорные структуры (Bishop and Weiner, Trends Biochem. Sci. (1996), 21: 127), присутствующие только в определенных липокалинах.

β -бочонок закрыт на одном конце плотным расположением аминокислот, а также петлевыми сегментами. На другом конце β -бочонок образует связывающий карман, где образуется комплекс липокалина и соответствующего лиганда. Восемь расположенных рядом антипараллельных β -цепей соединены попарно соответствующим образом шпильковыми изгибами полипептидной цепи, которые, совместно с близлежащими аминокислотами, все еще частично расположены в области цилиндрической P-складчатой структуры, и каждая из которых образует петлевой элемент. Связывающий карман для лигандов, в целом, образован в общей сложности этими четырьмя петлями. В случае Bbp, образование комплекса с биливердином IX_h происходит в этом связывающем кармане. Другим типичным лигандом для липокалинов является витамин А в случае Rbp, а также β -лактоглобулина (Papiz et al., Nature 324(1986), 383-385).

Как описано, например, в публикации патента США № 20060058510, члены липокалинового семейства полипептидов могут быть использованы для получения класса молекул, называемых "антикалинами", разработанных для распознавания новых лигандов посредством мутации аминокислот, расположенных в области четырех пептидных петель и на конце цилиндрической β -складчатой структуры, и которые характеризуются тем, что они связывают данные лиганды (например, человеческий сывороточный альбумин) с определяемой аффинностью.

Лигандсвязывающие области липокалинов имеют более простое строение, чем соответствующие области иммуноглобулинов. Липокалиновые полипептиды содержат только одно кольцо из 8 антипараллельных β -цепей: β -бочонок. Циклическая β -складчатая структура консервативна в белковой конформации липокалинов. Связывающая область образована в области входа в β -бочонок четырьмя пептидными петлями, каждая из которых соединяет две расположенные рядом β -цепи друг с другом. Эти пептидные петли могут существенно различаться по своей структуре между отдельными членами семейства липокалинов.

Для использования липокалинового полипептида в качестве неиммуноглобулинового каркаса одну или более из четырех пептидных петель, образующих лигандсвязывающую область липокалина, подвергают мутагенезу с последующим выбором, т.е. селекцией тех белковых вариантов (мутеинов), которые демонстрируют желаемую связывающую активность в отношении данного лиганда. Липокалиновые мутеины, полученные таким образом были названы "антикалины".

Четыре пептидные петли липокалинов, последовательность которых модифицируют мутагенезом в процессе получения антикалинов, характеризуются теми сегментами в линейной полипептидной последовательности ВВР, которые включают аминокислотные положения Bbp с 28 по 45, с 58 по 69, с 86 по 99 и с 114 до 129. Каждый из этих сегментов последовательности начинается перед C-концом одной из консервативных β -цепей на открытой стороне β -бочонка, включает существующую пептидную

шпильку и заканчивается после N-конца аналогично консервативной β -цепи, следующей за последовательностью.

Выравнивания последовательностей или структурные суперпозиции позволяет приписать положения последовательности, характерные для Vdp, другим липокалинам. Например, при выравниваниях последовательностей, соответствующих опубликованному выравниванию Peitsch and Boguski (New Biologist 2 (1990), 197-206), выявлено, что четыре пептидные петли ApoD включают аминокислотные положения с 28 по 44, с 59 по 70, с 85 по 98 и с 113 по 127. Тем же способом также возможно идентифицировать соответствующие пептидные петли в новых липокалинах, подходящих для мутагенеза.

Оказалось, что в некоторых случаях относительно малая гомология последовательностей липокалинов может являться проблемой при определении консервативных β -цепей. Таким образом, крайне важно, чтобы полипептидная последовательность была способна формировать циклическую β -складчатую структуру, состоящую из 8 антипараллельных 3-цепей. Это может быть определено с применением способов структурного анализа, таких как кристаллография белков или многомерная ядерная магнитно-резонансная спектроскопия.

В липокалинах, не являющихся Vdp, таких как, например, ApoD или Rbp, сегменты последовательности, подходящие для мутагенеза, могут, несомненно, быть длиннее или короче соответствующих сегментов последовательности Vdp на основании индивидуальной изменчивости структуры пептидных петель. Модификация длины сегментов последовательности посредством делеции или вставки одной или более аминокислот может даже быть предпочтительной. В определенных воплощениях мутагенезу подвергают те аминокислотные положения, которые соответствуют положениям последовательности Vdp с 34 по 37, 58, 60, 69, 88, 90, 93, 95, 97, 114, 116, 125 и 127. Соответственно, в случае ApoD, положения последовательности с 34 по 37, 59, 61, 70, 87, 89, 92, 94, 96, 113, 115, 123 и 125 предпочтительны для мутагенеза. Тем не менее, для получения антикалинов нет необходимости подвергать мутагенезу все положения последовательности, перечисленные выше.

Другие липокалины также применимы в качестве первичной структуры для получения антикалинов. Предпочтительно используют липокалины Rbp, Vbp или ApoD, которые к настоящему времени были исчерпывающе биохимически изучены. Применение липокалинов человеческого происхождения являются особенно предпочтительным для получения антикалинов. Это особенно применимо к тем случаям, когда предполагают применение получаемого антикалина (антикалинов) у человека, поскольку, например, в диагностических или терапевтических применениях *in vivo* ожидают минимальный иммуногенный эффект по сравнению с липокалинами от других организмов. Тем не менее, другие липокалины, а также липокалины, которые, возможно, еще предстоит открыть, могут оказаться особенно преимущественными для получения антикалинов. Также могут быть использованы искусственные белки с элементом конформации, структурно эквивалентным β -бочонку липокалинов.

Предпочтительно молекулы антикалинов по изобретению должны быть способны связывать желаемый лиганд (например, человеческий сывороточный альбумин) с определяемой активностью, т.е. с константой аффинности по меньшей мере 10^5 M^{-1} . Аффинности меньше этой в большинстве случаев не могут быть определены точно обычными способами и, таким образом, имеют второстепенное значение для практических применений. Особенно предпочтительны антикалина, связывающие желаемый лиганд с аффинностью по меньшей мере 10^6 M^{-1} , соответствующей константе диссоциации для комплекса 1 мкМ. Специалист в данной области техники может измерить аффинность связывания антикалина в отношении желаемого лиганда множеством способов, например флюоресцентным титрованием, конкурентным ELISA или методикой поверхностного плазмонного резонанса.

Липокалиновая кДНК, которая может быть получена и клонирована специалистом в данной области техники известными способами, может служить начальной точкой для мутагенеза пептидной петли, как это было, например, описано для Vbp (Schmidt and Skerra, Eur. J. Biochem. 219 (1994), 855-863). Альтернативно, геномная ДНК может также быть использована для синтеза генов, или может быть осуществлена комбинация этих способов. Для мутагенеза аминокислотных остатков четырех пептидных петель специалист в данной области техники имеет в своем распоряжении различные известные способы сайт-направленного мутагенеза посредством полимеразной цепной реакции. Способ мутагенеза может, например, характеризоваться тем, что для введения мутаций могут быть использованы смеси синтетических олигодезоксинуклеотидов, имеющими в своем составе вырожденные основания в желаемых положениях. Применение нуклеотидных составных блоков со сниженной специфичностью в отношении пар оснований, таких как, например, инозин, является также возможным вариантом для введения мутаций в выбранный сегмент последовательности или аминокислотные положения. Способ мутагенеза лигандсвязывающих областей упрощен по сравнению с антителами, поскольку в случае липокалинов с этой целью необходимо манипулировать только четырьмя сегментами последовательности, соответствующими упомянутыми выше четырем пептидным петлям, вместо шести.

В способах сайт-направленного случайного мутагенеза, включающих синтетические олигодезоксинуклеотиды, соответствующие аминокислотные положения в структуре липокалина,

подлежащие мутации, могут быть определены предварительно. Идеальная селекция аминокислотных положений, подлежащих мутации, может зависеть, с одной стороны, от используемого липокалина и, с другой стороны, от желаемого лиганда (например, человеческого сывороточного альбумина). Возможно, может быть полезным поддерживать общее число мутированных аминокислотных положений в одном эксперименте достаточно небольшим таким образом, что совокупность вариантов, полученных мутагенезом, т.е. так называемая библиотека, может, полностью или по меньшей мере в виде ее репрезентативной выборки, быть реализована с максимально возможной комбинационной сложностью не только на уровне кодирующих нуклеиновых кислот, но также на уровне продуктов генов.

Аминокислотные положения, подлежащие мутации, могут быть выбраны осмысленным способом, особенно когда имеется структурная информация, относящаяся к самому используемому липокалину, как в случае с Bbp и Rbp или по меньшей мере относящаяся к липокалину со сходной структурой, как, например, в случае ApoD. Набор выбранных аминокислотных положений может также зависеть от характеристик желаемого лиганда. Также может быть преимущественным исключить из мутагенеза отдельные аминокислотные положения в области лигандсвязывающего кармана, если будет выяснено, что они, например, являются необходимыми для эффективного фолдинга или стабильной конформации белка. Описаны способы мутагенеза липокалинов, основанные на специфичных олигонуклеотидах, например, в публикации патента США № 20060058510, полное содержание которой включено сюда посредством ссылки.

После экспрессии последовательностей нуклеиновых кислот, подверженных мутагенезу, клоны, несущие генетическую информацию об антикалинах, связывающих данный лиганд (например, человеческий сывороточный альбумин), могут быть селектированы из различных клонов полученной библиотеки. Для селекции этих клонов могут быть применены известные стратегии экспрессии и стратегии селекции. Такие способы были описаны в контексте получения или конструирования рекомбинантных фрагментов антител, как, например, методика "фагового дисплея" или способы "скрининга колоний" (Skerra et al., *Anal. Biochem.* 196 (1991), 151-155).

Методики "фагового дисплея" описаны, например, в Hoess, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3 (1993), 572-579; Wells and Lowman, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2 (1992), 597-604; and Kay et al., *Phage Display of Peptides and Proteins-A Laboratory Manual* (1996), Academic Press. Кратко, в типичном воплощении получают плазмиды, экспрессирующие мутированный структурный ген липокалина в виде слитого белка с сигнальной последовательностью на N-конце, предпочтительно сигнальной последовательностью OmpA, и с белком оболочки рIII фага M13 (Model and Russel, in "The Bacteriophages", Vol. 2 (1988), Plenum Press, New York, 375-456) или фрагментами этого белка оболочки, которые включены в оболочку фага, на C-конце. Предпочтительно для получения слитых белков используют C-концевой фрагмент ApIII белка оболочки фага, содержащий только аминокислоты с 217 по 406 природного белка оболочки рIII. Особенно предпочтителен C-концевой фрагмент рIII, где цистеиновый остаток в положении 201 отсутствует или заменен на другую аминокислоту. Дополнительное описание способов фагового дисплея, способов селекции и т.п., которые могут быть применены к липокалинам при получении "антикалинов", обладающих свойствами специфичного связывания, подробно изложены, например, в публикации заявки на патент США № 20060058510, полное содержание которой включено сюда посредством ссылки.

Антикалины могут быть идентифицированы и получены, например, с применением описанных выше способов, для того, чтобы они обладали высокой аффинностью в отношении данного лиганда (например, человеческого сывороточного альбумина). Для антикалинов могут быть достигнуты константы связывания лиганда, превышающие 10^6 M^{-1} , даже в случае, когда новый лиганд не имеет никакого структурного родства с биливердином IX_γ, исходным лигандом Bbp (см. публикацию заявки на патент США № 20060058510). Такие аффинности в отношении новых лигандов, достижимые с использованием антикалинов, сравнимы с аффинностями, известными для антител от вторичного иммунного ответа. Кроме того, дополнительно существует возможность подвергнуть полученные антикалины дополнительному, возможно, частично случайному мутагенезу для селекции вариантов с еще более высокой аффинностью из библиотеки, полученной таким образом. Соответствующие способы были уже описаны для случая рекомбинантных фрагментов антител с целью "созревания аффинности" (Low et al., *J. Mol. Biol.* 260 (1996), 359-368; Barbas and Burton, *Trends Biotechnol.* 14 (1996), 230-234), и специалист в данной области техники может, соответствующим образом, применить их также к антикалинам.

Стафилококковый белок А (SPA)/Аффитело

Пример 20. Образование лиганда с двойной специфичностью, содержащего неиммуноглобулиновый каркас аффитела (стафилококкового белка А (SPA)), связывающий сывороточный альбумин, посредством селекции группировок, связывающих сывороточный альбумин.

Домен Z стафилококкового белка А (SPA) подвергают методикам селекции в библиотеке и, возможно, созревания аффинности для получения молекул с неиммуноглобулиновым каркасом, имеющим происхождение от SPA (называемых "аффителами"), связывающих человеческий сывороточный альбумин, для использования в лигандах с двойной специфичностью по изобретению.

Исследования связывания в реальном времени посредством *Biacore* проводят для оценки специфического связывания человеческого сывороточного альбумина с иммобилизованным полипептидом SPA (специалисту в данной области техники будет ясно, что аффинность связывания может быть оценена любым подходящим способом, включая, например, осаждение меченного человеческого сывороточного альбумина, конкурентное исследование *Biacore* и т.п.). После выявления низкой аффинности неизмененного полипептида SPA в отношении человеческого сывороточного альбумина (например, значения K_d в мкМ-диапазоне или выше) или ее отсутствия по меньшей мере одну из нескольких стратегий используют для придания полипептиду SPA свойств связывания человеческого сывороточного альбумина, включая один или более из следующих способов, разработанных для придания и/или усиления аффинности связывания молекулы в отношении антигена-мишени.

Связывания человеческого сывороточного альбумина полипептидом (полипептидами), имеющим каркас SPA, достигают и оптимизируют способами мутагенеза, возможно, в комбинации со способами параллельной и/или повторной селекции, как описано ниже, и/или, в противном случае, как известно в данной области техники. Полипептидные домены каркаса SPA подвергают случайному и/или NNK-мутагенезу, проводимому, как описано ниже. Такой мутагенез проводят в отношении всего домена Z полипептида SPA или в отношении определенных последовательностей в пределах полипептида SPA, например, в отношении 13 поверхностных остатков домена Z, контактирующих с растворителем, как установлено в Nord et al. (1997 *Nat. Biotechnol.* 15: 772-77), и, возможно, рандомизируют для разработки новых или улучшенных полипептидов, связывающих человеческий сывороточный альбумин. Возможно, для проведения таких способов мутагенеза используют ПЦР, что приводит к формированию разнообразия последовательностей в целевых последовательностях в полипептидах SPA. (Такие способы сходны с описанными ниже для образования библиотек dAb.) В дополнение к случайным способам мутагенеза используют направленный мутагенез целевых аминокислотных остатков, где по структурной информации установлено, что определенные аминокислотные остатки полипептидов SPA имеют критическое значение для связывания человеческого сывороточного альбумина. В определенных воплощениях репертуары мутантных генов домена Z объединяют и вводят в фагмидный вектор, адаптированный для моновалентного фагового дисплея. Библиотеки, содержащие, например, миллионы трансформантов, конструируют с применением для мутагенеза, например, вырожденности NN(G/T) или, альтернативно, (C/A/G)NN.

Полипептиды SPA, конструированные, как описано выше, подвергают способам параллельной и/или повторной селекции для идентификации тех полипептидов SPA, которые оптимизированы для связывания человеческого сывороточного альбумина. Например, после получения библиотеки последовательностей мутированных полипептидов SPA, указанную библиотеку полипептидов представляют на фаге и подвергают нескольким раундам селекции, требующим связывания сывороточного альбумина и/или пролиферации, как описано ниже для селекции dAb, связывающих сывороточный альбумин, из библиотек dAb. Биопаннинг против белка-мишени человеческого сывороточного альбумина используют для достижения значимого обогащения для молекул SPA, связывающих сывороточный альбумин. Селектированные клоны затем экспрессируют в *E.coli* и анализируют посредством SDS-PAGE, спектроскопии кругового дихроизма и исследований связывания с человеческим сывороточным альбумином посредством анализа биоспецифического взаимодействия. Ожидают, что молекулы SPA (аффитела), связывающие человеческий сывороточный альбумин будут иметь вторичную структуру, сходную с нативным доменом Z, и будут иметь микромолярные константы диссоциации (K_d) в отношении их соответствующих мишеней в мкМ-диапазоне или менее (например, нМ или пМ).

Возможно, селекцию проводят против сывороточного альбумина, иммобилизованного на иммунологических пробирках или против биотинилированного сывороточного альбумина в растворе. Возможно, аффинность связывания определяют с применением поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и *Biacore* (Karlsson et al., 1991), с применением системы *Biacore* (Uppsala, Sweden), где для полностью оптимизированных полипептидов, имеющих происхождение от SPA, в идеальном случае достигают значений K_d аффинности связывания с человеческим сывороточным альбумином в нМ-диапазоне или менее.

После идентификации полипептидов SPA, связывающих человеческий сывороточный альбумин, такие полипептиды затем используют для образования композиций лигандов с двойной специфичностью любым из способов, описанных ниже.

Полипептиды аффител стафилококкового белка А (SPA)

Контактирующие с растворителем поверхности бактериальных рецепторов могут быть мишенью для направленного мутагенеза с последующей фенотипической селекцией для придания таким рецепторным молекулам, например, аффинности связывания в отношении сывороточного альбумина. Такие белки могут быть необычно стабильными, что делает их подходящими для различных применений (Alexander et al. (1992), *Biochemistry* 31: 3597-3603). В частности, для бактериальных рецепторов, содержащих спиральные пучковые структуры, можно ожидать, что конформация будет устойчива к изменениям в боковых цепях остатков, не вовлеченных во взаимодействия при укладке спирали.

Примерами таких молекул являются относительно небольшой (58 остатков) IgG-связывающий домен В стафилококкового белка А (SPA) и синтетический аналог домена В, обозначенный как домен Z (Nilsson et al. (1987), *Protein Engineering* 1: 107-113).

Домен Z, имеющий происхождение от SPA, является основным доменом SPA, используемым в качестве каркаса с целью конструирования вариантов доменов с новыми связывающими свойствами (см., например, WO 00/63243 и WO 95/19374, полностью включенные сюда посредством ссылки). Домен Z SPA представляет собой свободный от цистеина трехспиральный пучковый домен из 58 аминокислотных остатков, используемый в качестве каркаса для конструирования комбинаторных фагмидных библиотек, из которых селективируют варианты, направленные на желаемые молекулы (например, человеческий сывороточный альбумин) с применением технологии фагового дисплея (Nilsson et al. 1987 *Protein Eng.* 1: 107-113; Nord et al. (1997), *Nat. Biotechnol.* 15: 772-777; Nord et al. (2000), *J. Biotechnol.* 80: 45-54; Hansson et al. 1999 *Immunotechnology* 4: 237-252; Eklund et al. (2002), *Proteins* 48: 454-462; Ronnmark et al. 2002 *Eur. J. Biochem.* 269: 2647-2655). Такие мишеньсвязывающие варианты, называемые молекулами "аффител", селективируют как связывающие агенты для белков-мишеней посредством фагового дисплея комбинаторных библиотек, в которых обычно 13 боковых цепей на поверхности 1 и 2 спиралей (Q9, Q10, N11, F13, Y14, L17, H18, E24, E25, R27, N28, Q32 и K35) в домене Z были рандомизированы (Lendel et al. (2006), *J. Mol. Biol.* 359: 1293-304). Простая устойчивая структура таких молекул аффител совместно с малой молекулярной массой (7 кДа) делает их подходящими для широкого спектра применений. Доказанная эффективность была продемонстрирована при биоразделениях в масштабах биопроцессов и в лабораторных масштабах (Nord et al. (2000), *J. Biotechnol.* 80: 45-54; Nord et al. (2001), *Eur. J. Biochem.* 268: 4269-4277; Graslund et al. (2002), *J. Biotechnol.* 99: 41-50), и перспективные результаты были получены при оценке аффител-лигандов в качестве реагентов для выявления (Karlstrom and Nygren 2001 *Anal. Biochem.* 295: 22-30; Ronnmark et al. 2002, *J. Immunol. Methods* 261: 199-211), для конструирования аденовирусного тропизма (Henning et al. 2002, *Hum. Gene Ther.* 13: 1427-1439) и для ингибирования рецепторных взаимодействий (Sandstrom et al. 2003, *Protein Eng.* 16: 691-697). Таким образом, конструированные аффител-лиганды, например, связывающие человеческий сывороточный альбумин, являются желательными компонентами определенных композиций с лигандов с двойной специфичностью по настоящему изобретению.

Библиотеки полипептидов, имеющие происхождение от домена Z стафилококкового белка А, могут быть получены любым способом мутагенеза, как известно в данной области техники и/или описано ниже. После создания таких полипептидных библиотек варианты, способные связывать желаемые молекулы-мишени (например, человеческий сывороточный альбумин) можно эффективно селективировать и идентифицировать с применением, например, технологий селекции *in vitro*, таких как фаговый дисплей (Dunn 1996; Smith and Patrenko 1997; Hoogenboom et al. 1998), рибосомальный дисплей (Hanes and Pluckthun 1997; He and Taussig 1997), пептиды на плаزمиде (Schatz 1993) или бактериальный дисплей (Georgiou et al. 1997). Для таких селекции была теоретически обоснована (Perelson and Oster 1979) и экспериментально продемонстрирована (Griffiths et al. 1994; Vaughan et al. 1996; Aujame et al. 1997) корреляция между размером библиотеки (сложностью) и вероятностью выделения связывающих агентов с высокими аффинностями ($KD=10^{-8}$ М или менее).

Аффитела имеют несколько преимуществ перед традиционными антителами, например, (1) меньшую стоимость изготовления; (2) меньший размер; (3) увеличенную стабильность и устойчивость; (4) возможность рекомбинантного получения в бактериальном хозяине или посредством химического синтеза, что устраняет риск вирусной контаминации.

Аффитело представляет собой полипептид, являющийся производным домена стафилококкового белка А (SPA), представляющего собой домен В или Z, где несколько аминокислотных остатков были замещены другими аминокислотными остатками, без существенной потери основной структуры и стабильности указанного домена SPA, что привело к возможности взаимодействия указанного полипептида с по меньшей мере одним доменом антигена-мишени (например, человеческого сывороточного альбумина). Число замещенных аминокислотных остатков может составлять от 1 до приблизительно 30 или от 1 до приблизительно 13. Другие возможные диапазоны включают от 4 до приблизительно 30; от 4 до приблизительно 13; от 5 до приблизительно 20 или от 5 до приблизительно 13 аминокислотных остатков. Специалисту в данной области техники будет ясно, например, из Nord et al. 1997, *Nat. Biotechnol.* 15: 772-777, что преимущественно могут быть замещены аминокислотные остатки, расположенные на поверхности домена Z, в то время как середину пучка необходимо поддерживать неизменной для сохранения структурных свойств молекулы.

Способ изготовления аффитела изложен, например, в WO 00/63243, и в целях настоящего изобретения может включать, например, следующие стадии:

(1) представление, посредством, например, фагового дисплея (см. обзор, например, в Kay, K. et al. (eds.) *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*, Academic Press, San Diego, ISBN 0-12-4023 80-0), рибосомального дисплея (см. обзор, например, в Hanes, J. et al. (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 14130-14135) или клеточного дисплея (см. обзор, например, в Daugherty, P.S. et al. (1998), *Protein Eng.* 11: 825-832), полипептидных вариантов из белковой библиотеки, включающей репертуар

полипептидных вариантов, имеющих происхождение от домена В или Z SPA;

(2) селекцию клонов, экспрессирующих полипептиды, связывающие человеческий сывороточный альбумин; и (3) получение полипептидов рекомбинантной экспрессией селектированных клонов или химическим синтезом.

Авимер

Пример 21. Образование лиганда с двойной специфичностью, содержащего авимер, связывающий сывороточный альбумин, посредством CDR-переноса.

Домены CDR dAb7h14 используют для конструирования полипептида авимера, связывающего человеческий сывороточный альбумин, следующим образом. Последовательности CDR1 (RASQWIGSQLS; SEQ ID NO.:_) , CDR2 (WRSSLQS; SEQ ID NO.:_) и CDR3 (AQGAALPRT; SEQ ID NO.:_) dAb7h14 переносят в мономер C2 (описанный в публикации патента США № 2005/0221384, полностью включенной сюда посредством ссылки) в 17-28, 49-53 и 78-85 остатки, соответственно, составляющими 1, 2 и 3 петлевые области мономера C2 соответственно. Проводят анализ связывания в реальном времени посредством Biacore для оценки специфичного связывания человеческого сывороточного альбумина и иммобилизованного полипептида, имеющего происхождение от мономера C2, содержащего CDR-домены dAb7h14 против человеческого сывороточного альбумина (специалисту в данной области техники будет ясно, что аффинность связывания может быть оценена с применением любого подходящего способа, включая, например, осаждение меченного человеческого сывороточного альбумина, конкурентное исследование Biacore и т.п.). При выявлении низкой аффинности в отношении человеческого сывороточного альбумина (например, значения K_d в мкМ-диапазоне или выше) или ее отсутствия, по меньшей мере одну из нескольких стратегий используют для улучшения свойств связывания человеческого сывороточного альбумина мономера C2 с перенесенными CDR (и/или димеров, тримеров авимеров и других композиций с повторениями более высокого порядка), включая любой из следующих способов, способствующих аффинности связывания.

Длину (длины) CDR-перенесенных областей dAb7h14 исходного полипептида мономера C2 (и/или полипептидов димеров, тримеров авимера и т.п., полученных повторением), соответствующих контактирующим с растворителем петлевым областям в пределах нативного мономера C2 (и/или других нативных мономеров, используемых в композициях авимеров) адаптируют применением линкерных полипептидов. Например, девять аминокислотных остатков последовательности пептида CDR dAb7h14 могут быть увеличены по длине до 13 аминокислотных остатков с применением аминокислотных линкеров, состоящих из, например, от нуля до четырех остатков по длине, расположенных на N- или C-концевых частях полипептидной последовательности CDR3 dAb7h14, достигая посредством этого общей длины перенесенной пептидной последовательности в 13 аминокислот в пределах домена с перенесенной CDR3, соответствующего 3 петли полипептида мономера C2. Такое применение линкерного полипептида (полипептидов), возможно, комбинируют с мутагенезом линкерных последовательностей, последовательностей CDR и/или полипептидных последовательностей мономера C2, не являющихся последовательностями CDR, (например, с применением мутагенных способов оптимизации, как описано ниже) для улучшения способности полипептида (полипептидов) мономера C2 с перенесенными CDR связывать человеческий сывороточный альбумин (например, посредством оптимизации полипептидных последовательностей как CDR, так и мономера C2, в пределах полипептидов мономера C2 с перенесенными CDR). Полипептидные линкеры, используемые с этой целью, либо обладают predetermined последовательностью, либо, возможно, их селектируют из совокупности случайных полипептидных линкерных последовательностей посредством оценки способностей содержащих линкер полипептидов мономера C2 с перенесенными CDR связывать человеческий сывороточный альбумин. Способы оптимизации проводят параллельно и/или повторно. В способах как параллельной, так и повторной оптимизации (например, созревание аффинности) применяют способы селекции, применимые для оптимизации связывающих свойств полипептидов, как описано ниже и/или известно в данной области техники.

Связывание человеческого сывороточного альбумина полипептидом (полипептидами) мономера C2 с перенесенными CDR (и/или димеров, тримеров авимера и т.п., композиций более высокого порядка, полученных повторением, или отдельных входящих в них дополнительных мономеров), представляющих CDR dAb7h14, оптимизируют посредством способов мутагенеза, возможно, в комбинации со способами параллельной и/или повторной селекции, как описано ниже, и/или, в противном случае, как известно в данной области техники. Для типичного полипептида с каркасом мономера C2 домены, окружающие перенесенные последовательности CDR dAb7h14, подвергают случайному и/или NNK-мутагенезу, проводимому, как описано ниже. Такой мутагенез, возможно, проводят в отношении выбранных аминокислотных остатков в пределах полипептидной последовательности мономера C2, как изложено, например, в публикации патента США № 2005/0221384, или, возможно, проводят в отношении всех аминокислотных остатков, не входящих в CDR, и, возможно, рандомизируют для разработки новых или улучшенных полипептидов, связывающих человеческий сывороточный альбумин. Возможно, полипептидные домены CDR dAb7h14, представленные в полипептиде мономера C2 с перенесенными CDR, подвергают мутагенезу

посредством, например, случайного мутагенеза, NNK-мутагенеза, "look through" мутагенеза и/или другого принятого в данной области техники способа. Возможно, для проведения таких способов мутагенеза используют ПЦР, что приводит к формированию разнообразия последовательностей в целевых последовательностях в полипептидах мономера С2 с перенесенными CDR. Такие способы сходны с описанными ниже для образования библиотек dAb. В дополнение к случайным и/или "look through" способам мутагенеза используют направленный мутагенез целевых аминокислотных остатков, где по структурной информации установлено, что определенные аминокислотные остатки имеют критическое значение для связывания человеческого сывороточного альбумина.

Полипептиды мономера С2 (и/или композиции авимеров, полученные повторением, содержащие отдельные мономеры), содержащие перенесенные последовательности CDR dAb7h14, конструированные, как описано выше, подвергают способам параллельной и/или повторной селекции для идентификации тех полипептидов мономеров С2 (и композиций авимеров), которые оптимизированы для связывания человеческого сывороточного альбумина. Например, после получения библиотеки последовательностей полипептидов мономера С2 с перенесенными CDR dAb7h14, эту библиотеку таких полипептидов представляют на фаге и подвергают нескольким раундам селекции, требующим связывания сывороточного альбумина и/или пролиферации, как описано ниже для селекции dAb, связывающих сывороточный альбумин, из библиотек dAb. Возможно, селекцию проводят против сывороточного альбумина, иммобилизованного на иммунологических пробирках или против биотинилированного сывороточного альбумина в растворе. Возможно, аффинность связывания определяют с применением поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и Biacore (Karlsson et al., 1991), с применением системы Biacore (Uppsala, Sweden), где для полностью оптимизированных авимеров, содержащих мономеры, имеющие происхождение от С2, в идеальном случае достигают значений K_d аффинности связывания с человеческим сывороточным альбумином в нМ-диапазоне или менее.

После идентификации полипептидов, имеющих происхождение от мономера С2, связывающих человеческий сывороточный альбумин, свойства связывания человеческого альбумина таких исходных мономеров могут быть дополнительно усилены посредством комбинирования таких мономеров с другими мономерами, с последующим дополнительным мутагенезом и/или селекцией, с образованием посредством этого композиции авимера, обладающей специфичной аффинностью в отношении человеческого сывороточного альбумина. После идентификации композиции авимера, обладающей аффинностью в отношении человеческого сывороточного альбумина, такие полипептиды авимеров затем используют для образования композиций лигандов с двойной специфичностью любым из способов, описанных ниже.

Пример 22. Образование лиганда с двойной специфичностью, содержащего неиммуноглобулиновый каркас авимера, связывающего сывороточный альбумин, посредством селекции группировок, связывающих сывороточный альбумин.

Описанный полипептид нативного мономера С2 подвергают методикам селекции в библиотеке и, возможно, созревания аффинности, затем комбинируют с дополнительным мономером (например, фибронектиновым мономером, для которого, возможно, параллельно может быть оптимизирована аффинность в отношении человеческого сывороточного альбумина) и, возможно, повторно подвергают методикам селекции в библиотеке и, возможно, созревания аффинности для получения молекулы с неиммуноглобулиновым каркасом авимера, связывающей человеческий сывороточный альбумин, для использования в лигандах с двойной специфичностью по изобретению.

Проводят анализ связывания в реальном времени посредством Biacore для оценки специфичного связывания человеческого сывороточного альбумина и иммобилизованного полипептида мономера С2 (и/или молекулы авимера, полученной повторением). После выявления низкой аффинности полипептида мономера С2 в отношении человеческого сывороточного альбумина (например, значения K_d в мкМ-диапазоне или выше) или ее отсутствия, по меньшей мере одну из нескольких стратегий используют для придания свойств связывания человеческого сывороточного альбумина полипептиду мономера С2, включая один или более из следующих способов, способствующих аффинности связывания.

Связывание человеческого сывороточного альбумина полипептидом (полипептидами) мономера С2 (и/или димером, тримером авимера и т.п. молекулами, полученными повторением) оптимизируют посредством способов мутагенеза, возможно, в комбинации со способами параллельной и/или повторной селекции, как описано ниже, и/или, в противном случае, как известно в данной области техники. Домены полипептида мономера С2 подвергают случайному и/или NNK-мутагенезу, проводимому, как описано ниже. Такой мутагенез проводят в отношении всего полипептида мономера С2 или в отношении определенных последовательностей в пределах полипептида мономера С2, в отношении выбранных аминокислотных остатков, как изложено, например, в публикации патента США № 2005/0221384, и, возможно, рандомизируют для разработки новых или улучшенных полипептидов, связывающих человеческий сывороточный альбумин. Возможно, для проведения таких способов мутагенеза используют ПЦР, что приводит к формированию разнообразия последовательностей в целевых последовательностях в полипептидах мономера С2 и/или молекулах авимеров. (Такие способы сходны с описанными ниже для образования библиотек dAb.) В дополнение к случайным способам мутагенеза

используют направленный мутагенез целевых аминокислотных остатков, где по структурной информации установлено, что определенные аминокислотные остатки мономера С2 имеют критическое значение для связывания человеческого сывороточного альбумина.

Полипептиды мономера С2, конструированные, как описано выше, подвергают способам параллельной и/или повторной селекции для идентификации тех полипептидов мономера С2 и/или молекул авимеров, которые оптимизированы для связывания человеческого сывороточного альбумина. Например, после получения библиотеки мутированных последовательностей полипептидов мономера С2, указанную библиотеку полипептидов представляют на фаге и подвергают нескольким раундам селекции, требующим связывания сывороточного альбумина и/или пролиферации, как описано ниже для селекции dAb, связывающих сывороточный альбумин, из библиотек dAb. Возможно, раунды селекции могут включать повторения, при которых добавляют дополнительные мономерные субъединицы для образования новой молекулы авимера. Возможно, селекцию проводят против сывороточного альбумина, иммобилизованного на иммунологических пробирках или против биотинилированного сывороточного альбумина в растворе. Возможно, аффинность связывания определяют с применением поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и Biacore (Karlsson et al., 1991), с применением системы Biacore (Uppsala, Sweden), где для полностью оптимизированных авимеров, содержащих полипептиды мономеров, имеющих происхождение от С2, в идеальном случае достигают значений K_d аффинности связывания с человеческим сывороточным альбумином в нМ-диапазоне или менее.

После идентификации полипептидов, имеющих происхождение от мономера С2, связывающих человеческий сывороточный альбумин, свойства связывания человеческой сыворотки таких исходных мономеров могут быть дополнительно усилены посредством комбинирования таких мономеров с другими мономерами, с последующим дополнительным мутагенезом и/или селекцией, с образованием посредством этого композиции авимера, обладающей специфичной аффинностью в отношении человеческого сывороточного альбумина. После идентификации композиции авимера, обладающей аффинностью в отношении человеческого сывороточного альбумина, такие полипептиды авимеров затем используют для образования композиций лигандов с двойной специфичностью любым из способов, описанных ниже.

Получение и применение полипептидов авимеров

Авимеры получают из большого семейства человеческих внеклеточных рецепторных доменов *in vitro* перетасовкой экзонов и фаговым дисплеем, образуя многодоменные белки со связывающими и/или ингибирующими свойствами. Связывание нескольких независимых связывающих доменов (селектированных, например, повторно для связывания белка-мишени, например, человеческого сывороточного альбумина) создает avidность и приводит к улучшенной аффинности и специфичности по сравнению с обычными белками, связывающими один эпитоп. Другие возможные преимущества включают простоту и эффективность получения молекул, специфичных в отношении нескольких мишеней, в *E.coli*, улучшенную термостабильность и устойчивость к протеазам. Возможно получение авимеров, обладающих субнаномолярными аффинностями против белка-мишени. Например, был получен авимер, ингибирующий интерлейкин-6 с IC_{50} 0,8 пМ в исследованиях, основанных на клетках, и он был охарактеризован как биологически активный (Silverman et al. 2005 Nature Biotechnology 23: 1556-1561; также см., например, публикации патентов США № 2005/0221384, 2005/0164301, 2005/0053973 и 2005/0089932, 2005/0048512, и 2004/0175756, каждая из которых полностью включена сюда посредством ссылки).

Синтез авимеров включает фаговый дисплей библиотек, имеющих происхождение от человеческого репертуара доменов А. Синтетическую рекомбинацию используют для создания пула мономеров с большим разнообразием, как описано в Silverman et al. (2005 Nature Biotechnology 23: 1556-1561). После образования пула мономеров, пул подвергают скринингу против белка-мишени (например, человеческого сывороточного альбумина). Устанавливают исходных кандидатов и присоединяют дополнительный мономер, и получаемую библиотеку димеров подвергают скринингу против белка-мишени для установления димеров-кандидатов, связывающих мишень. Способ затем повторяют для получения тримера с очень высокой аффинностью связывания в отношении белка-мишени, и, возможно, его можно дополнительно повторять для установления комплексов-кандидатов более высокого порядка. Комплексы-кандидаты, которые, как установлено, связывают белки-мишени с высокой аффинностью и специфичностью, называют авимерами (как "авидные мультимеры").

Мономерные домены авимеров могут представлять собой полипептидные цепи любого размера. Например, мономерные домены могут иметь от приблизительно 25 до приблизительно 500, от приблизительно 30 до приблизительно 200, от приблизительно 30 до приблизительно 100, от приблизительно 90 до приблизительно 200, от приблизительно 30 до приблизительно 250, от приблизительно 30 до приблизительно 60, от приблизительно 9 до приблизительно 150, от приблизительно 100 до приблизительно 150, от приблизительно 25 до приблизительно 50 или от приблизительно 30 до приблизительно 150 аминокислот. Сходным образом, мономерный домен авимера может содержать, например, от приблизительно 30 до приблизительно 200 аминокислот; от приблизительно 25 до приблизительно 180 аминокислот; от приблизительно 40 до приблизительно 150

аминокислот; от приблизительно 50 до приблизительно 130 аминокислот; или от приблизительно 75 до приблизительно 125 аминокислот. Мономерные домены и иммунные домены могут обычно сохранять стабильную конформацию в растворе. Иногда мономерные домены авимеров и иммунные домены могут независимо принимать стабильную конформацию. Стабильную конформацию могут стабилизировать ионы металлов. Стабильная конформация может, возможно, включать дисульфидные связи (например, по меньшей мере одну, две или три, или более дисульфидных связей). Дисульфидные связи могут, возможно, быть образованы между двумя цистеиновыми остатками.

Публикации, в которых описаны мономерные домены и белки-мозаики, и ссылки, приведенные там, включают следующее: Hegyi, H. and Bork, P. 1997 *J. Protein Chem.*, 16: 545-551; Baron et al. 1991 *Trends Biochem. Sci.* 16: 13-17; Ponting et al. 2000 *Adv. Protein Chem.* 54: 185-244; Doolittle 1995 *Annu. Rev. Biochem.* 64: 287-314; Doolittle and Bork 1993 *Scientific American* 269: 50-6; and Bork 1991 *FEBS letters* 286: 47-54. Мономерные домены, используемые в авимерах, могут также включать домены, обнаруживаемые в базе данных Pfam и базе данных SMART. См. Schultz et al. 2000 *Nucleic Acid Res.* 28: 231-34.

Мономерные домены, особенно подходящие для применения в композициях авимеров, представляют собой: (1) домены с β -сэндвичем; (2) домены с β -бочонком; или (3) домены, богатые цистеином, содержащие дисульфидные связи. Домены, богатые цистеином, используемые в авимерах, обычно не образуют α -спиральных, β -складчатых структур или структур в виде β -бочонка. Обычно дисульфидные связи стимулируют фолдинг домена с образованием тримерной структуры. Обычно домены, богатые цистеином, имеют по меньшей мере две дисульфидные связи, более типично, по меньшей мере три дисульфидные связи.

Мономерные домены авимеров могут иметь любое число характеристик. Например, домены могут не иметь иммуногенности у животного (например, человека) или иметь низкую иммуногенность. Домены могут иметь небольшой размер, например, домены могут быть достаточно малыми для проникновения через кожу или другие ткани. Домены могут обладать несколькими периодами полувыведения *in vivo* или стабильностями.

Типичные мономерные домены, подходящие для использования в авимерных композициях, включают, например, EGF-подобный домен, Kringle-подобный домен, фибронектиновый домен I типа, фибронектиновый домен II типа, фибронектиновый домен III типа, домен PAN, домен Gla, домен SRCR, домен Kunitz/домен, ингибирующий бычий панкреатический трипсин, домен типа Kazal, ингибирующий сериновые протеазы, домен Trefoil (P-типа), домен фактора фон Виллебранда типа C, анафилотоксиноподобный домен, домен CUB, тироглобулиновый повтор I типа, домен рецептора LDL класса A, домен Sushi, домен Link, тромбоспондиновый домен I типа, мономерный домен тироглобулина, иммуноглобулиноподобный домен, домен лектина C-типа, домен MAM, домен фактора фон Виллебранда типа A, домен соматомедина B, центральный домен WAP-типа с четырьмя дисульфидными связями, домен F5/8 типа C, гемопексиновый домен, домен SH2, домен SH3, EGF-подобный домен ламининового типа, домен C2 и другие подобные домены, известные специалистам в данной области техники, а также их производные и/или варианты. В публикации патента США № 20050221384 представлены схематические диаграммы различных типичных форм мономерных доменов, обнаруженных в молекулах семейства рецептора LDL.

Подходящие мономерные домены (например, домены, способные к независимому фолдингу или фолдингу при некотором ограниченном содействии) могут быть селективны из семейств белковых доменов, содержащих трехмерные структуры в виде β -сэндвича или β -бочонка, как определено такими компьютеризированными средствами анализа последовательностей, как Simple Modular Architecture Research Tool (SMART; см. Shultz et al. 2000 *Nucleic Acids Research* 28: 231-234) или CATH (см. Pearl et al. 2000 *Nucleic Acids Research* 28: 277-282). Типичные мономерные домены авимеров также включают фибронектиновые домены III типа, антикаллиновые домены и Ig-подобные домены из CTLA-4. Некоторые аспекты этих доменов описаны в WO 01/64942 Lipovsek et al., WO 99/16873 Beste et al. и WO 00/60070 Desmet et al., содержание которых полностью включено сюда посредством ссылки.

Мономерные домены авимеров, возможно, богаты цистеином. Подходящие богатые цистеином мономерные домены включают, например, домен рецептора LDL класса A ("A-домен") или EGF-подобный домен. Мономерные домены могут также иметь группу отрицательно заряженных остатков. Возможно, мономерные домены содержат повторяющуюся последовательность, такую как YWTD, обнаруженная в β -пропеллерном домене. Другим типичным мономерным доменом, подходящим для использования в авимерах, является домен C2. Типичные последовательности домена A и домена C2 и консенсусные последовательности, применимые в получении авимеров, включая типичные выборки аминокислотных остатков (например, остатков расположенных на поверхности петель), наиболее желательные для направленного мутагенеза, представлены в публикации патента США № 2005/0221384.

Полинуклеотиды (также называемые нуклеиновыми кислотами), кодирующие мономерные домены, обычно используют для изготовления мономерных доменов посредством экспрессии. Нуклеиновые кислоты, кодирующие мономерные домены, могут иметь происхождение из множества различных

источников. Библиотеки мономерных доменов могут быть получены экспрессией множества различных нуклеиновых кислот, кодирующих встречающиеся в природе мономерные домены, измененные мономерные домены (например, варианты мономерных доменов) или их комбинации.

Определяют мономерные домены, связывающие выбранный или желаемый лиганд (например, человеческий сывороточный альбумин) или смесь лигандов, возможно, в качестве начальной стадии получения авимеров. В некоторых воплощениях мономерные домены и/или иммунные домены идентифицируют или селективируют на желаемое свойство (например, аффинность связывания в отношении человеческого сывороточного альбумина) и затем из мономерных доменов и/или иммунных доменов образуют мультимеры. Для этих воплощений может быть применен любой способ, приводящий к селекции доменов с желаемым свойством (например, связыванием человеческого сывороточного альбумина). Например, способы могут включать представление множества различных нуклеиновых кислот, каждая из которых кодирует мономерный домен; трансляцию множества различных нуклеиновых кислот, представляя посредством этого множество различных мономерных доменов; скрининг множества различных мономерных доменов на связывание желаемого лиганда или смеси лигандов; и идентификацию членов множества различных мономерных доменов, связывающих желаемый лиганд или смесь лигандов.

Мономерные домены для получения авимеров могут быть встречающимися в природе или модифицированными (искусственными вариантами). Термин "встречающийся в природе" использован здесь для обозначения того, что объект может быть обнаружен в природе. Например, природные мономерные домены могут включать человеческие мономерные домены или, возможно, домены, имеющие происхождение от разных видов или источников, например, млекопитающих, приматов, грызунов, рыб, птиц, рептилий, растений и т.п. Встречающиеся в природе мономерные домены могут быть получены несколькими способами, например, ПЦР-амплификацией геномной ДНК или кДНК. При использовании здесь термин "нативный" использован в отношении нуклеиновой кислоты и/или полипептида, который не был модифицирован посредством мутагенеза или, в противном случае, посредством проведения любого из способов, описанных ниже.

Мономерные домены авимеров могут представлять собой встречающиеся в природе домены или не встречающиеся в природе варианты. Библиотеки мономерных доменов, используемые в синтезе авимеров, могут содержать встречающийся в природе мономерный домен, не встречающийся в природе варианты мономерного домена или их комбинацию.

Множество описанных дисплейных векторов или систем могут быть использованы для экспрессии нуклеиновых кислот, кодирующих мономерные домены и авимеры, и для исследования на желаемую активность (например, связывание человеческого сывороточного альбумина). Например, система фагового дисплея представляет собой систему, в которой мономерные домены экспрессируют в виде слитых белков на поверхности фага (*Pharmacia, Milwaukee Wis.*). Фаговый дисплей может включать представление полипептидной последовательности, кодирующей мономерные домены и/или иммунные домены, на поверхности нитчатого бактериофага, обычно в виде слитых белков с белком оболочки бактериофага. Типичные способы увеличения аффинности и фаговый дисплей изложены, например, в патентных публикациях РСТ № 91/17271, 91/18980, 91/19818 и 93/08278, полностью включенных сюда посредством ссылки.

Примеры других дисплейных систем включают рибосомальные дисплеи, нуклеотид-связанный дисплей (см., например, патенты США № 6281344; 6194550, 6207446, 6214553 и 6258558), дисплеи на поверхности клеток и т.п. Дисплеи на поверхности клеток включают множество клеток, например, клетки *E.coli*, дрожжей и/или млекопитающих. При использовании клетки в качестве дисплея нуклеиновые кислоты, например, полученные ПЦР-амплификацией после расщепления, вводят в клетку и транслируют. Возможно, в клетку могут быть введены, например, инъекцией, полипептиды, кодирующие мономерные домены или авимеры.

Как описано ниже и в данной области техники, авимеры представляют собой мультимерные структуры. В типичных воплощениях мультимеры содержат по меньшей мере два мономерных домена и/или иммунных домена. Например, мультимеры по изобретению могут содержать от 2 до приблизительно 10 мономерных доменов и/или иммунных доменов, от 2 до приблизительно 8 мономерных доменов и/или иммунных доменов, от 3 до приблизительно 10 мономерных доменов и/или иммунных доменов, приблизительно 7 мономерных доменов и/или иммунных доменов, приблизительно 6 мономерных доменов и/или иммунных доменов, приблизительно 5 мономерных доменов и/или иммунных доменов или приблизительно 4 мономерных домена и/или иммунных домена. В некоторых воплощениях мультимер содержит по меньшей мере 3 мономерных домена и/или иммунных домена. Обычно мономерные домены были предварительно селективированы для связывания интересующей молекулы-мишени (например, человеческого сывороточного альбумина).

В авимере каждый мономерный домен может специфично связывать одну молекулу-мишень (например, человеческий сывороточный альбумин). Возможно, каждый мономер связывает различные положения (аналогичные эпитопу) на молекуле-мишени. Несколько мономерных доменов и/или иммунных доменов, связывающих одну и ту же молекулу-мишень, могут приводить к эффекту

авидности, приводящему к улучшенной авидности мультимерного авимера по отношению к молекуле-мишени по сравнению с каждым отдельным мономером. Возможно, мультимер может обладать авидностью, по меньшей мере в 1,5, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50 или 100 раз превышающей авидность мономерного домена самого по себе в отношении белка-мишени (например, человеческого сывороточного альбумина).

Выбранные мономерные домены могут быть соединены линкером с образованием мультимера (авимера). Например, в мультимере между каждым отдельным отличным мономерным доменом расположен линкер. Обычно иммунные домены также связаны друг с другом или с мономерными доменами посредством линкерной группировки. Линкерные группировки, которые без труда могут быть использованы для связывания вариантов иммунных доменов, являются такими же, как описанные для мультимеров вариантов мономерных доменов. Здесь описаны типичные линкерные группировки, подходящие для связывания вариантов иммунных доменов с другими доменами с образованием мультимеров.

Связывание выбранных мономерных доменов посредством линкера с образованием авимера может быть осуществлено с применением множества методик, известных в данной области техники. Например, комбинационное объединение полинуклеотидов, кодирующих выбранные мономерные домены, может быть достигнуто лигированием ДНК, или, возможно, основанными на ПЦР самозапускающимися реакциями перекрывания. Линкер может быть присоединен к мономеру до установления способности мономера связывать мультимер-мишень или после селекции мономера на способность связывать мультимер-мишень.

Как упомянуто выше, полипептид (полипептиды), содержащий авимеры, может быть модифицирован. Описания множества способов внесения разнообразия для образования модифицированных или измененных последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих эти полипептиды, изложены выше и далее в следующих публикациях и приведенных там ссылках:

- Soong, N. et al., Molecular breeding of viruses, (2000) *Nat Genet* 25(4):436-439;
- Stemmer, et al., Molecular breeding of viruses for targeting and other clinical properties, (1999) *Tumor Targeting* 4:1-4; Ness et al., DNA Shuffling of subgenomic sequences of subtilisin, (1999) *Nature Biotechnology* 17:893-896; Chang et al., Evolution of a cytokine using DNA family shuffling, (1999) *Nature Biotechnology* 17:793-797; Minshull and Stemmer, Protein evolution by molecular breeding, (1999) *Current Opinion in Chemical Biology* 3:284-290; Christians et al., Directed evolution of thymidine kinase for AZT phosphorylation using DNA family shuffling, (1999) *Nature Biotechnology* 17:259-264; Cramer et al., DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution, (1998) *Nature* 391:288-291; Cramer et al., Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling, (1997) *Nature Biotechnology* 15:436-438; Zhang et al., Directed evolution of an effective fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Patten et al., Applications of DNA Shuffling to Pharmaceuticals and Vaccines, (1997) *Current Opinion in Biotechnology* 8:724-733; Cramer et al., Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling, (1996) *Nature Medicine* 2:100-103; Cramer et al., Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling, (1996) *Nature Biotechnology* 14:315-319; Gates et al., Affinity selective isolation of ligands from peptide libraries through display on a lac repressor 'headpiece dimer', (1996) *Journal of Molecular Biology* 255:373-386; Stemmer, Sexual PCR and Assembly PCR, (1996) In: *The Encyclopedia of Molecular Biology*. VCH Publishers, New York. pp.

447-457; Cramer and Stemmer, Combinatorial multiple cassette mutagenesis creates all the permutations of mutant and wildtype cassettes, (1995) *BioTechniques* 18:194-195; Stemmer et al., Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxy-ribonucleotides, (1995) *Gene*, 164:49-53; Stemmer, The Evolution of Molecular Computation, (1995) *Science* 270:1510; Stemmer, Searching Sequence Space, (1995) *Bio/Technology* 13:549-553; Stemmer, Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling, (1994) *Nature* 370:389-391; and Stemmer, DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution, (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751.

Мутационные способы внесения разнообразия включают, например, сайт-направленный мутагенез (Ling et al., Approaches to DNA mutagenesis: an overview, (1997) *Anal Biochem.* 254(2): 157-178; Dale et al., Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method, (1996) *Methods Mol. Biol.* 57:369-374; Smith, In vitro mutagenesis, (1985) *Ann. Rev. Genet.* 19:423-462; Botstein & Shortle, Strategies and applications of in vitro mutagenesis, (1985) *Science* 229:1193-1201; Carter, Site-directed mutagenesis, (1986) *Biochem. J.* 237:1-7; and Kunkel, The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis, (1987) in *Nucleic Acids & Molecular Biology* (Eckstein, F. and Lilley, D. M. J. eds., Springer Verlag, Berlin)); мутагенез с применением урацил-содержащих матриц (Kunkel, Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel et al., Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, (1987) *Methods in Enzymol.* 154, 367-382; and Bass et al., Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities, (1988) *Science* 242:240-245); олигонуклеотид-направленный мутагенез ((1983) *Methods in Enzymol.* 100: 468-500; (1987) *Methods in Enzymol.* 154: 329-350; Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment, (1982) *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6500; Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors, (1983) *Methods in Enzymol.* 100:468-500; and Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template, (1987) *Methods in Enzymol.* 154:329-350); мутагенез ДНК, модифицированной фосфоротиоатом (Taylor et al., The use of phosphorothioate-

modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA, (1985) *Nucl. Acids Res.* 13: 8749-8764; Taylor et al., The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA, (1985) *Nucl. Acids Res.* 13: 8765-8787; Nakamaye & Eckstein, Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis, (1986) *Nucl. Acids Res.* 14: 9679-9698; Sayers et al., Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, (1988) *Nucl. Acids Res.* 16:791-802; and Sayers et al., Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide, (1988) *Nucl. Acids Res.* 16: 803-814); мутагенез с применением двойной спирали ДНК с разрывами (Kramer et al., The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction, (1984) *Nucl. Acids Res.* 12: 9441-9456; Kramer & Fritz Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA, (1987) *Methods in Enzymol.* 154:350-367; Kramer et al., Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations, (1988) *Nucl. Acids Res.* 16: 7207; and Fritz et al., Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro, (1988) *Nucl. Acids Res.* 16: 6987-6999).

Дополнительные подходящие способы включают точечную репарацию ошибочно спаренных оснований (Kramer et al., Point Mismatch Repair, (1984) *Cell* 38:879-887), мутагенез с применением штаммов-хозяев, дефектных по репарации (Carter et al., Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors, (1985) *Nucl. Acids Res.* 13: 4431-4443; and Carter, Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors, (1987) *Methods in Enzymol.* 154: 382-403), делеционный мутагенез (Eghtedarzadeh & Henikoff, Use of oligonucleotides to generate large deletions, (1986) *Nucl. Acids Res.* 14: 5115), рестрикционную селекцию и рестрикционную очистку (Wells et al., Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin, (1986) *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 317: 415-423), мутагенез посредством синтеза всего гена (Nambiar et al., Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein, (1984) *Science* 223: 1299-1301; Sakamar and Khorana, Total synthesis and expression of a gene for the α -subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin), (1988) *Nucl. Acids Res.* 14: 6361-6372; Wells et al., Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites, (1985) *Gene* 34:315-323; and Grundstrom et al., Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale `shot-gun` gene synthesis, (1985) *Nucl. Acids Res.* 13: 3305-3316), репарацию двуцепочечных разрывов (Mandecki, Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of *Escherichia coli*: a method for site-specific mutagenesis, (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:7177-7181; and Arnold, Protein engineering for unusual environments, (1993) *Current Opinion in Biotechnology* 4:450-455).

Дополнительные подробности о многих из указанных выше способов могут быть обнаружены в *Methods in Enzymology* Vol. 154, где также описаны применимые контроли для выявления и устранения неполадок с различными способами мутагенеза.

Дополнительные подробности, касающиеся различных способов внесения разнообразия, могут быть обнаружены в следующих патентах США, публикациях и заявках РСТ и публикациях ЕРО:

патенте США № 5605793, принадлежащем Stemmer (Feb. 25, 1997), "Methods for In Vitro Recombination"; патенте США № 5811238, принадлежащем Stemmer et al. (Sep. 22, 1998) "Methods for Generating Polynucleotides having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination"; патенте США № 5830721, принадлежащем Stemmer et al. (Nov. 3, 1998), "DNA Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly"; патенте США №5834252, принадлежащем Stemmer, et al. (Nov. 10, 1998) "End-Complementary Polymerase Reaction;" патенте США №5837458, принадлежащем Minshull, et al. (Nov. 17, 1998), "Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering"; WO 95/22625, Stemmer and Cramer, "Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly"; WO 96/33207, поданной Stemmer and Lipschutz "End Complementary Polymerase Chain Reaction"; WO 97/20078, поданной Stemmer and Cramer "Methods for Generating Polynucleotides having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination"; WO 97/35966, поданной Minshull and Stemmer, "Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering"; WO 99/41402, поданной Punnonen et al. "Targeting of Genetic Vaccine Vectors"; WO 99/41383, поданной Punnonen et al. "Antigen Library Immunization"; WO 99/41369, поданной Punnonen et al. "Genetic Vaccine Vector Engineering"; WO 99/41368, поданной Punnonen et al. "Optimization of Immunomodulatory Properties of Genetic Vaccines"; EP 752008, поданной Stemmer and Cramer, "DNA Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly"; EP 0932670, поданной Stemmer "Evolving Cellular DNA Uptake, Recursive Sequence Recombination"; WO 99/23107 поданной, Stemmer et al., "Modification of Virus Tropism and Host Range by Viral Genome Shuffling"; WO 99/21979, Apt et al., "Human Papillomavirus Vectors"; WO 98/31837, поданной del Cardayre et al. "Evolution of Whole Cells and Organisms by Recursive Sequence Recombination"; WO 98/27230, поданной Patten and Stemmer, "Methods and Compositions for Polypeptide Engineering"; WO 98/27230, поданной Stemmer et al., "Methods for Optimization of Gene Therapy by Recursive Sequence Shuffling and Selection," WO 00/00632, "Methods for Generating Highly Diverse Libraries," WO 00/09679, "Methods for Obtaining in Vitro Recombined Polynucleotide Sequence Banks and Resulting Sequences"; WO 98/42832, поданной Arnold et al., "Recombination of Polynucleotide Sequences Using Random or Defined Primers"; WO 99/29902, поданной Arnold et al., "Method for Creating Polynucleotide and Polypeptide Sequences," WO 98/41653, поданной Vind, "An in Vitro Method for Construction of a DNA Library"; WO 98/41622, поданной Borchert et al., "Method for Constructing a Library Using DNA Shuffling"; и WO 98/42727, поданной Pati and Zaring, "Sequence Alterations using Homologous Recombination"; WO 00/18906, поданной Patten et al., "Shuffling of Codon-Altered Genes"; WO 00/04190, поданной del Cardayre et al. "Evolution of Whole Cells and Organisms by Recursive Recombination"; WO 00/42561, поданной Cramer et al., "Oligonucleotide Mediated Nucleic Acid Recombination"; WO 00/42559, поданной Selifonov and Stemmer "Methods of Populating Data Structures for Use in Evolutionary Simulations"; WO 00/42560, поданной Selifonov et al., "Methods for Making Character Strings, Polynucleotides & Polypeptides Having Desired Characteristics"; WO 01/23401, поданной Welch et al., "Use of Codon-Varied Oligonucleotide Synthesis for Synthetic Shuffling"; и PCT/US01/06775, "Single-Stranded Nucleic Acid Template-Mediated Recombination and Nucleic Acid Fragment Isolation", поданной Affholter.

Полипептиды (например, авимеры), используемые в настоящем изобретении, возможно, экспрессируют в клетках. Домены мультимера могут быть синтезированы в виде одного белка с применением систем экспрессии, хорошо известных в данной области техники. В дополнение ко многим руководствам, упомянутым выше, общие руководства, в которых описаны молекулярно-биологические методики, применимые здесь, включая применение векторов, промоторов и многие другие темы, относящиеся к экспрессии нуклеиновых кислот, таких как мономерные домены, селектированные мономерные домены, мультимеры и/или селектированные мультимеры, включают Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, Calif. (Berger); Sambrook et al., Molecular Cloning-A Laboratory Manual (2nd Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 ("Sambrook") и Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (supplemented through 1999) ("Ausubel"). Примеры методик, достаточных для проведения специалистами в данной области техники способов амплификации *in vitro*, применимые в идентификации, выделении и клонировании нуклеиновых кислот, кодирующих мономерные домены и мультимеры, включая полимеразную цепную реакцию (ПЦР), лигазную цепную реакцию (LCR), амплификацию с Q-репликазой и другие методики с использованием РНК-полимеразы (например, амплификацию, основанную на последовательности нуклеиновых кислот (NASBA)), приведены в Berger, Sambrook и Ausubel, а также Mullis et al. (1987), патент США № 4683202; PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis et al. eds) Academic Press Inc. San Diego, Calif. (1990), (Innis); Arnheim & Levinson (Oct. 1, 1990) C&EN 36-47; The Journal Of NIH Research (1991), 3, 81-94; (Kwoh et al. (1989), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1173; Guatelli et al. (1990), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1874; Lomell et al. (1989), J. Clin. Chem 35, 1826; Landegren et al. (1988), Science 241, 1077-1080; Van Brunt (1990), Biotechnology 8, 291-294; Wu and Wallace (1989), Gene 4, 560; Barringer et al. (1990), Gene 89, 117, and Sooknanan and Malek (1995), Biotechnology 13: 563-564. Усовершенствованные способы клонирования *in vitro* амплифицированных нуклеиновых кислот описаны в Wallace et al., патент США № 5426039. Краткое изложение усовершенствованных способов амплификации больших нуклеиновых кислот посредством ПЦР, где могут быть получены ПЦР-ампликоны размером до 40 тысяч пар оснований (bp), приведено в Cheng et al. (1994), Nature 369: 684-685 и представленных там ссылках. Специалисту в данной области техники будет ясно, что, по существу, любая РНК может быть превращена в двуцепочечную ДНК, подходящую для расщепления рестриктазами, ПЦР-амплификации и секвенирования, с применением обратной транскриптазы и полимеразы.

Векторы, кодирующие, например, мономерные домены и/или авимеры, могут быть введены в клетки-хозяева, полученные и/или селектированные рекомбинантными методиками. Клетки-хозяева обычно конструируют (т.е. трансдуцируют, трансформируют или трансфицируют) такими векторами, которые могут представлять, собой, например, вектор клонирования или вектор экспрессии. Вектор может быть, например, в форме плазмиды, вирусной частицы, фага и т.п. Конструированные клетки-хозяева можно культивировать в обычной питательной среде, модифицированной, по необходимости, для активации промоторов, селекции трансформантов или амплификации интересующего гена (генов) мономерных доменов, селектированных мономерных доменов, мультимеров и/или селектированных мультимеров. Условия культивирования, такие как температура, рН и т.п., представляют собой условия, использованные ранее с клеткой-хозяином, выбранной для экспрессии, и будут очевидны специалистам в данной области техники и в приведенных здесь ссылках, включая, например, Freshney (1994), Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, third edition, Wiley-Liss, New York и приведенные там ссылки.

Полипептиды по изобретению могут также быть получены в клетках, не являющихся клетками животных, таких как клетки растений, дрожжей, грибов, бактерий и т.п. Действительно, как указано здесь, фаговый дисплей является особенно подходящей методикой получения таких полипептидов. В дополнение к Sambrook, Berger и Ausubel, подробности, относящиеся к культурам клеток, могут быть обнаружены в Payne et al. (1992), Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems John Wiley & Sons, Inc. New York, N.Y.; Gamburg and Phillips (eds) (1995), Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York), и Atlas and Parks (eds) The Handbook of Microbiological Media (1993), CRC Press, Boca Raton, Fla.

Авимеры могут также обладать модификациями мономерных доменов, иммунных доменов и/или мультимеров, улучшающими фармакологические свойства, снижающими иммуногенность или усиливающими транспорт мультимера и/или мономерного домена в клетку или ткань (например, через гематоэнцефалический барьер или через кожу). Эти типы модификаций включают множество модификаций (например, присоединение углеводных групп или гликозилирование), присоединение ПЭГ, присоединение белковых доменов, связывающих определенный белок (например, HSA или другой сывороточный белок), присоединение белков, фрагментов или последовательностей, являющихся сигналами для перемещения или транспорта в, из и через клетку. Дополнительные компоненты могут также быть присоединены к мультимеру и/или мономерному домену для воздействия на свойства мультимера и/или мономерного домена. Также может быть добавлено множество компонентов, включая, например, домен, связывающий известный рецептор (например, белковый домен Fc-области,

связывающий Fc-рецептор), токсин (токсины) или часть токсина, продомен, который может, возможно, быть расщеплен для активации мультимера или мономерного домена, репортерную молекулу (например, зеленый флюоресцентный белок), компонент, связывающий репортерную молекулу (как, например, радионуклид для лучевой терапии, биотин или авидин) или комбинацию модификаций.

При использовании здесь термин "направленная эволюция" относится к способу, посредством которого образуют и экспрессируют полинуклеотидные варианты и проводят их скрининг на активность (например, полипептид со связывающей активностью в отношении белка-мишени, человеческого сывороточного альбумина) в рекурсивном способе. При скрининге выбирают один или более кандидатов и способ затем повторяют с использованием полинуклеотидов, кодирующих выбранные кандидаты, для образования новых вариантов. Направленная эволюция включает по меньшей мере два раунда внесения разнообразия и может включать 3, 4, 5, 10, 20 или более раундов внесения разнообразия и селекции. Разнообразие может быть внесено любым способом, известным специалистам в данной области техники, включая, например, ошибочно-направленную ПЦР, перетасовку генов, химический мутагенез и т.п.

Термин "перетасовка" использован здесь для обозначения рекомбинации между неидентичными последовательностями. В некоторых воплощениях перетасовка может включать кроссинговер посредством гомологичной рекомбинации или посредством негомологичной рекомбинации, как, например, посредством систем cre/lox и/или flp/frt. Перетасовка может быть проведена с использованием множества различных форматов, включая, например, *in vitro* и *in vivo* форматы перетасовки, *in silico* форматы перетасовки, форматы перетасовки с использованием либо двуцепочечных, либо одноцепочечных матриц, форматы перетасовки на основе праймеров, форматы перетасовки на основе фрагментации нуклеиновых кислот, форматы перетасовки с использованием олигонуклеотидов, все из которых основаны на эпизодах рекомбинации между неидентичными последовательностями и описаны более подробно в данном изобретении ниже, либо ссылки на них приведены в данном изобретении ниже, а также сходные форматы на основе рекомбинации.

При использовании здесь термин "случайный" относится к полинуклеотидной последовательности или аминокислотной последовательности, состоящей из двух или более аминокислот и конструированной вероятностным или случайным способом. Случайная полинуклеотидная последовательность или аминокислотная последовательность может включать мотивы каркасных областей или каркасов, которые могут содержать инвариантные последовательности.

GroEl и GroEs

Пример 24. Образование лиганда с двойной специфичностью, содержащего неиммуноглобулиновый каркас cpn10 (GroEs), связывающий сывороточный альбумин, посредством CDR-переноса.

Домен CDR3 dAb7h14 используют следующим образом для конструирования полипептида с неиммуноглобулиновым каркасом cpn10 (GroEs), связывающего человеческий сывороточный альбумин.

Последовательность CDR3 (AQGAALPRT; SEQ ID NO.:) dAb7h14 переносят в полипептид cpn10 взамен нативных аминокислотных остатков cpn10 в положениях 19-27 (остатки подвижных петель). Проводят анализ связывания в реальном времени посредством Biacore для оценки специфического связывания человеческого сывороточного альбумина и иммобилизованного полипептида, имеющего происхождение от cpn10, содержащего домен CDR3 dAb7h14 против человеческого сывороточного альбумина (специалисту в данной области техники будет ясно, что аффинность связывания может быть оценена с применением любого подходящего способа, включая, например, осаждение меченого человеческого сывороточного альбумина, конкурентное исследование Biacore и т.п.). При выявлении низкой аффинности в отношении человеческого сывороточного альбумина (например, значения K_d в мкМ-диапазоне или выше) или ее отсутствия, по меньшей мере одну из нескольких стратегий используют для улучшения свойств связывания человеческого сывороточного альбумина полипептида cpn10 с перенесенной CDR3, включая любой из следующих способов, способствующих аффинности связывания.

Длину перенесенной CDR3-области dAb7h14 полипептида cpn10, соответствующей подвижной петлевой области в нативном полипептиде cpn10, адаптируют удалением аминокислотных остатков и/или применением линкерных полипептидов. Например, девять аминокислотных остатков пептидной последовательности CDR3 dAb7h14 увеличивают по длине до 16 аминокислотных остатков с применением аминокислотных линкеров, состоящих из, например, от нуля до семи остатков по длине, расположенных на N- или C-концевых частях полипептидной последовательности CDR3 dAb7h14, достигая посредством этого общей длины перенесенной пептидной последовательности в 16 аминокислот в пределах домена перенесенной CDR3, соответствующего подвижной петле в последовательности нативного cpn10. Такое применение линкерного полипептида (полипептидов), возможно, комбинируют с мутагенезом линкерных последовательностей, последовательности (последовательностей) CDR3 и/или последовательностей cpn10, не являющихся последовательностями CDR, (например, с применением мутагенных способов оптимизации, как описано ниже) для улучшения способности полипептидов cpn10 с перенесенной CDR3 связывать человеческий сывороточный альбумин (например, посредством оптимизации как последовательностей CDR, так и фибронектиновых последовательностей в пределах полипептидов cpn10 с перенесенной CDR3). Полипептидные линкеры,

используемые с этой целью, либо обладают предопределенной последовательностью, либо, возможно, их селекционируют из совокупности случайных полипептидных линкерных последовательностей посредством оценки способности содержащих линкер полипептидов *срп10* с перенесенной CDR3 связывать человеческий сывороточный альбумин. Способы оптимизации проводят параллельно и/или повторно. В способах как параллельной, так и повторной оптимизации (например, созревания аффинности) применяют способы селекции, применимые для оптимизации связывающих свойств полипептидов, как описано ниже и/или как известно в данной области техники.

Связывание человеческого сывороточного альбумина полипептидом (полипептидами) *срп10* с перенесенными CDR, представляющего CDR3 dAb7h14, оптимизируют посредством способов мутагенеза, возможно, в комбинации со способами параллельной и/или повторной селекции, как описано ниже, и/или, в противном случае, как известно в данной области техники. Полипептидные домены каркаса *срп10*, окружающие перенесенную полипептидную последовательность CDR3 dAb7h14, подвергают случайному и/или NNK-мутагенезу, проводимому, как описано ниже. Такой мутагенез проводят пределах полипептидной последовательности *срп10* в отношении не перенесенных аминокислотных остатков и, возможно, рандомизируют для разработки новых или улучшенных полипептидов, связывающих человеческий сывороточный альбумин. Возможно, полипептидный домен CDR3 dAb7h14, представленный в полипептиде *срп10* с перенесенной CDR3, подвергают мутагенезу, посредством, например, случайного мутагенеза, NNK-мутагенеза, "look through" мутагенеза и/или другого принятого в данной области техники способа. Возможно, для проведения таких способов мутагенеза используют ПЦР, что приводит к формированию разнообразия последовательностей в целевых последовательностях в полипептидах *срп10* с перенесенной CDR3. Такие способы сходны с описанными ниже для образования библиотек dAb. В дополнение к случайным и/или "look through" способам мутагенеза используют направленный мутагенез целевых аминокислотных остатков, где по структурной информации установлено, что определенные аминокислотные остатки имеют критическое значение для связывания человеческого сывороточного альбумина.

Полипептиды *срп10*, содержащие перенесенную последовательность CDR3 dAb7h14, конструированные, как описано выше, подвергают способам параллельной и/или повторной селекции для идентификации тех полипептидов *срп10*, которые оптимизированы для связывания человеческого сывороточного альбумина. Например, после получения библиотеки последовательностей полипептидов *срп10* с перенесенной CDR3 dAb7h14, эту библиотеку таких полипептидов представляют на фаге и подвергают нескольким раундам селекции, требующим связывания сывороточного альбумина и/или пролиферации, как описано ниже для селекции dAb, связывающих сывороточный альбумин, из библиотек dAb. Возможно, селекцию проводят против сывороточного альбумина, иммобилизованного на иммунологических пробирках или против биотинилированного сывороточного альбумина в растворе. Возможно, аффинность связывания определяют с применением поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и Biacore (Karlsson et al., 1991), с применением системы Biacore (Uppsala, Sweden), где для полностью оптимизированных мономерных и/или олигомерных полипептидов, имеющих происхождение от *срп10*, в идеальном случае достигают значений K_d аффинности связывания с человеческим сывороточным альбумином в нМ-диапазоне или менее.

После идентификации мономерных полипептидов, имеющих происхождение от *срп10*, связывающих человеческий сывороточный альбумин, свойства связывания человеческого альбумина таких исходных мономеров могут быть дополнительно усилены посредством комбинирования таких мономеров с другими мономерами, с последующим дополнительным мутагенезом и/или селекцией, образуя посредством этого композицию олигомерного *срп10*/GroEs, обладающую специфичной аффинностью в отношении человеческого сывороточного альбумина. После идентификации композиции олигомерного *срп10*/GroEs, обладающей аффинностью в отношении человеческого сывороточного альбумина, такие полипептиды затем используют для образования композиций лигандов с двойной специфичностью любым из способов, описанных ниже.

Пример 25. Образование лиганда с двойной специфичностью, содержащего неиммуноглобулиновый каркас *срп10*, связывающий сывороточный альбумин, посредством селекции группировок, связывающих человеческий сывороточный альбумин.

Нативный полипептид *срп10* подвергают методикам селекции в библиотеке и, возможно, созревания аффинности, для получения молекул с неиммуноглобулиновым каркасом *срп10*, связывающих человеческий сывороточный альбумин, для использования в лигандах с двойной специфичностью по изобретению.

Способность нативного полипептида *срп10* связывать человеческий сывороточный альбумин изначально оценивают исследованием Biacore, как описано выше. После выявления низкой аффинности полипептида *срп10* в отношении человеческого сывороточного альбумина (например, значения K_d в мкМ-диапазоне или выше) или ее отсутствия, по меньшей мере одну из нескольких стратегий используют для придания свойств связывания человеческого сывороточного альбумина полипептиду *срп10*, включая один или более из следующих способов, способствующих аффинности связывания.

Связывания человеческого сывороточного альбумина полипептидом (полипептидами) с каркасом

срп10 достигают и оптимизируют посредством способов мутагенеза, возможно, в комбинации со способами параллельной и/или повторной селекции, как описано ниже, и/или, в противном случае, как известно в данной области техники. Домены полипептида с каркасом срп10 подвергают случайному и/или NNK-мутагенезу, проводимому, как описано ниже. Такой мутагенез проводят в отношении всего полипептида срп10 или в отношении определенных последовательностей в пределах полипептида срп10, включая аминокислотные остатки подвижных петель в положениях 19-27, и, возможно, рандомизируют для разработки новых или улучшенных полипептидов, связывающих человеческий сывороточный альбумин. Возможно, для проведения таких способов мутагенеза используют ПЦР, что приводит к формированию разнообразия последовательностей в целевых последовательностях в полипептидах срп10. (Такие способы сходны с описанными ниже для образования библиотек dAb.) В дополнение к случайным способам мутагенеза используют направленный мутагенез целевых аминокислотных остатков, где по структурной информации установлено, что определенные аминокислотные остатки полипептидов срп10 имеют критическое значение для связывания человеческого сывороточного альбумина.

Полипептиды срп10, конструированные, как описано выше, подвергают способам параллельной и/или повторной селекции для идентификации тех полипептидов срп10, которые оптимизированы для связывания человеческого сывороточного альбумина. Например, после получения библиотеки мутированных последовательностей полипептидов срп10, указанную библиотеку полипептидов представляют на фаге и подвергают нескольким раундам селекции, требующим связывания сывороточного альбумина и/или пролиферации, как описано ниже для селекции dAb, связывающих сывороточный альбумин, из библиотек dAb. Возможно, селекцию проводят против сывороточного альбумина, иммобилизованного на иммунологических пробирках или против биотинилированного сывороточного альбумина в растворе. Возможно, аффинность связывания определяют с применением поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и Biacore (Karlsson et al., 1991), с применением системы Biacore (Uppsala, Sweden), где для полностью оптимизированных мономерных и/или олигомерных полипептидов, имеющих происхождение от срп10, в идеальном случае достигают значений K_d аффинности связывания с человеческим сывороточным альбумином в нМ-диапазоне или менее.

После идентификации мономерных полипептидов, имеющих происхождение от срп10, связывающих человеческий сывороточный альбумин, свойства связывания человеческого альбумина таких исходных мономеров могут быть дополнительно усилены посредством комбинирования таких мономеров с другими мономерами, с последующим дополнительным мутагенезом и/или селекцией, образуя посредством этого композицию олигомерного срп10/GroEs, обладающую специфичной аффинностью в отношении человеческого сывороточного альбумина. После идентификации композиции олигомерного срп10/GroEs, обладающей аффинностью в отношении человеческого сывороточного альбумина, такие полипептиды затем используют для образования композиций лигандов с двойной специфичностью любым из способов, описанных ниже.

Полипептиды GroE1

GroE1 является ключевым молекулярным шапероном у *E. coli*, состоящим из 14 субъединиц, каждая из которых имеет молекулярную массу приблизительно 57,5 кДа, расположенных в двух семичленных кольцах (Braig et al. 1994 Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 3978-3982). В кольцевой системе GroE1 имеется большая полость, и широко распространено мнение о том, что полость необходима для эффективного фолдинга белков. Для оптимальной активности необходим кошаперон, GroEs, состоящий из семичленного кольца из субъединиц, массой 10 кДа (Hunt et al. 1996 Nature 379: 37-45). В каждой субъединице GroEs использована подвижная петля с консервативным гидрофобным трипептидом для взаимодействия с GroE1 (Landry et al. 1993 Nature 364: 255-258). Подвижные петли в большинстве случаев имеют длину менее 16 аминокислот и проходят превращение из неупорядоченных петель в β -шпильки одновременно со связыванием апикальных доменов GroE1 (Shewmaker et al. 2001 J. Biol. Chem. 276: 31257-31264). Для активности комплекса GroE1/GroEs необходим аденозинтрифосфат (АТФ). GroE1 и GroEs широко распространены у всех организмов, и их часто называют молекулами-шаперонинами (срп), срп10 и срп10 соответственно.

GroE1 является аллостерическим белком. Аллостерические белки являются особым классом олигомерных белков, которые сменяют две или более различные трехмерные структуры в процессе связывания лигандов и субстратов. Аллостерические белки часто вовлечены в контрольные процессы в биологии или там, где происходит взаимное превращение механической и физико-химической энергии. Роль АТФ состоит в стимуляции этого аллостерического изменения, что вызывает переход GroE1 из состояния, прочно связывающего денатурированные белки, в состояние, слабо связывающее денатурированные белки. Ко-шаперон, GroEs, содействует этому процессу, способствуя состоянию слабого связывания. Он может также действовать в качестве кэпа, блокируя полость GroE1. Кроме того, его связывание с GroE1, вероятно, непосредственно конкурирует со связыванием денатурированных субстратов. Конечный результат состоит в том, что связывание GroEs и АТФ с GroE1 со связанным субстратом в его денатурированной форме приводит к высвобождению денатурированного субстрата либо в полость, либо в раствор, где он может пройти рефолдинг.

GroEl и GroEs представляют собой полипептидные каркасы, которые могут быть использованы для мультимеризации мономерных полипептидов или белковых доменов с образованием мультимерных белков с любой желаемой характеристикой. Как также описано ниже, например, для композиций авимеров, мультимеризация полипептидных мономеров часто является желательной.

Для многих белков необходимо содействие молекулярных шаперонов при их фолдинге *in vivo* или рефолдинге *in vitro* с высоким выходом. Молекулярные шапероны являются белками, которые часто имеют большие размеры и для их функционирования необходим источник энергии, такой как АТФ. Ключевым молекулярным шапероном у *E.coli* является GroEl, состоящий из 14 субъединиц, каждая из которых имеет молекулярную массу приблизительно 57,5 кДа, расположенных в двух семичленных кольцах. В кольцевой системе GroEl имеется большая полость, и широко распространено мнение о том, что полость необходима для эффективного фолдинга белков. Для оптимальной активности необходим кошаперон, GroEs, состоящий из семичленного кольца из субъединиц, массой 10 кДа. Для активности комплекса GroEl/GroEs необходим источник энергии, АТФ.

Минишапероны были подробно описаны в других публикациях (см. международную заявку на патент WO 99/05163, описание которой полностью включено сюда посредством ссылки). Полипептиды-минишапероны обладают активностью шаперонов в мономерной форме и не требуют энергии в форме АТФ. Определенные фрагменты апикального домена GroEl длиной приблизительно 143-186 аминокислотных остатков, обладают активностью молекулярных шаперонов в отношении белков либо в растворе в мономерных условиях, либо в монодисперсной форме и прикрепленные к подложке.

Каркасы GroEl и GroEs делают возможной олигомеризацию полипептидов с образованием функциональных белковых олигомеров, обладающих активностями, превышающими активности рекомбинантных мономерных полипептидов. Cpn10 является широко распространенным компонентом шаперониновой системы cpn10/cpn10. Примеры cpn10 включают бактериальный GroEs и Gr31 бактериофага T4 и также перечислены ниже. Другие члены семейства cpn10 будут известны специалистам в данной области техники.

Субъединицы белкового каркаса объединяются с образованием белкового каркаса. Такой каркас может иметь любую форму и содержать любое число субъединиц. Для определенных воплощений GroEl и GroEs каркас содержит от 2 до 20 субъединиц, от 5 до 15 субъединиц или приблизительно 10 субъединиц. Структура встречающихся в природе каркасов членов семейства cpn10 содержит семь субъединиц в форме семичленного кольца или цикла. Таким образом, в определенных воплощениях каркас представляет собой семичленное кольцо.

Гетерологичная аминокислотная последовательность, которая может представлять собой, например, домен CDR3, имеющий происхождение от антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, обладающий аффинностью в отношении белка-мишени (например, человеческого сывороточного альбумина), или, возможно, которая может представлять собой отдельный остаток, такой как цистеин, делающий возможным связывание с каркасом дополнительных групп или молекул, может быть введена в последовательность олигомеризуемой субъединицы белкового каркаса таким образом, что как N-, так и C-конец полипептидного мономера образованы последовательностью олигомеризуемой субъединицы белкового каркаса. Таким образом, гетерологичный полипептид включают в последовательность субъединицы каркаса, например, замещением одной или более его аминокислот.

Известно, что субъединицы cpn10 обладают "подвижной петлей" в их структуре. Подвижная петля расположена между 15 и 34 аминокислотами, предпочтительно между 16 и 33 аминокислотами, в последовательности GroEs *E.coli* и в эквивалентных положениях других членов семейства cpn10. Подвижная петля Gr31 T4 расположена между 22 и 45, предпочтительно 23 и 44 остатками. Возможно, гетерологичный полипептид может быть введен замещением всей подвижной петли полипептида семейства cpn10 или ее части. Там, где субъединица каркаса представляет собой полипептид семейства cpn10, гетерологичная последовательность может, сверх того, быть включена в его N- или C-конец или в положения, эквивалентные β -шпильке свода полипептидов семейства cpn10. Это положение расположено между 54 и 67, предпочтительно 55 и 66, и предпочтительно 59 и 61, положениями Gr31 бактериофага T4 или между 43 и 63, предпочтительно 44 и 62, преимущественно 50 и 53, положениями GroEs *E.coli*.

Возможно, полипептид может быть введен в N- или C-конец субъединицы каркаса совместно с циклической перестановкой самой субъединицы. Циклическая перестановка описана в Graf and Schachman, PNAS(USA) 1996, 93: 11591. По существу, полипептид циркуляризируют слиянием существующих N- и C-концов и расщеплением полипептидной цепи в другом месте с образованием новых N- и C-концов. В предпочтительном воплощении изобретения гетерологичный полипептид может быть включен в N- и/или C-конец, образованные после циклической перестановки. Место образования новых концов может быть выбрано в соответствии с желаемыми свойствами и может включать подвижную петлю и/или β -шпильку свода.

Преимущественно гетерологичные последовательности, которые могут быть одинаковыми или разными, могут быть введены в более чем одно из положений и/или в положения, отличающиеся от

определенных выше положений в пределах субъединицы белкового каркаса. Таким образом, каждая субъединица может содержать два или более гетерологичных полипептида, представляемые на каркасе при их объединении. Гетерологичные полипептиды могут быть представлены на субъединице каркаса в свободной или ограниченной форме, в зависимости от степени свободы, предоставляемой местом введения в последовательность каркаса. Например, изменение длины последовательностей, окружающих подвижную петлю или петлю β -шпильки в каркасе, будет модулировать степень ограничения любого введенного туда гетерологичного полипептида.

Композиции GroE1 и/или GroEs могут также содержать полипептидный олигомер, включающий два или более мономера. Олигомер может иметь конфигурацию гетероолигомера, содержащего две или более различные аминокислотные последовательности, введенные в каркас, или гомоолигомера, где введенные в каркас последовательности одинаковы.

Мономеры, составляющие олигомер, могут быть ковалентно перекрестно связаны друг с другом. Перекрестное связывание может быть осуществлено рекомбинантными способами таким образом, что мономеры с самого начала экспрессируют в виде олигомера; альтернативно, перекрестное связывание может быть проведено в Cys остатках каркаса. Например, для перекрестного связывания субъединиц каркаса могут быть использованы уникальные Cys остатки, введенные между 50 и 53 положениями каркаса GroEs, или эквивалентные положения других членов семейства *srp10*.

Природа гетерологичного полипептида, введенного в субъединицу каркаса, может быть выбрана по желанию. В определенных воплощениях синтезируют каркасные белки, представляющие антитела или их фрагменты, такие как scFv, природные или камелизированные домены V_H или фрагменты CDR3 V_H .

В типичном воплощении полипептидный мономер, способный к олигомеризации, может быть изготовлен, как описано выше и/или как изложено в WO 00/69907, полностью включенной сюда посредством ссылки. Способ такого изготовления может включать введение последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей гетерологичный полипептид, в последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую субъединицу олигомеризуемого белкового каркаса, включение полученной нуклеиновой кислоты в вектор экспрессии и экспрессию нуклеиновой кислоты с получением полипептидных мономеров. Возможно, полипептидный олигомер может затем быть получен способом, включающим возможность объединения полипептидных мономеров, полученных, как описано выше, с образованием олигомера. В определенных воплощениях мономеры перекрестно связаны с образованием олигомера.

В определенных воплощениях каркасный полипептид основан на членах семейства *srp10/Hsp10*, таких как GroEs или его аналог. Особенно предпочтительным аналогом является полипептид Gp31 T4. Аналоги GroEs, включая Gp31, обладают подвижной петлей (Hunt, J.F., et al. (1997), Cell 90, 361-371; Landry, S.J., et al. (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 11622-11627), которая может быть включена или замещена для слияния гетерологичного полипептида с каркасом.

Гомологи *srp10* широко распространены среди животных, растений и бактерий. Например, поиск в GenBank указывает на то, что гомологи *srp10* известны у следующих видов:

Actinobacillus actinomycetemcomitans; Actinobacillus pleuropneumoniae; Aeromonas salmonicida; Agrobacterium tumefaciens; Allochromatium vinosum; Amoeba proteus symbiotic bacterium; Aquifex aeolicus; Arabidopsis thaliana; Bacillus sp; Bacillus stearothermophilus; Bacillus subtilis; Bartonella henselae; Bordetella pertussis; Borrelia burgdorferi; Brucella abortus; Buchnera aphidicola; Burkholderia cepacia; Burkholderia vietnamiensis; Campylobacter jejuni; Caulobacter crescentus; Chlamydia muridarum; Chlamydia trachomatis; Chlamydomonada pneumoniae; Clostridium acetobutylicum; Clostridium perfringens; Clostridium thermocellum; coliphage T- Cowdria ruminantium; Cyanella Cyanophora paradoxa; Ehrlichia canis; Ehrlichia chaffeensis; Ehrlichia equi; Ehrlichia phagocytophila; Ehrlichia risticii; Ehrlichia sennetsu; Ehrlichia sp 'HGE agent; Enterobacter aerogenes; Enterobacter agglomerans; Enterobacter amnigenus; Enterobacter asburiae; Enterobacter gergoviae; Enterobacter intermedius; Erwinia aphidicola; Erwinia carotovora; Erwinia herbicola; Escherichia coli; Francisella tularensis; Glycine max; Haemophilus ducreyi; Haemophilus influenzae Rd; Helicobacter pylori; Holospora obtusa; Homo sapiens; Klebsiella ornithinolytica; Klebsiella oxytoca; Klebsiella planticola; Klebsiella pneumoniae; Lactobacillus helveticus; Lactobacillus Zeae; Lactococcus lactis; Lawsonia intracellularis; Leptospira interrogans; Methylovorus sp strain SS; Mycobacterium avium; Mycobacterium avium subsp avium; Mycobacterium avium subsp paratuberculosis; Mycobacterium leprae; Mycobacterium tuberculosis; Mycoplasma genitalium; Mycoplasma pneumoniae; Myzus persicae primary endosymbiont; Neisseria gonorrhoeae; Oscillatoria sp NKBG,- Pantoea ananas; Pasteurella multocida; Porphyromonas gingivalis; Pseudomonas aeruginosa; Pseudomonas aeruginosa; Pseudomonas putida; Rattus norvegicus; Rattus norvegicus; Rhizobium leguminosarum; Rhodobacter capsulatus; Rhodobacter sphaeroides; Rhodothermus marinus; Rickettsia prowazekii; Rickettsia rickettsii; Saccharomyces cerevisiae; Serratia ficaria; Serratia marcescens; Serratia rubidaea; Sinorhizobium meliloti; Sitophilus oryzae principal endosymbiont; Stenotrophomonas maltophilia; Streptococcus pneumoniae; Streptomyces albus; Streptomyces coelicolor; Streptomyces coelicolor; Streptomyces lividans; Synechococcus sp; Synechococcus vulcanus; Synechocystis sp; Thermoanaerobacter brockii; Thermotoga maritima; Thermus aquaticus; Treponema pallidum; Wolbachia sp; Zymomonas mobilis.

Преимущество субъединиц семейства *srp10* состоит в том, что они обладают подвижной петлей, обеспечивающей активность природного шаперонина по фолдингу белков, которая может быть удалена, не затрагивая каркас. *Srp10* с удаленной подвижной петлей не имеет биологической активности, что делает его преимущественно инертным каркасом, минимизируя, таким образом, любые потенциально вредные эффекты.

Введение подходящего биологически активного полипептида может придать биологическую активность (например, связывание человеческого сывороточного альбумина) новому полипептиду, образованному таким образом. Действительно, биологическая активность введенного полипептида может быть улучшена введением биологически активного полипептида в каркас, в особенности, например, при применении мутагенеза и основанных на аффинности способов скрининга, как описано здесь, для оптимизации связывания белка-мишени полипептидом, представленным на каркасе.

Возможны альтернативные места для введения пептидов. Преимущественным вариантом является введение в положение, эквивалентное β -шпильке свода GroEs. Это включает замещение Glu- в Gp31 желаемым полипептидом. Аминокислотная последовательность представляет собой Pro (59)-Glu(60)-Gly(61). На уровне ДНК ее подходящим образом превращают в сайт Smal (CCC:GGG), кодирующий Pro-Gly, оставляя сайт рестрикции с тупыми концами для введения пептида в виде фрагмента ДНК. Сходным образом, введение может быть осуществлено между 50 и 53 положениями последовательности GroEs и в эквивалентных положениях других членов семейства *srp10*. Альтернативно, может быть применена инвертированная ПЦР для представления пептида на противоположной стороне каркаса.

Члены семейства молекул шаперонинов *srp60/Hsp60* могут также быть использованы в качестве

каркасов. Например, может быть использован тетрадекамерный бактериальный шаперонин GroEl. В определенных воплощениях гетерологичные полипептиды будут вводить между 191 и 376 положениями, в частности, между 197 и 333 положениями (представленными конструированным сайтом SacII и уникальным сайтом Cla I) для сохранения интактной шарнирной области между экваториальным и апикальным доменами для придания подвижности введенному полипептиду. Выбор каркаса может зависеть от предполагаемого применения олигомера (или лиганда с двойной специфичностью, включающего такой олигомер и/или имеющего происхождение от такого олигомера): например, если олигомер предназначен для целей вакцинации, то применение иммуногенного каркаса, такого как имеющие происхождение от *Mycobacterium tuberculosis*, особенно преимущественно и придает адьювантный эффект.

Также могут быть использованы мутанты молекул *cpn60*. Например, однокольцевой мутант GroEl (GroElSRI) содержит четыре точковые мутации, затрагивающими главное соединение между двумя кольцами GroEl (R452E, E461A, S463A и V464A) и не имеет функциональной активности *in vitro*, поскольку он свободно связывает GroEs. GroElSR2 имеет дополнительную мутацию Glu191-Gly, которая восстанавливает активность, снижая аффинность в отношении GroEs. Оба эти мутанта образуют кольцевые структуры и будут подходящими для использования в качестве каркасов.

Определенные встречающиеся в природе каркасные молекулы являются продуктами бактериофагов: по этой причине антитела к таким каркасам редко встречаются в природе. Это улучшает применение каркасных слитых белков в качестве вакцинных агентов. Gr31 T4 с удаленной петлей не имеет биологической активности (за исключением доминантно-негативной или внутриклеточной вакцины против бактериофага T4), минимизируя, таким образом, вредные эффекты на хозяина. Тем не менее, введение подходящих последовательностей, кодирующих полипептиды, может придавать биологическую активность новым белкам. Действительно, биологическая активность может быть улучшена введением в каркасный белок.

Аффинность антител или фрагментов антител в отношении антигенов (например, человеческого сывороточного альбумина) может быть увеличена олигомеризацией по настоящему изобретению. Фрагменты антител могут представлять собой такие фрагменты, как фрагменты Fv, Fab и F(ab')₂ или любые их производные, такие как одноцепочечные фрагменты Fv. Антитела или фрагменты антител могут быть нерекombинантными, рекомбинантными или гуманизированными. Антитело может быть любого изотипа иммуноглобулинов, например IgG, IgM и т.п.

В определенных воплощениях фрагменты антител могут представлять собой камелизированные домены V_H. Известно, что основные межмолекулярные взаимодействия между антителами и их когнатными антигенами опосредованы через V_H CDR3.

Применение каркасных молекул GroEl и/или GroEs (*cpn10*), как описано ниже и как известно в данной области техники, предусматривает олигомеризацию доменов V_H или доменов V_H CDR3 с образованием олигомера с высокой аффинностью. В такой олигомер могут быть включены два или более олигомера; в олигомер на основании каркаса *cpn10* могут быть включены до 7 доменов с образованием гептамерной олигомерной молекулы (гептатела), связывающей белок-мишень (например, человеческий сывороточный альбумин).

С целью придания и/или оптимизации аффинности определенных каркасных полипептидов/олигомеров в отношении белка-мишени (например, человеческого сывороточного альбумина) в гетерологичные полипептиды, введенные в каркасные полипептиды, может быть внесено разнообразие таким образом, что специфичность и/или аффинность таких полипептидов/олигомеров в отношении их лигандов/субстратов может быть исследована и/или картирована. Могут быть получены варианты одной и той же петли, или разработан набор разных стандартных петель для быстрой оценки аффинности нового полипептида в отношении белка-мишени (например, человеческого сывороточного альбумина). Варианты могут быть получены рандомизацией последовательностей в соответствии с известными методиками, такими как ПЦР. Перед введением в белковые каркасы они могут быть подвергнуты селекции по протоколу скрининга, такого как фаговый дисплей.

"Олигомеризуемый каркас", как он назван здесь, представляет собой полипептид, способный к олигомеризации, или который может быть олигомеризован, с образованием каркаса, и с которым может быть слит гетерологичный полипептид, предпочтительно ковалентно, без устранения способностей к олигомеризации. Таким образом, он представляет "каркас", применением которого полипептиды могут быть упорядочены в виде мультимеров по настоящему изобретению. Возможно, части полипептида дикого типа, от которого каркас имеет происхождение, могут быть удалены, например, замещением гетерологичным полипептидом, который должен быть представлен на каркасе.

Мономеры представляют собой полипептиды, обладающие потенциалом к олигомеризации или к тому, чтобы быть олигомеризованными. Олигомеризация может быть обусловлена включением в полипептид субъединицы олигомеризуемого каркаса, которая, при комбинировании с другими субъединицами каркаса, будет олигомеризоваться с ними. Возможно, олигомеризация может быть обусловлена применением принятых в данной области техники линкеров с целью соединения мономеров друг с другом.

При использовании здесь "олигомер" является синонимом "полимера" и "мультимера" и использован для обозначения того, что рассматриваемый объект не является мономерным. Таким образом, олигомерные полипептиды содержат по меньшей мере две мономерные единицы, соединенные друг с другом ковалентно или нековалентно. Число используемых мономерных единиц будет зависеть от предполагаемого применения олигомера, и может составлять от 2 до 20 или более. Возможно, оно составляет от 5 до 10 и предпочтительно приблизительно 7.

Фаговый дисплей

Технология фагового дисплея оказалась крайне полезной в биологических исследованиях. Она делает возможной селекцию лигандов из больших библиотек молекул. В каркасной технологии возможности фагового дисплея могут быть использованы особенно преимущественным образом. Молекулы *srn10* могут быть представлены в виде мономеров на бактериофагах *fd*, по аналогии с дисплеем одноцепочечных молекул *Fv*. Библиотеки вставок (на место высокоподвижной петли, например, с использованием полипептидов CDR3, имеющих происхождение от антител, связывающих человеческий сывороточный альбумин) конструируют стандартными способами и проводят скрининг полученных библиотек на интересующие молекулы. Такая селекция основана на аффинности. После идентификации молекул, обладающих аффинностью в отношении белка-мишени (например, человеческого сывороточного альбумина), возможно, посредством одного или более повторений мутагенеза, экспрессии (белки GroEl, -57,5 кДа GroEl и -10 кДа GroEs могут быть экспрессированы и очищены, как описано ранее (Chatellier et al. 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 9861-9866; Corrales and Fersht, 1996, 1: 265-273), или любым способом, принятым в данной области техники) и скрининга аффинности, могут быть олигомеризованы, используя посредством этого преимущество авидности таких молекул. Возможно, определенные селектированные мономеры будут способны к перекрестному связыванию или олигомеризации их партнеров по связыванию.

Фибронектин

Пример 26. Образование лиганда с двойной специфичностью, содержащего неиммуноглобулиновый фибронектиновый каркас, связывающий сывороточный альбумин, посредством CDR-переноса.

Домены CDR dAb7h14 используют для конструирования полипептида с неиммуноглобулиновым фибронектиновым каркасом, связывающего человеческий сывороточный альбумин, следующим образом. Последовательности CDR1 (RASQWIGSGLS; SEQ ID NO.: ___), CDR2 (WRSSLQS; SEQ ID NO.: ___) и CDR3 (AQGAALPRT; SEQ ID NO.: ___) dAb7h14 переносят в ¹⁰Fn3 вместо аминокислотных остатков нативного ¹⁰Fn3 в положениях 21-31 (петля BC), 51-56 (петля DE) и 76-88 (петля FG) соответственно. Проводят анализ связывания в реальном времени посредством *Biacore* для оценки специфического связывания человеческого сывороточного альбумина и иммобилизованного полипептида, имеющего происхождение от фибронектина, содержащего CDR-домены dAb7h14 против человеческого сывороточного альбумина (специалисту в данной области техники будет ясно, что аффинность связывания может быть оценена с применением любого подходящего способа, включая, например, осаждение меченого человеческого сывороточного альбумина, конкурентное исследование *Biacore* и т.п.). При выявлении низкой аффинности в отношении человеческого сывороточного альбумина (например, значения K_d в мкМ-диапазоне или выше) или ее отсутствия, по меньшей мере одну из нескольких стратегий используют для улучшения свойств связывания человеческого сывороточного альбумина фибронектинового полипептида с перенесенными CDR, включая любой из следующих способов, способствующих аффинности связывания.

Длину (длины) CDR-перенесенных областей фибронектинового полипептида, контактирующим с растворителем петлевым областям в полипептиде нативного фибронектина, адаптируют применением линкерных полипептидов. Например, девять аминокислотных остатков пептидной последовательности CDR dAb7h14 увеличивают по длине до 13 аминокислотных остатков с применением аминокислотных линкеров, состоящих из, например, от нуля до четырех остатков по длине, расположенных на одной из N- или C-концевых частей последовательности полипептида CDR3 dAb7h14 или на обеих концевых частях, достигая посредством этого общей длины перенесенной пептидной последовательности в 13 аминокислот в пределах CDR3-перенесенного домена, соответствующего петле FG последовательности нативного фибронектина. Такое применение линкерного полипептида (полипептидов), возможно, комбинируют с мутагенезом линкерных последовательностей, последовательностей CDR и/или полипептидных последовательностей фибронектина, не являющихся последовательностями CDR (например, с применением способов мутагенной оптимизации, как описано ниже), для улучшения способности фибронектиновых полипептидов с перенесенными CDR связывать человеческий сывороточный альбумин (например, посредством оптимизации как последовательностей CDR, так и фибронектиновых последовательностей, в пределах фибронектиновых полипептидов с перенесенными CDR). Полипептидные линкеры, используемые с этой целью либо обладают предопределенной последовательностью, либо, возможно, их селектируют из совокупности случайных полипептидных линкерных последовательностей посредством оценки способности содержащих линкер фибронектиновых полипептидов с перенесенными CDR связывать человеческий сывороточный

альбумин. Способы оптимизации проводят параллельно и/или повторно. В способах как параллельной, так и повторной оптимизации (например, созревания аффинности) применяют способы селекции, как описано ниже и/или как известно в данной области техники, применимые для оптимизации связывающих свойств полипептидов.

Связывание человеческого сывороточного альбумина фибронектиновым полипептидом (полипептидами) с перенесенными CDR, представляющих CDR dAb7h14, оптимизируют посредством мутагенеза, возможно, в комбинации со способами параллельной и/или повторной селекции, как описано ниже, и/или, в противном случае, как известно в данной области техники. Полипептидные домены каркаса $^{10}\text{Fn3}$, окружающие перенесенные полипептидные последовательности CDR dAb7h14, подвергают случайному и/или NNK-мутагенезу, проводимому, как описано ниже. Такой мутагенез проводят в пределах полипептидной последовательности $^{10}\text{Fn3}$ в отношении 1-9, 44-50, 61-54, 82-94 аминокислот (края бета-складчатостей); 19, 21, 30-46 (четных), 79-65 (нечетных) аминокислот (контактирующие с растворителем поверхности обеих бета-складчатостей); и 14-16 и 36-45 аминокислот (не-CDR-подобные контактирующие с растворителем петли и бета-изгибы); и, возможно, рандомизируют для разработки новых или улучшенных полипептидов, связывающих человеческий сывороточный альбумин. Возможно, полипептидные домены CDR dAb7h14, представленные в фибронектиновом полипептиде с перенесенными CDR, подвергают мутагенезу посредством, например, случайного мутагенеза, NNK-мутагенеза, "look through" мутагенеза и/или другого принятого в данной области техники способа. Возможно, для проведения таких способов мутагенеза используют ПЦР, что приводит к формированию разнообразия последовательностей в целевых последовательностях в фибронектиновых полипептидах с перенесенными CDR. Такие способы сходны с описанными ниже для образования библиотек dAb. В дополнение к случайным и/или "look through" способам мутагенеза используют направленный мутагенез целевых аминокислотных остатков, где по структурной информации установлено, что определенные аминокислотные остатки имеют критическое значение для связывания человеческого сывороточного альбумина.

Фибронектиновые полипептиды, содержащие перенесенные последовательности CDR dAb7h14, конструированные, как описано выше, подвергают способам параллельной и/или повторной селекции для идентификации тех фибронектиновых полипептидов, которые оптимизированы для связывания человеческого сывороточного альбумина. Например, после получения библиотеки последовательностей фибронектиновых полипептидов с перенесенными CDR, эту библиотеку таких полипептидов представляют на фаге и подвергают нескольким раундам селекции, требующим связывания сывороточного альбумина и/или пролиферации, как описано ниже для селекции dAb, связывающих сывороточный альбумин, из библиотек dAb. Возможно, селекцию проводят против сывороточного альбумина, иммобилизованного на иммунологических пробирках, или против биотинилированного сывороточного альбумина в растворе. Возможно, аффинность связывания определяют с применением поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и Biacore (Karlsson et al., 1991), с применением системы Biacore (Uppsala, Sweden), где для полностью оптимизированных полипептидов, имеющих происхождение от фибронектина, в идеальном случае достигают значений K_d аффинности связывания с человеческим сывороточным альбумином в нМ-диапазоне или менее. После идентификации полипептидов, имеющих происхождение от фибронектина, связывающих человеческий сывороточный альбумин, такие полипептиды затем используют для образования композиций лигандов с двойной специфичностью любым из способов, описанных ниже.

Пример 27. Образование лиганда с двойной специфичностью, содержащего неиммуноглобулиновый фибронектиновый каркас, связывающий сывороточный альбумин, посредством селекции группировок, связывающих сывороточный альбумин.

Белок нативного фибронектина, конкретно, полипептид фибронектина $^{10}\text{Fn3}$, подвергают методикам селекции в библиотеке и, возможно, созревания аффинности для получения молекул с неиммуноглобулиновым фибронектиновым каркасом, связывающих человеческий сывороточный альбумин, для использования в лигандах с двойной специфичностью по изобретению.

Проводят анализ связывания в реальном времени посредством Biacore для оценки специфичного связывания человеческого сывороточного альбумина и иммобилизованного нативного фибронектина и/или полипептида, имеющего происхождение от фибронектина. После выявления низкой аффинности фибронектинового полипептида в отношении человеческого сывороточного альбумина (например, значения K_d в мкМ-диапазоне или выше) или ее отсутствия, по меньшей мере одну из нескольких стратегий используют для придания фибронектиновому полипептиду свойств связывания человеческого сывороточного альбумина, включая один или более из следующих способов, способствующих аффинности связывания.

Связывания человеческого сывороточного альбумина полипептидом (полипептидами) с фибронектиновым каркасом достигают и оптимизируют посредством способов мутагенеза, возможно, в комбинации со способами параллельной и/или повторной селекции, как описано ниже, и/или, в противном случае, как известно в данной области техники. Полипептидные домены каркаса $^{10}\text{Fn3}$ подвергают случайному и/или NNK-мутагенезу, проводимому, как описано ниже. Такой мутагенез

проводят в отношении всего полипептида $^{10}\text{Fn3}$ или в отношении определенных последовательностей в пределах полипептида $^{10}\text{Fn3}$, включая 1-9, 44-50, 61-54, 82-94 аминокислоты (края бета-складчатостей); 19, 21, 30-46 (четные), 79-65 (нечетные) аминокислоты (контактирующие с растворителем поверхности обеих бета-складчатостей); 21-31, 51-56, 76-88 аминокислоты (CDR-подобные контактирующие с растворителем петли); и 14-16 и 36-45 аминокислоты (другие контактирующие с растворителем петли и бета-изгибы); и, возможно, рандомизируют для разработки новых или улучшенных полипептидов, связывающих человеческий сывороточный альбумин. Возможно, для проведения таких способов мутагенеза используют ПЦР, что приводит к формированию разнообразия последовательностей в целевых последовательностях в фибронектиновых полипептидах. (Такие способы сходны с описанными ниже для образования библиотек dAb.) В дополнение к случайным способам мутагенеза используют направленный мутагенез целевых аминокислотных остатков, где по структурной информации установлено, что определенные аминокислотные остатки фибронектиновых полипептидов имеют критическое значение для связывания человеческого сывороточного альбумина.

Фибронектиновые полипептиды, конструированные, как описано выше, подвергают способам параллельной и/или повторной селекции для идентификации тех фибронектиновых полипептидов, которые оптимизированы для связывания человеческого сывороточного альбумина. Например, после получения библиотеки мутированных последовательностей фибронектиновых полипептидов, указанную библиотеку полипептидов представляют на фаге и подвергают нескольким раундам селекции, требующим связывания сывороточного альбумина и/или пролиферации, как описано ниже для селекции dAb, связывающих сывороточный альбумин, из библиотек dAb. Возможно, селекцию проводят против сывороточного альбумина, иммобилизованного на иммунологических пробирках, или против биотинилированного сывороточного альбумина в растворе. Возможно, аффинность связывания определяют с применением поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и Biacore (Karlsson et al., 1991), с применением системы Biacore (Uppsala, Sweden), где для полностью оптимизированных полипептидов, имеющих происхождение от фибронектина, в идеальном случае достигают значений K_d аффинности связывания с человеческим сывороточным альбумином в нМ-диапазоне или менее.

После идентификации фибронектиновых полипептидов, связывающих человеческий сывороточный альбумин, такие полипептиды затем используют для образования композиций лигандов с двойной специфичностью любым из способов, описанных ниже.

Фибронектиновые неиммуноглобулиновые каркасы

В определенных воплощениях изобретения для связывания человеческого сывороточного альбумина конструируют неиммуноглобулиновый каркас, содержащий фибронектин или его функциональную группировку и/или фрагмент. Используют неиммуноглобулиновую каркасную структуру, имеющую происхождение от модуля фибронектина III типа (Fn3). Модуль фибронектина III типа является распространенным домен, обнаруженным в крови и структурных белках млекопитающих, который встречается более 400 раз в базе данных белковых последовательностей и, согласно оценкам, встречается в 2% всех белков, секвенированных на настоящий момент. Белки, содержащие последовательность модуля Fn3 включают фибронектины, тенасцин, внутриклеточные белки цитоскелета и прокариотические ферменты (Bork and Doolittle, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:8990, 1992; Bork et al., Nature Biotech. 15:553, 1997; Meinke et al., J. Bacteriol. 175:1910, 1993; Watanabe et al., J. Biol. Chem. 265:15659, 1990). Конкретный неиммуноглобулиновый каркас фибронектина представляет собой десятый модуль человеческого Fn3 ($^{10}\text{Fn3}$), содержащий 94 аминокислотных остатка. Общая конформация этого домена очень сходна с конформацией наименьшего функционального фрагмента антитела, вариабельной области тяжелой цепи, содержащей целую антиген-распознающую единицу в IgG верблюда и ламы. Основные различия между доменами верблюда и ламы и доменом $^{10}\text{Fn3}$ состоят в том, что (1) $^{10}\text{Fn3}$ имеет меньшее количество бета-цепей (семь против девяти) и (2) две бета-складчатости, расположенные друг напротив друга, связаны дисульфидной связью в доменах верблюда и ламы, но не в $^{10}\text{Fn3}$.

Три петли $^{10}\text{Fn3}$, соответствующие антигенсвязывающим петлям тяжелой цепи IgG, расположены между 21-31 (BC), 51-56 (DE) и 76-88 (FG) аминокислотными остатками (см. фиг. 3 патента США № 7115396, полное содержание которого включено сюда посредством ссылки). Длины петель BC и DE, 11 и 6 остатков соответственно, расположены в узком диапазоне соответствующих антиген-распознающих петель, обнаруженных в тяжелых цепях антител, составляющем 7-10 и 4-8 остатков соответственно. Соответственно, стратегия переноса CDR может легко быть применена для введения последовательностей CDR тяжелой цепи в эти домены. Дополнительно и/или альтернативно, в эти две петли может быть внесено генетическое разнообразие любым принятым в данной области техники способом (например, способом сайт-направленного, "look through" мутагенеза, или другим способом мутагенеза, рандомизацией и т.п.), и, возможно, полученный полипептид может быть подвергнут селекции на высокую аффинность в отношении антигена (Альтернативно, внесение генетического разнообразия и/или способы селекции могут быть применены для идентификации композиций со сниженной аффинностью связывания и/или для оптимизации таких свойств, как стабильность, токсичность и т.п.). С применением таких способов петли BC и DE фибронектина могут быть

конструированы для образования контактов с антигенами, эквивалентных контактам соответствующих доменов CDR1 и CDR2 в антителах.

В отличие от петель BC и DE петля FG $^{10}\text{Fn3}$ имеет длину 12 аминокислотных остатков, в то время как соответствующая петля в тяжелых цепях антитела имеет длину от 4 до 28 остатков. Соответственно, для оптимизации связывания антигенов может быть изменена длина петли FG $^{10}\text{Fn3}$ (например, применением рандомизации и/или применением полипептидных линкерных последовательностей (которые также могут быть рандомизированы)), а также ее последовательности с покрытием диапазона длины CDR3 в 4-28 остатков для получения наибольшей возможной гибкости и аффинности при связывании антигена. Действительно, для обоих этих способов, в которых CDR непосредственно переносят в фибронектиновый каркас, и способов, в которых нативный фибронектиновый каркас селекционирует и/или оптимизируют для связывания сывороточного альбумина (или другого антигена-мишени), длины, а также последовательности, CDR-подобных петель имитаторов антител могут быть рандомизированы в процессе *in vitro* или *in vivo* созревания аффинности (как описано более подробно ниже).

Десятый домен человеческого фибронектина III типа, $^{10}\text{Fn3}$, быстро проходит рефолдинг, даже при низкой температуре; конформация его остова была восстановлена за 1 с при 5°C. Термодинамическая стабильность $^{10}\text{Fn3}$ высока ($\Delta G_U=24$ кДж/моль=5,7 ккал/моль), что коррелирует с его высокой температурой плавления, составляющей 110°C.

Одна из физиологических функций $^{10}\text{Fn3}$ состоит в том, что он является субъединицей фибронектина, гликопротеина, существующего в растворимой форме в биологических жидкостях и в нерастворимой форме во внеклеточном матриксе (Dickinson et al., J. Mol. Biol. 236:1079, 1994). Мономер фибронектина массой 220-250 кДа содержит 12 модулей I типа, два модуля II типа и 17 модулей фибронектина III типа (Potts and Campbell, Curr. Opin. Cell Biol. 6:648, 1994). Различные модули III типа вовлечены в связывание фибронектина с интегринами, гепарином и хондроитинсульфатом. Было обнаружено, что $^{10}\text{Fn3}$ опосредует клеточную адгезию через интегринсвязывающий мотив Arg-Gly-Asp (RGD) на одной из его доступных петель. Было показано, что сходные мотивы RGD вовлечены в связывание интегринов другими белками, такими как фибриноген, фактор фон Виллебранда и витронектин (Hynes et al., Cell 69:11, 1992). Для $^{10}\text{Fn3}$ не было описано других функций по связыванию клеток или матрикса.

Наблюдение того, что $^{10}\text{Fn3}$ имеет лишь незначительно большую адгезивную активность, чем короткий пептид, содержащий RGD, согласуется с заключением о том, что активность $^{10}\text{Fn3}$ по связыванию клеток скорее сосредоточена в пептиде RGD, чем распределена по всей структуре $^{10}\text{Fn3}$ (Baron et al., Biochemistry 31:2068, 1992). Тот факт, что $^{10}\text{Fn3}$ без RDG-мотива, скорее всего, не будет связывать другие белки плазмы или внеклеточного матрикса, делает $^{10}\text{Fn3}$ полезным каркасом для замены антител. В дополнение присутствие $^{10}\text{Fn3}$ в природном фибриногене в кровотоке указывает на то, что $^{10}\text{Fn3}$ сам по себе, скорее всего, не будет иммуногенным в организме, из которого он происходит.

В дополнение, было показано, что каркас $^{10}\text{Fn3}$ имеет доступные петлевые структуры, устойчивые к рандомизации, что облегчает образование разнородных пулов имитаторов антител. Это обнаружение было сделано при исследовании гибкости последовательности $^{10}\text{Fn3}$. В частности, последовательность человеческого $^{10}\text{Fn3}$ выравнивали с последовательностями фибронектинов из других источников, а также с последовательностями родственных белков, и результаты этого выравнивания наносили на трехмерную структуру домена человеческого $^{10}\text{Fn3}$. Это выравнивание показало, что большинство консервативных остатков были обнаружены в сердцевине сэндвича бета-складчатости, в то время как высоковариабельные остатки были расположены по краям бета-складчатостей, включая N- и C-концы, на контактирующих с растворителем поверхностях обеих бета-складчатостей и на трех контактирующих с растворителем петлях, выполняющих функцию гипервариабельных петель для созревания аффинности имитаторов антител. В свете этих результатов было установлено, что рандомизация этих трех петель, скорее всего, не будет оказывать вредного эффекта на общую конформацию или стабильность каркаса $^{10}\text{Fn3}$ самого по себе.

Для последовательности человеческого $^{10}\text{Fn3}$ этот анализ указывает на то, что как минимум 1-9, 44-50, 61-54, 82-94 аминокислоты (края бета-складчатостей); 19, 21, 30-46 (четные), 79-65 (нечетные) аминокислоты (контактирующие с растворителем поверхности обеих бета-складчатостей); 21-31, 51-56, 76-88 аминокислоты (CDR подобные контактирующие с растворителем петли); и 14-16 и 36-45 аминокислоты (другие контактирующие с растворителем петли и бета-изгибы) могут быть рандомизированы для разработки новых или улучшенных белков, связывающих соединения. В дополнение, как обсуждено выше, изменения в длине одной или более контактирующих с растворителем петель могут также быть включены в такие способы направленной эволюции.

Альтернативно, изменения в последовательностях β -складчатостей могут также быть использованы для разработки новых белков. Эти мутации изменяют каркас и посредством этого косвенно изменяют структуру (структуры) петель. При применении этого способа не следует насыщать последовательность мутациями, скорее следует ввести небольшое число мутаций. Предпочтительно согласно этому способу

в последовательности β -складчатостей следует вводить не более чем 3-20 изменений.

Разнообразие последовательностей может быть внесено любой методикой, включая, например, мутагенез Taq-полимеразой (Tindall and Kunkel, *Biochemistry* 27:6008 (1988)), рекомбинацию фрагментов или их комбинацию. Сходным образом, для введения дополнительных усовершенствований в неиммуноглобулиновые каркасы может быть использовано увеличение структурного разнообразия библиотек, например, изменением длины, а также последовательности, CDR-представляющих и/или CDR-подобных петель, или структурной перестройкой на основании преимущественных мутаций каркасной области, обнаруженных в селектированных пулах.

Слитые белки, содержащие фибронектиновые каркасные полипептиды

Фибронектиновые каркасные полипептиды, описанные здесь, могут быть слиты с другими белковыми доменами. Например, фибронектиновые каркасные полипептиды, которые, как установлено, связывают человеческий сывороточный альбумин, могут быть слиты с отдельными переменными доменами тяжелой цепи или их антигенсвязывающим фрагментами для образования лиганда с двойной специфичностью по изобретению, содержащего группировку на основе фибронектина, связывающую сывороточный альбумин. В дополнение, фибронектиновые каркасные полипептиды могут быть интегрированы в иммунный ответ у человека слиянием константной области IgG (F_c) с фибронектиновым каркасным полипептидом, таким как модуль $^{10}\text{Fn3}$, предпочтительно через C-конец $^{10}\text{Fn3}$. F_c в такой слитой молекуле $^{10}\text{Fn3-F}_c$ активирует комплементный компонент иммунного ответа и может служить для повышения терапевтической ценности сконструированного фибронектинового полипептида. Сходным образом, слитый белок между фибронектиновым каркасным полипептидом, таким как $^{10}\text{Fn3}$, и белком комплемента, таким как C1q, может быть использован для направленного воздействия на клетки, и слитый белок между фибронектиновым каркасным полипептидом, таким как $^{10}\text{Fn3}$, и токсином может быть использован для специфичного уничтожения клеток, несущих определенный антиген. Любой из этих слитых белков может быть образован стандартными методиками, например, экспрессией слитого белка из рекомбинантного слитого гена, сконструированного с применением общедоступных последовательностей генов и/или, в противном случае, как описано ниже.

Каркасные мультимеры

В дополнение к мономерам любые фибронектиновые каркасные конструкции, описанные здесь, могут быть образованы в виде димеров или мультимеров каркасов в качестве средства увеличения валентности и, таким образом, avidности связывания антигена (например, сывороточного альбумина). Такие мультимеры могут быть образованы ковалентным связыванием. Например, отдельные модули $^{10}\text{Fn3}$ могут быть связаны, имитируя природное связывание $8\text{Fn3-}9\text{Fn3-}10\text{Fn3}$ от C-конца к N-концу или имитируя димеры антител, удерживаемые друг с другом через их константные области. Конструкция $^{10}\text{Fn3-F}_c$ может быть использована для образования димеров с общей схемой $^{10}\text{Fn3-F}_c::\text{Fc-}^{10}\text{Fn3}$. Связи, сконструированные в формате $\text{Fc}::\text{Fc}$ могут быть ковалентными или нековалентными. В дополнение, партнеры по димеризации или мультимеризации, отличные от Fc , как, например, другие неиммуноглобулиновые каркасные группировки и/или антигенсвязывающие группировки на основе иммуноглобулинов, могут быть использованы в гибридах, таких как гибриды $^{10}\text{Fn3}$, для создания подобных структур более высокого порядка. Другие примеры мультимеров включают отдельные переменные домены, описанные здесь.

В определенных примерах ковалентно связанные мультимеры могут быть образованы конструированием слитых генов, кодирующих мультимер, или, альтернативно, конструированием кодонов для цистеиновых остатков в последовательностях мономеров, и делая возможным образование дисульфидных связей между продуктами экспрессии. Нековалентно связанные мультимеры могут также быть образованы множеством методик. Они включают введение в последовательности мономеров кодонов, соответствующих положительно и/или отрицательно заряженным остаткам и возможность взаимодействия между этими остатками в продуктах экспрессии (и, таким образом, между мономерами). Этот способ может быть упрощен использованием преимуществы заряженных остатков, присутствующих в мономерной субъединице естественным образом, например, отрицательно заряженных остатков фибронектина. Другие способы создания нековалентно связанных композиций, содержащих фибронектиновые каркасные полипептиды, состоит во введении в ген мономера (например, N- или C-концы) кодирующих последовательностей белков или белковых доменов, о которых известно, что они взаимодействуют друг с другом. Такие белки или белковые домены включают мотивы спираль-спираль, мотивы лейциновая застежка-молния или любые из множества белковых субъединиц (или их фрагментов), о которых известно, что они управляют образованием димеров или мультимеров более высокого порядка.

Фибронектиноподобные молекулы

Хотя $^{10}\text{Fn3}$ является предпочтительным каркасом для образования имитаторов антител, в молекулах, описанных здесь, $^{10}\text{Fn3}$ может быть заменен другими молекулами. Они включают, без ограничения, модули человеческого фибронектина $^1\text{Fn3-}^9\text{Fn3}$ и $^{11}\text{Fn3-}^{17}\text{Fn3}$, а также родственные модули Fn3 от животных, не являющихся людьми, и прокариот. В дополнение, могут также быть использованы модули Fn3 от других белков с последовательностями, гомологичными последовательности $^{10}\text{Fn3}$, таких

как тенащины и ундулины. Другие типичные каркасы, имеющие иммуноглобулиноподобные конформации (но с последовательностями, неродственными домену V_H), включают N-кадгерин, ICAM-2, титин, рецептор GCSF, цитокиновый рецептор, ингибитор гликозидазы, E-кадгерин и антибиотик-хромопротейн. Другие домены с родственными структурами могут иметь происхождение от миелиновой мембранной молекулы адгезии P0, CD8, CD4, CD2, MHC I класса, рецептора T-клеточного антигена, CD1, C2 и домены I-set VCAM-1, иммуноглобулинового домена I-set миозинсвязывающего белка C, иммуноглобулинового домена I-set миозинсвязывающего белка H, иммуноглобулинового домена I-set телокина, NCAM, твитчина, нейроглиана, рецептора гормона роста, рецептора эритропоэтина, рецептора пролактина, рецептора GC-SF, рецептор гамма-интерферона, β -галактозидазы/гликуронидазы, β -гликуронидазы и трансглутаминазы. Альтернативно, может быть использован любой другой белок, содержащий одну или более иммуноглобулиноподобные конформации. Такие белки могут быть идентифицированы, например, с применением программы SCOP (Murzin et al., *J. Mol. Biol.* 247:536 (1995); Lo Conte et al., *Nucleic Acids Res.* 25:257 (2000)).

В целом, любая молекула, демонстрирующая структурное родство с доменом V_H (как определено, например, с применением компьютерной программы SCOP, указанной выше), может быть использована в качестве неиммуноглобулинового каркаса. Такие молекулы могут, подобно фибронектину, содержать три петли на N-концевом полюсе молекулы и три петли на C-концевом полюсе, каждая из которых может быть рандомизирована для создания разнородных библиотек; альтернативно, могут быть использованы более крупные домены, имеющие большее число петель, при условии, что несколько таких поверхностных рандомизируемых петель расположены достаточно близко в пространстве таким образом, что они могут участвовать в связывании антигена. Примеры полипептидов, обладающих более чем тремя петлями, расположенными близко друг к другу, включают рецептор T-клеточного антигена и супероксиддисмутазу, каждый из которых имеет четыре петли, которые могут быть рандомизированы; и димер Fn3, домены тканевого фактора и домены рецептора цитокинов, каждый из которых имеет три группы из двух сходных доменов, где три рандомизируемые петли являются частью двух доменов (что дает в общей сложности шесть петель).

В еще одной другой альтернативе любой белок, имеющий переменные петли, расположенные достаточно близко в пространстве может быть использован для получения связывающего белка-кандидата. Например, могут быть использованы крупные белки, имеющие пространственно взаимосвязанные контактирующие с растворителем петли, даже если они не являются структурно родственными иммуноглобулиноподобной конформации. Типичные белки включают, без ограничения, цитохром F, зеленый флюоресцентный белок, GroEl и тауматин. Петли, представленные на этих белках, могут быть рандомизированы и белки с наилучшим связыванием могут быть селектированы из рандомизированной библиотеки, как описано здесь, например, в примере 1. Ввиду их размера могут быть получены молекулы, демонстрирующие антигенсвязывающую поверхность, значительно большую чем обнаруживаемая при взаимодействии антитело-антиген. Другие применимые каркасы такого типа могут также быть идентифицированы с применением программы SCOP (Murzin et al., *J. Mol. Biol.* 247: 536 (1995)) для просмотра белков-кандидатов, имеющих несколько петель, в частности, петель, расположенных среди параллельных бета-складчатостей или нескольких альфа-спиралей.

Модули от различных организмов и исходных белков могут быть наиболее подходящими для различных применений. Например, при разработке фибронектинового каркасного полипептида по изобретению может быть наиболее желательным образовать такой белок из фибронектина или фибронектиноподобной молекулы, естественной для организма, для которого предназначено лекарственное средство. Наоборот, организм, являющийся источником происхождения, имеет меньшее значение или вовсе не имеет значения для фибронектиновых каркасов, предназначенных для использования *in vitro* применениях, как, например, в качестве диагностических средств или в качестве реагентов для исследований.

Для любых из этих молекул могут быть образованы и использованы библиотеки для селекции связывающих белков любым из способов, описанных здесь.

Направленная эволюция связывающих белков на основе каркасов

Неиммуноглобулиновые каркасы, описанные здесь, могут быть использованы в любой методике образования новых или улучшенных связывающих белков. В одном конкретном примере мишень для связывания (например, сывороточный альбумин) иммобилизируют на твердой подложке, такой как смола колонки или лунка титрационного микропланшета, и мишень приводят в контакт с библиотекой связывающих белков-кандидатов на основе неиммуноглобулиновых каркасов. Такая библиотека может состоять из клонов с фибронектиновым каркасом, таких как клоны $^{10}\text{Fn3}$, конструированные из каркаса нативного $^{10}\text{Fn3}$ ($^{10}\text{Fn3}$ дикого типа) посредством рандомизации последовательности и/или длины CDR-подобных петель $^{10}\text{Fn3}$. Если желательно, эта библиотека может представлять собой слитую РНК-белковую библиотеку, образованную, например, методиками, описанными в Szostak et al., *US Ser. No.* 09/007005 и *Ser. No.* 09/247190; Szostak et al., *WO* 98/31700; и Roberts & Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997), vol. 94, p. 12297-12302. Альтернативно, она может представлять собой ДНК-белковую библиотеку (например, как описано в Lohse, *DNA-Protein Fusions and Uses Thereof*, *US Ser. No.*

60/110549, US Ser. No. 09/459190, WO 00/32823). Слитую библиотеку инкубируют с иммобилизированной мишенью, подложку промывают для удаления неспецифических связывающих агентов и агентов с наиболее прочным связыванием элюируют в очень строгих условиях и подвергают ПЦР для получения информации о последовательности или для создания новой библиотеки связывающих агентов, которая может быть использована для повторения способа селекции, с или без дополнительного мутагенеза последовательности. Несколько раундов селекции могут быть проведены до получения связывающих агентов с достаточной аффинностью в отношении антигена (например, сывороточного альбумина).

В одном конкретном примере каркас $^{10}\text{Fn3}$ может быть использован как мишень для селекции. Например, если необходим белок, связывающий определенную пептидную последовательность (например, сывороточный альбумин), представленную в петле из десяти остатков, конструируют отдельный клон $^{10}\text{Fn3}$, в котором длина одной из петель составляет десять остатков и последовательность соответствует желаемой последовательности. Новый клон экспрессируют *in vivo* и очищают, и затем иммобилизируют на твердой подложке. Затем создают условия для взаимодействия слитой РНК-белковой библиотеки на основе подходящего каркаса с подложкой, которую затем промывают и желаемые молекулы элюируют и повторно селекционируют, как описано выше.

Сходным образом, каркасы, описанные здесь, например, каркас $^{10}\text{Fn3}$, могут быть использованы для поиска природных белков, взаимодействующих с пептидной последовательностью, представленной на каркасе, например, в петле $^{10}\text{Fn3}$. Каркасный белок, такой как белок $^{10}\text{Fn3}$, иммобилизируют, как описано выше, проводят скрининг слитой РНК-белковой библиотеки на агенты, связывающие представленную петлю. Связывающие агенты улучшают посредством нескольких раундов селекции и идентифицируют посредством секвенирования ДНК.

В дополнение, в описанных выше способах РНК-белковые библиотеки хотя и являются типичными библиотеками для направленной эволюции, любой тип библиотеки на основе каркаса может быть использован в способах селекции по изобретению.

Применение фибронектиновых каркасных полипептидов

Фибронектиновые каркасные полипептиды, описанные здесь, могут быть разработаны для связывания сывороточного альбумина или любого интересующего антигена. Такие белки с фибронектиновым каркасом имеют термодинамические свойства, превосходящие термодинамические свойства природных антител, и могут быть быстро разработаны *in vitro*. Соответственно, эти фибронектиновые каркасные полипептиды могут быть использованы для получения связывающих доменов для применения в областях исследований, лечения и диагностики.

Мутагенное созревание аффинности

Селекции, описанные здесь, можно также комбинировать с мутагенезом после всех или части стадий селекции для дополнительного увеличения разнообразия в библиотеке. В способах созревания аффинности может быть применена, например, ошибочно направленная ПЦР (Cadwell and Joyce, PCR Methods Appl 2:28 (1992)) или альтернативные формы случайного мутагенеза, NNK-мутагенез, как описано ниже, "look through" мутагенез (где фибронектиновые каркасные полипептиды с перенесенными CDR конструируют для оптимизации связывания антигена использованием встречающегося в природе разнообразия CDR, см, например, WO 06/023144, включенную сюда посредством ссылки) и/или другой принятый в данной области техники способ мутагенеза для создания разнообразия полипептидов, который комбинируют с одним или более раундами селекции на аффинность связывания антигена.

Любые из каркасных белков, описанных ниже, можно комбинировать друг с другом для использования, например, в композициях лигандов с двойной специфичностью по настоящему изобретению. Например, CDR могут быть перенесены на каркас CTLA-4 и использованы совместно с доменами V_H или V_L антитела для образования мультивалентного лиганда. Сходным образом можно комбинировать фибронектиновые, липокалиновые каркасы, каркасы аффител и другие каркасы.

Все публикации, упомянутые в настоящем описании, и ссылки, приведенные в указанных публикациях, включены сюда посредством ссылки. Различные модификации и вариации описанных способов и систем по изобретению будут очевидны специалистам в данной области техники без выхода за рамки объема и сущности изобретения. Несмотря на то что изобретение было описано в связи с конкретными предпочтительными воплощениями, следует понимать, что заявленное изобретение не следует чрезмерно ограничивать такими конкретными воплощениями. Действительно, подразумевают, что различные модификации описанных способов воплощения изобретения, очевидные специалистам в молекулярной биологии или родственных областях, входят в объем следующей формулы изобретения.

Приложение 1.

Полипептиды, увеличивающие период полувыведения in vivo

Альфа-1-гликопротеин (орозомукоид) (AAG).
 Альфа-1-антихимотрипсин (ACT).
 Альфа-1-антитрипсин (AAT).
 Альфа-1-микроглобулин (белок HC) (AIM).
 Альфа-2-макроглобулин (A2M).
 Антиромбин III (AT III).
 Аполипопротеин A-1 (ApoA-1).
 Аполипопротеин B (Apo B).
 Бета-2-микроглобулин (B2M).
 Церулоплазмин (Cp).
 Компонент комплемента (C3).
 Компонент комплемента (C4).
 Ингибитор эстераз C1 (C1 INH).
 С-реактивный белок (CRP).
 Цистатин C (Cys C).
 Ферритин (FER).
 Фибриноген (FIB).
 Фибронектин (FN).
 Гаптоглобин (Hp).
 Гемопексин (HPX).
 Иммуноглобулин A (IgA).
 Иммуноглобулин D (IgD).
 Иммуноглобулин E (IgE).
 Иммуноглобулин G (IgG).
 Иммуноглобулин M (IgM).
 Легкие цепи иммуноглобулинов (каппа/лямбда).
 Липопротеин (a) [Lp(a)].
 Маннозасвязывающий белок (MBP).
 Миоглобин (Myo).
 Плазминоген (PSM).
 Преальбумин (транстиретин) (PAL).
 Ретинолсвязывающий белок (RBP).
 Ревматоидный фактор (RF).
 Сывороточный амилоид A (SAA).
 Растворимый рецептор трансферрина (sTfR).
 Трансферрин (Tf).

Приложение 2.

Образование пары	Терапевтически значимые ссылки
TNF-альфа/TGF-β	<ul style="list-style-type: none"> При введении в коленный сустав в модели коллаген-индуцированного артрита TGF-β и TNF существенно усиливали воспаление сустава. У мышей, не иммунизированных коллагеном, не оказывали эффекта.

TNF-альфа//IL-1	<ul style="list-style-type: none"> • TNF и IL-1 синергисты при увеите. • TNF и IL-1 синергисты при малярии (гипогликемия, NO). • TNF и IL-1 синергисты при индукции миграции полиморфноядерных (PMN) клеток при воспалении. • IL-1 и TNF синергисты при индукции инфильтрации PMN в брюшину. • IL-1 и TNF синергисты при индукции секреции IL-1 эндотелиальными клетками. Важно при воспалении . • IL-1 или TNF сами по себе индуцируют некоторую клеточную инфильтрацию в синовиальной оболочке коленного сустава. IL-1 индуцирует PMN, TNF – моноциты. Вместе они индуцируют более тяжелое воспаление за счет увеличения PMN. • Циркулирующая депрессорная миокардиальная субстанция (присутствует при сепсисе) представляет собой незначительное количество IL-1 и TNF, действующих синергично.
TNF-альфа/IL-2	<ul style="list-style-type: none"> • В наибольшей степени относится к синергичной активации Т-клеток-киллеров.
TNF-альфа /IL-3	<ul style="list-style-type: none"> • Синергизм интерлейкина-3 и фактора некроза опухоли-альфа в стимуляции клонального роста бластов при остром миелобластном лейкозе является результатом индукции синтеза вторичных гематопозитических цитокинов фактором некроза опухоли-альфа. • Cancer Res. 1992 Apr 15;52(8):2197-201.
TNF-альфа /IL-4	<ul style="list-style-type: none"> • IL-4 и TNF синергично действуют на клетки эндотелия для индукции экспрессии VCAM. Полагают, что они играют роль при астме. Аналогично для синовиальной оболочки – вовлечены в ревматоидный артрит (RA). • TNF и IL-4 синергично действуют для индукции экспрессии IL-6 в кератиноцитах. • Sustained elevated levels of VCAM-1 in cultured fibroblast-like synoviocytes can be achieved by TNF-alpha in combination

	with either IL-4 or IL-13 through increased mRNA stability. <i>Am J Pathol.</i> 1999 Apr;154(4):1149-58.
TNF-альфа /IL-5	• Relationship between the tumor necrosis factor system and the serum interleukin-4, interleukin-5, interleukin-8, eosinophil cationic protein, and immunoglobulin E levels in the bronchial hyperreactivity of adults and their children. <i>Allergy Asthma Proc.</i> 2003 Mar-Apr;24(2):111-8.
TNF-альфа /IL-6	• TNF and IL-6 are potent growth factors for OH-2, a novel human myeloma cell line. <i>Eur J Haematol.</i> 1994 Jul;53(1):31-7.
TNF-альфа /IL-8	• TNF и IL-8 синергично действовали на PMN с активацией тромбоцитов. Вовлечены в острый респираторный дистресс-синдром. • См. IL-5/TNF (астма). Synergism between interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha for neutrophil-mediated platelet activation. <i>Eur Cytokine Netw.</i> 1994 Sep-Oct;5(5):455-60. (респираторный дистресс-синдром взрослых (ARDS)).
TNF-альфа /IL-9	
TNF-альфа /IL-10	• IL-10 индуцирует и синергично действует с TNF при индукции экспрессии ВИЧ в хронически инфицированных Т-клетках.
TNF-альфа /IL-11	• Cytokines synergistically induce osteoclast differentiation: support by immortalized or normal calvarial cells. <i>Am J Physiol Cell Physiol.</i> 2002 Sep;283(3):C679-87. (Разрушение костей.)
TNF-альфа /IL-12	
TNF-альфа /IL-13	• Sustained elevated levels of VCAM-1 in cultured fibroblast-like synoviocytes can be achieved by TNF-alpha in combination with either IL-4 or IL-13 through increased mRNA stability. <i>Am J Pathol.</i> 1999 Apr;154(4):1149-58. • Interleukin-13 and tumour necrosis factor-alpha synergistically induce eotaxin production in human nasal fibroblasts. <i>Clin Exp Allergy.</i> 2000 Mar;30(3):348-55. • Interleukin-13 and tumour necrosis factor-alpha synergistically induce eotaxin production in human nasal fibroblasts. <i>Clin Exp</i>

	<p><i>Allergy</i>. 2000 Mar;30(3):348-55 (аллергическое воспаление)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Implications of serum TNF-beta and IL-13 in the treatment response of childhood nephrotic syndrome. <i>Cytokine</i>. 2003 Feb 7;21(3):155-9.
TNF-альфа /IL-14	<ul style="list-style-type: none"> • Effects of inhaled tumour necrosis factor alpha in subjects with mild asthma. <i>Thorax</i>. 2002 Sep;57(9):774-8.
TNF-альфа /IL-15	<ul style="list-style-type: none"> • Effects of inhaled tumour necrosis factor alpha in subjects with mild asthma. <i>Thorax</i>. 2002 Sep;57(9):774-8.
TNF-альфа /IL-16	<ul style="list-style-type: none"> • Tumor necrosis factor-alpha-induced synthesis of interleukin-16 in airway epithelial cells: priming for serotonin stimulation. <i>Am J Respir Cell Mol Biol</i>. 2003 Mar;28(3):354-62. (Воспаление дыхательных путей) • Correlation of circulating interleukin 16 with proinflammatory cytokines in patients with rheumatoid arthritis. <i>Rheumatology (Oxford)</i>. 2001 Apr;40(4):474-5. Краткое изложение недоступно. • Interleukin 16 is up-regulated in Crohn's disease and participates in TNBS colitis in mice. <i>Gastroenterology</i>. 2000 Oct;119(4):972-82.
TNF-альфа /IL-17	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition of interleukin-17 prevents the development of arthritis in vaccinated mice challenged with <i>Borrelia burgdorferi</i>. <i>Infect Immun</i>. 2003 Jun;71(6):3437-42. • Interleukin 17 synergises with tumour necrosis factor alpha to induce cartilage destruction <i>in vitro</i>. <i>Ann Rheum Dis</i>. 2002 Oct;61(10):870-6. • A role of GM-CSF in the accumulation of neutrophils in the airways caused by IL-17 and TNF-alpha. <i>Eur Respir J</i>. 2003 Mar;21(3):387-93. (Воспаление дыхательных путей) • Abstract Interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-17 synergistically up-regulate nitric oxide and prostaglandin E2 production in explants of human osteoarthritic knee menisci. <i>Arthritis Rheum</i>. 2001 Sep;44(9):2078-83.
TNF-альфа /IL-18	<ul style="list-style-type: none"> • Association of interleukin-18 expression with enhanced levels

	<p>of both interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha in knee synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. <i>Arthritis Rheum.</i> 2003 Feb;48(2):339-47.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Abstract Elevated levels of interleukin-18 and tumor necrosis factor-alpha in serum of patients with type 2 diabetes mellitus: relationship with diabetic nephropathy. <i>Metabolism.</i> 2003 May;52(5):605-8.
TNF-альфа /IL-19	<ul style="list-style-type: none"> • Abstract IL-19 induces production of IL-6 and TNF-alpha and results in cell apoptosis through TNF-alpha. <i>J Immunol.</i> 2002 Oct 15;169(8):4288-97.
TNF-альфа /IL-20	<ul style="list-style-type: none"> • Abstract Cytokines: IL-20 - a new effector in skin inflammation. <i>Curr Biol.</i> 2001 Jul 10;11(13):R531-4
TNF-альфа /Complement	<ul style="list-style-type: none"> • Inflammation and coagulation: implications for the septic patient. <i>Clin Infect Dis.</i> 2003 May 15;36(10):1259-65. Epub 2003 May 08. Обзор .
TNF-альфа /IFN- γ	<ul style="list-style-type: none"> • Индукция МНС в мозге. • Синергизм при противовирусном ответе/индукция IFN-γ. • Активация нейтрофилов/респираторный взрыв. • Активация эндотелиальных клеток. • Токсичности, упомянутые при лечении пациентов TNF/IFN-γ в качестве противовирусной терапии. • Экспрессия фракталкина человеческими астроцитами. • Много публикаций о воспалительных ответах – то есть, LPS, также активация макрофагов. • Антитела против TNF и против IFN-γ синергично защищают мышей от летальной эндотоксемии.
TGF- β /IL-1	<ul style="list-style-type: none"> • Синтез простагландинов остеобластами. • Образование IL-6 эпителиальными клетками кишечника (модель воспаления). • Стимулирует IL-11 и IL-6 в фибробластах легких (модель воспаления). • Образование IL-6 и IL-8 в сетчатке.

TGF- β /IL-6	<ul style="list-style-type: none"> • Пролиферация хондросаркомы.
IL-1/IL-2	<ul style="list-style-type: none"> • Активация В-клеток. • Активация LAK-клеток. • Активация Т-клеток. • IL-1 synergy with IL-2 in the generation of lymphokine activated killer cells is mediated by TNF-alpha and beta (lymphotoxin). <i>Cytokine</i>. 1992 Nov;4(6):479-87.
IL-1/IL-3	
IL-1/IL-4	<ul style="list-style-type: none"> • Активация В-клеток. • IL-4 индуцирует экспрессию IL-1 при активации эндотелиальных клеток.
IL-1/IL-5	
IL-1/IL-6	<ul style="list-style-type: none"> • Активация В-клеток. • Активация Т-клеток (может замещать вспомогательные клетки). • IL-1 индуцирует экспрессию IL-6. • Экспрессия С3 и сывороточного амилоида (ответ острой фазы). • Экспрессия ВИЧ. • Распад коллагена хряща.
IL-1/IL-7	<ul style="list-style-type: none"> • IL-7 is requisite for IL-1-induced thymocyte proliferation. Involvement of IL-7 in the synergistic effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or tumor necrosis factor with IL-1. <i>J Immunol</i>. 1992 Jan 1;148(1):99-105.
IL-1/IL-8	
IL-1/IL-10	
IL-1/IL-11	<ul style="list-style-type: none"> • Cytokines synergistically induce osteoclast differentiation: support by immortalized or normal calvarial cells. <i>Am J Physiol Cell Physiol</i>. 2002 Sep;283(3):C679-87. (Разрушение кости)
IL-1/IL-16	<ul style="list-style-type: none"> • Correlation of circulating interleukin 16 with proinflammatory cytokines in patients with rheumatoid arthritis. <i>Rheumatology (Oxford)</i>. 2001 Apr;40(4):474-5. Краткое изложение недоступно.
IL-1/IL-17	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition of interleukin-17 prevents the development of arthritis in

	<p>vaccinated mice challenged with <i>Borrelia burgdorferi</i>. <i>Infect Immun.</i> 2003 Jun;71(6):3437-42.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Contribution of interleukin 17 to human cartilage degradation and synovial inflammation in osteoarthritis. <i>Osteoarthritis Cartilage.</i> 2002 Oct;10(10):799-807. • Abstract Interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-17 synergistically up-regulate nitric oxide and prostaglandin E2 production in explants of human osteoarthritic knee menisci. <i>Arthritis Rheum.</i> 2001 Sep;44(9):2078-83.
IL-1/IL-18	<ul style="list-style-type: none"> • Association of interleukin-18 expression with enhanced levels of both interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha in knee synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. <i>Arthritis Rheum.</i> 2003 Feb;48(2):339-47.
IL-1/IFN-g	
IL-2/IL-3	<ul style="list-style-type: none"> • Пролиферация Т-клеток. • Пролиферация В-клеток.
IL-2/IL-4	<ul style="list-style-type: none"> • Пролиферация Т-клеток. • Пролиферация В-клеток. • (selectively inducing activation of CD8 and NK lymphocytes)IL-2R beta agonist P1-30 acts in synergy with IL-2, IL-4, IL-9, and IL-15: biological and molecular effects. <i>J Immunol.</i> 2000 Oct 15;165(8):4312-8.
IL-2/IL-5	<ul style="list-style-type: none"> • Пролиферация В-клеток/секрецию Ig • IL-5 индуцирует рецепторы IL-2 на В-клетках
IL-2/IL-6	<ul style="list-style-type: none"> • Развитие цитотоксических Т-клеток
IL-2/IL-7	
IL-2/IL-9	<ul style="list-style-type: none"> • См. IL-2/IL-4 (НК-клетки)
IL-2/IL-10	<ul style="list-style-type: none"> • Активация В-клеток
IL-2/IL-12	<ul style="list-style-type: none"> • IL-12 synergizes with IL-2 to induce lymphokine-activated cytotoxicity and perforin and granzyme gene expression in fresh human NK cells. <i>Cell Immunol.</i> 1995 Oct 1;165(1):33-43. (активация Т-клеток)
IL-2/IL-15	<ul style="list-style-type: none"> • См. IL-2/IL-4 (НК-клетки)

	<ul style="list-style-type: none"> • (T cell activation and proliferation) IL-15 and IL-2: a matter of life and death for T cells <i>in vivo</i>. <i>Nat Med</i>. 2001 Jan;7(1):114-8.
IL-2/IL-16	<ul style="list-style-type: none"> • Synergistic activation of CD4+ T cells by IL-16 and IL-2. <i>J Immunol</i>. 1998 Mar 1;160(5):2115-20.
IL-2/IL-17	<ul style="list-style-type: none"> • Evidence for the early involvement of interleukin 17 in human and experimental renal allograft rejection. <i>J Pathol</i>. 2002 Jul;197(3):322-32.
IL-2/IL-18	<ul style="list-style-type: none"> • Interleukin 18 (IL-18) in synergy with IL-2 induces lethal lung injury in mice: a potential role for cytokines, chemokines, and natural killer cells in the pathogenesis of interstitial pneumonia. <i>Blood</i>. 2002 Feb 15;99(4):1289-98.
IL-2/TGF- β	<ul style="list-style-type: none"> • Control of CD4 effector fate: transforming growth factor beta 1 and interleukin 2 synergize to prevent apoptosis and promote effector expansion. <i>J Exp Med</i>. 1995 Sep 1;182(3):699-709.
IL-2/IFN- \square	<ul style="list-style-type: none"> • Секреция Ig В-клетками • IL-2 индуцирует экспрессию IFN-γ Т-клетками
IL-2/IFN- α/β	<ul style="list-style-type: none"> • Нет
IL-3/IL-4	<ul style="list-style-type: none"> • Синергизм при росте тучных клеток • Synergistic effects of IL-4 and either GM-CSF or IL-3 on the induction of CD23 expression by human monocytes: regulatory effects of IFN-alpha and IFN-gamma. <i>Cytokine</i>. 1994 Jul;6(4):407-13.
IL-3/IL-5	
IL-3/IL-6	
IL-3/IFN- γ	<ul style="list-style-type: none"> • IL-4 and IFN-gamma synergistically increase total polymeric IgA receptor levels in human intestinal epithelial cells. Role of protein tyrosine kinases. <i>J Immunol</i>. 1996 Jun 15;156(12):4807-14.
IL-3/GM-CSF	<ul style="list-style-type: none"> • Differential regulation of human eosinophil IL-3, IL-5, and GM-CSF receptor alpha-chain expression by cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF down-regulate IL-5 receptor alpha expression with loss of IL-5 responsiveness, but up-regulate IL-3 receptor alpha expression. <i>J Immunol</i>. 2003 Jun 1;170(11):5359-66. (аллергическое воспаление)

IL-4/IL-2	<ul style="list-style-type: none"> • IL-4 synergistically enhances both IL-2- and IL-12-induced IFN-γ expression in murine NK cells. <i>Blood</i>. 2003 Mar 13 [Epub ahead of print]
IL-4/IL-5	<ul style="list-style-type: none"> • Enhanced mast cell histamine etc. secretion in response to IgE A Th2-like cytokine response is involved in bullous pemphigoid. the role of IL-4 and IL-5 in the pathogenesis of the disease. <i>Int J Immunopathol Pharmacol</i>. 1999 May-Aug;12(2):55-61.
IL-4/IL-6	
IL-4/IL-10	
IL-4/IL-11	<ul style="list-style-type: none"> • Synergistic interactions between interleukin-11 and interleukin-4 in support of proliferation of primitive hematopoietic progenitors of mice. <i>Blood</i>. 1991 Sep 15;78(6):1448-51.
IL-4/IL-12	<ul style="list-style-type: none"> • Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-γ production by dendritic cells. <i>J Immunol</i>. 2000 Jan 1;164(1):64-71. (увеличение Th1/Th2-дифференцировки) • IL-4 synergistically enhances both IL-2- and IL-12-induced IFN-γ expression in murine NK cells. <i>Blood</i>. 2003 Mar 13 [Epub ahead of print]
IL-4/IL-13	<ul style="list-style-type: none"> • Abstract Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps. <i>Science</i>. 2003 Jun 6;300(5625):1527-8. (allergy, asthma) • Inhibition of the IL-4/IL-13 receptor system prevents allergic sensitization without affecting established allergy in a mouse model for allergic asthma. <i>J Allergy Clin Immunol</i>. 2003 Jun;111(6):1361-1369.
IL-4/IL-16	<ul style="list-style-type: none"> • (астма) Interleukin (IL)-4/IL-9 and exogenous IL-16 induce IL-16 production by BEAS-2B cells, a bronchial epithelial cell line. <i>Cell Immunol</i>. 2001 Feb 1;207(2):75-80
IL-4/IL-17	<ul style="list-style-type: none"> • Interleukin (IL)-4 and IL-17 synergistically stimulate IL-6 secretion in human colonic myofibroblasts. <i>Int J Mol Med</i>. 2002 Nov;10(5):631-4. (Gut inflammation)
IL-4/IL-24	<ul style="list-style-type: none"> • IL-24 is expressed by rat and human macrophages. <i>Immunobiology</i>. 2002 Jul;205(3):321-34.
IL-4/IL-25	<ul style="list-style-type: none"> • Abstract New IL-17 family members promote Th1 or Th2

	<p>responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. <i>J Immunol.</i> 2002 Jul 1;169(1):443-53. (allergic inflammation)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Abstract Mast cells produce interleukin-25 upon Fcepsilon RI-mediated activation. <i>Blood.</i> 2003 May 1;101(9):3594-6. Epub 2003 Jan 02. (allergic inflammation)
IL-4/IFN- γ	<ul style="list-style-type: none"> • Abstract Interleukin 4 induces interleukin 6 production by endothelial cells: synergy with interferon-gamma. <i>Eur J Immunol.</i> 1991 Jan;21(1):97-101.
IL-4/SCF	<ul style="list-style-type: none"> • Regulation of human intestinal mast cells by stem cell factor and IL-4. <i>Immunol Rev.</i> 2001 Feb;179:57-60. Review.
IL-5/IL-3	<ul style="list-style-type: none"> • Differential regulation of human eosinophil IL-3, IL-5, and GM-CSF receptor alpha-chain expression by cytokines: IL-3, IL-5, and GM-CSF down-regulate IL-5 receptor alpha expression with loss of IL-5 responsiveness, but up-regulate IL-3 receptor alpha expression. <i>J Immunol.</i> 2003 Jun 1;170(11):5359-66. (Аллергическое воспаление, см. краткое изложение)
IL-5/IL-6	
IL-5/IL-13	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibition of allergic airways inflammation and airway hyperresponsiveness in mice by dexamethasone: role of eosinophils, IL-5, eotaxin, and IL-13. <i>J Allergy Clin Immunol.</i> 2003 May;111(5):1049-61.
IL-5/IL-17	<ul style="list-style-type: none"> • Interleukin-17 orchestrates the granulocyte influx into airways after allergen inhalation in a mouse model of allergic asthma. <i>Am J Respir Cell Mol Biol.</i> 2003 Jan;28(1):42-50.
IL-5/IL-25	<ul style="list-style-type: none"> • Abstract New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. <i>J Immunol.</i> 2002 Jul 1;169(1):443-53. (аллергическое воспаление) • Abstract Mast cells produce interleukin-25 upon Fcepsilon RI-mediated activation. <i>Blood.</i> 2003 May 1;101(9):3594-6. Epub 2003 Jan 02. (аллергическое воспаление)
IL-5/IFN- γ	
IL-5/GM-CSF	<ul style="list-style-type: none"> • Differential regulation of human eosinophil IL-3, IL-5, and GM-CSF receptor alpha-chain expression by cytokines: IL-3, IL-5, and GM-

	CSF down-regulate IL-5 receptor alpha expression with loss of IL-5 responsiveness, but up-regulate IL-3 receptor alpha expression. <i>J Immunol.</i> 2003 Jun 1; 170 (11):5359-66. (Аллергическое воспаление)
IL-6/IL-10	
IL-6/IL-11	
IL-6/IL-16	• Interleukin-16 stimulates the expression and production of pro-inflammatory cytokines by human monocytes. <i>Immunology.</i> 2000 May; 100 (1):63-9.
IL-6/IL-17	• Stimulation of airway mucin gene expression by interleukin (IL)-17 through IL-6 paracrine/autocrine loop. <i>J Biol Chem.</i> 2003 May 9; 278 (19):17036-43. Epub 2003 Mar 06. (воспаление дыхательных путей, астма)
IL-6/IL-19	• Abstract IL-19 induces production of IL-6 and TNF-alpha and results in cell apoptosis through TNF-alpha. <i>J Immunol.</i> 2002 Oct 15; 169 (8):4288-97.
IL-6/IFN-g	
IL-7/IL-2	• Interleukin 7 worsens graft-versus-host disease. <i>Blood.</i> 2002 Oct 1; 100 (7):2642-9.
IL-7/IL-12	• Synergistic effects of IL-7 and IL-12 on human T cell activation. <i>J Immunol.</i> 1995 May 15; 154 (10):5093-102.
IL-7/IL-15	• Interleukin-7 and interleukin-15 regulate the expression of the bcl-2 and c-myc genes in cutaneous T-cell lymphoma cells. <i>Blood.</i> 2001 Nov 1; 98 (9):2778-83. (фактор роста)
IL-8/IL-11	• Abnormal production of interleukin (IL)-11 and IL-8 in polycythaemia vera. <i>Cytokine.</i> 2002 Nov 21; 20 (4):178-83.
IL-8/IL-17	• The Role of IL-17 in Joint Destruction. <i>Drug News Perspect.</i> 2002 Jan; 15 (1):17-23. (артрит) • Abstract Interleukin-17 stimulates the expression of interleukin-8, growth-related oncogene-alpha, and granulocyte-colony-stimulating factor by human airway epithelial cells. <i>Am J Respir Cell Mol Biol.</i> 2002 Jun; 26 (6):748-53. (воспаление дыхательных путей)
IL-8/GSF	• Interleukin-8: an autocrine/paracrine growth factor for human

	hematopoietic progenitors acting in synergy with colony stimulating factor-1 to promote monocyte-macrophage growth and differentiation. <i>Exp Hematol.</i> 1999 Jan; 27 (1):28-36.
IL-8/VEGF	• Intracavitary VEGF, bFGF, IL-8, IL-12 levels in primary and recurrent malignant glioma. <i>J Neurooncol.</i> 2003 May; 62 (3):297-303.
IL-9/IL-4	• Anti-interleukin-9 antibody treatment inhibits airway inflammation and hyperreactivity in mouse asthma model. <i>Am J Respir Crit Care Med.</i> 2002 Aug 1; 166 (3):409-16.
IL-9/IL-5	• Pulmonary overexpression of IL-9 induces Th2 cytokine expression, leading to immune pathology. <i>J Clin Invest.</i> 2002 Jan; 109 (1):29-39. • Th2 cytokines and asthma. Interleukin-9 as a therapeutic target for asthma. <i>Respir Res.</i> 2001; 2 (2):80-4. Epub 2001 Feb 15. Review. Abstract Interleukin-9 enhances interleukin-5 receptor expression, differentiation, and survival of human eosinophils. <i>Blood.</i> 2000 Sep 15; 96 (6):2163-71 (актуа)
IL-9/IL-13	• Anti-interleukin-9 antibody treatment inhibits airway inflammation and hyperreactivity in mouse asthma model. <i>Am J Respir Crit Care Med.</i> 2002 Aug 1; 166 (3):409-16. • Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. <i>Nat Med.</i> 2002 Aug; 8 (8):885-9.
IL-9/IL-16	• См. IL-4/IL-16.
IL-10/IL-2	• The interplay of interleukin-10 (IL-10) and interleukin-2 (IL-2) in humoral immune responses: IL-10 synergizes with IL-2 to enhance responses of human B lymphocytes in a mechanism which is different from upregulation of CD25 expression. <i>Cell Immunol.</i> 1994 Sep; 157 (2):478-88.
IL-10/IL-12	
IL-10/TGF- β	• IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. <i>Eur J Immunol.</i> 2003 May; 33 (5):1205-14.

IL-10/FN- γ	
IL-11/IL-6	<ul style="list-style-type: none"> • Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. <i>Bone</i>. 2003 Jan;32(1):1-7. (резорбция кости при воспалении)
IL-11/IL-17	<ul style="list-style-type: none"> • Polarized <i>in vivo</i> expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions. <i>J Allergy Clin Immunol</i>. 2003 Apr;111(4):875-81. (аллергический дерматит) • IL-17 promotes bone erosion in murine collagen-induced arthritis through loss of the receptor activator of NF-kappa B ligand/osteoprotegerin balance. <i>J Immunol</i>. 2003 Mar 1;170(5):2655-62.
IL-11/TGF- β	<ul style="list-style-type: none"> • Polarized <i>in vivo</i> expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions. <i>J Allergy Clin Immunol</i>. 2003 Apr;111(4):875-81. (аллергический дерматит)
IL-12/IL-13	<ul style="list-style-type: none"> • Relationship of Interleukin-12 and Interleukin-13 imbalance with class-specific rheumatoid factors and anticardiolipin antibodies in systemic lupus erythematosus. <i>Clin Rheumatol</i>. 2003 May;22(2):107-11.
IL-12/IL-17	<ul style="list-style-type: none"> • Upregulation of interleukin-12 and -17 in active inflammatory bowel disease. <i>Scand J Gastroenterol</i>. 2003 Feb;38(2):180-5.
IL-12/IL-18	<ul style="list-style-type: none"> • Synergistic proliferation and activation of natural killer cells by interleukin 12 and interleukin 18. <i>Cytokine</i>. 1999 Nov;11(11):822-30. • Inflammatory Liver Steatosis Caused by IL-12 and IL-18. <i>J Interferon Cytokine Res</i>. 2003 Mar;23(3):155-62.
IL-12/IL-23	<ul style="list-style-type: none"> • Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. <i>Nature</i>. 2003 Feb 13;421(6924):744-8. • Abstract A unique role for IL-23 in promoting cellular immunity. <i>J Leukoc Biol</i>. 2003 Jan;73(1):49-56. Обзор.
IL-12/IL-27	<ul style="list-style-type: none"> • Abstract IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. <i>Immunity</i>. 2002 Jun;16(6):779-90.

IL-12/IFN- γ	• IL-12 индуцирует экспрессию IFN- γ В- и Т-клетками как часть иммунной стимуляции.
IL-13/IL-5	• См. IL-5/IL-13.
IL-13/IL-25	• Abstract New IL-17 family members promote Th1 or Th2 responses in the lung: in vivo function of the novel cytokine IL-25. <i>J Immunol.</i> 2002 Jul 1;169(1):443-53. (аллергическое воспаление) • Abstract Mast cells produce interleukin-25 upon Fcepsilon RI-mediated activation. <i>Blood.</i> 2003 May 1;101(9):3594-6. Epub 2003 Jan 02. (аллергическое воспаление)
IL-15/IL-13	• Differential expression of interleukins (IL)-13 and IL-15 in ectopic and eutopic endometrium of women with endometriosis and normal fertile women. <i>Am J Reprod Immunol.</i> 2003 Feb;49(2):75-83.
IL-15/IL-16	• IL-15 and IL-16 overexpression in cutaneous T-cell lymphomas: stage-dependent increase in mycosis fungoides progression. <i>Exp Dermatol.</i> 2000 Aug;9(4):248-51.
IL-15/IL-17	• Abstract IL-17, produced by lymphocytes and neutrophils, is necessary for lipopolysaccharide-induced airway neutrophilia: IL-15 as a possible trigger. <i>J Immunol.</i> 2003 Feb 15;170(4):2106-12. (воспаление дыхательных путей)
IL-15/IL-21	• IL-21 in Synergy with IL-15 or IL-18 Enhances IFN-gamma Production in Human NK and T Cells. <i>J Immunol.</i> 2003 Jun 1;170(11):5464-9.
IL-17/IL-23	• Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. <i>J Biol Chem.</i> 2003 Jan 17;278(3):1910-4. Epub 2002 Nov 03
IL-17/TGF- β	• Polarized in vivo expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions. <i>J Allergy Clin Immunol.</i> 2003 Apr;111(4):875-81. (аллергический дерматит)
IL-18/IL-12	• Synergistic proliferation and activation of natural killer cells by interleukin 12 and interleukin 18. <i>Cytokine.</i> 1999 Nov;11(11):822-30. • Abstract Inhibition of in vitro immunoglobulin production by IL-12 in murine chronic graft-vs.-host disease: synergism with IL-18. <i>Eur J Immunol.</i> 1998 Jun;28(6):2017-24.
IL-18/IL-21	• IL-21 in Synergy with IL-15 or IL-18 Enhances IFN-gamma Production in Human NK and T Cells. <i>J Immunol.</i> 2003 Jun 1;170(11):5464-9.
IL-18/TGF- β	• Interleukin 18 and transforming growth factor beta1 in the serum of patients with Graves' ophthalmopathy treated with corticosteroids. <i>Int Immunopharmacol.</i> 2003 Apr;3(4):549-52.
IL-18/IFN- γ	
Anti-TNF ALPHA/anti-CD4	Синергичный терапевтический эффект на мышей DBA/1 с артритом.

Приложение 3.

Онкологические комбинации

Мишень	Заболевание	Образует пару с
CD89*	Используют как рекрутера цитотоксических клеток	Все
CD19	В-клеточные лимфомы	HLA-DR CD5
HLA-DR	В-клеточные лимфомы	CD89 CD19 CD5
CD38	Множественная миелома	CD138 CD56 HLA-DR
CD138	Множественная миелома	CD38 CD56 HLA-DR
CD138	Рак легкого	CD56 CEA
CD33	Острая миелобластная лимфома	CD34 HLA-DR
CD56	Рак легкого	CD138

		CEA
CEA	Рак поджелудочной железы	Рецептор MET
VEGF	Рак поджелудочной железы	Рецептор MET
Рецептор VEGF	Рак поджелудочной железы	Рецептор MET
IL-13	Астма/воспаление легких	IL-4 IL-5 Эотаксин (эотаксины) MDC TARC TNF α IL-9 EGFR CD40L IL-25 MCP-1 TGF β
IL-4	Астма	IL-13 IL-5 Eotaxin(s) MDC TARC TNF α IL-9 EGFR CD40L IL-25 MCP-1 TGF β
Эотаксин	Астма	IL-5 Eotaxin-2 Eotaxin-3

EGFR	Злокачественные новообразования	HER2/neu HER3 HER4
HER2	Злокачественные новообразования	HER3 HER4
TNFR1	RA/болезнь Крона	IL-1R IL-6R IL-18R
TNFβ	RA/болезнь Крона	IL-1α/β IL-6 IL-18 ICAM-1 IL-15 IL-17
IL-1R	RA/болезнь Крона	IL-6R IL-18R
IL-18R	RA/болезнь Крона	IL-6R

Приложение 4.

Краткое изложение данных

МИШЕНЬ	dAb	Равновесная константа диссоциации ($K_d = K_{off}/K_{on}$)	K_{off}	IC50 для исследования с лигандом	ND50 для основанного на клетках исследования нейтрализации
TAR1	Мономеры TAR1	от 300 нМ до 5 пМ (то есть, от 3×10^{-7} до 5×10^{-12}), предпочтительно от 50 нМ до 20 пМ	от 5×10^{-1} to 1×10^{-7}	от 500нМ до 100пМ	от 500 нМ до 50 пМ
	Димеры TAR1	Как для мономера TAR1	Как для мономера TAR1	Как для мономера TAR1	Как для мономера TAR1
	Тримеры TAR1	Как для мономера TAR1	Как для мономера TAR1	Как для мономера TAR1	Как для мономера TAR1
	TAR1-5				
	TAR1-27				
	Мономер TAR1-5-19	30 нМ			
	Гомодимер TAR1-5-19			С линкером (Gly ₄ Ser) ₃ = 20 нМ С линкером (Gly ₄ Ser) ₅ = 2-30 нМ нМ	

				С линкером (Gly ₄ Ser) ₇ = 10 нм В формате Fab = 1 нМ	=3 нМ =15 нМ
	Гетеродимеры TAR1-5-19			С линкером (Gly ₄ Ser) _n TAR1-5-19 d2 = 2 нМ TAR1-5-19 d3 = 8 нМ TAR1-5-19 d4 = 2-5 нМ TAR1-5-19 d5 = 8 нМ В формате Fab TAR1-5-19CH d1CK = 6 нМ TAR1-5-19CK d1CH = 6 нМ TAR1-5-19CH d2CK = 8 нМ TAR1-5-19CH d3CK = 3 нМ	= 12 нМ = 10 нМ = 12 нМ
	Гетеродимеры TAR1-5			С линкером (Gly ₄ Ser) _n TAR1-5d1 = 30 нМ TAR1-5d2 = 50 нМ TAR1-5d3 = 300 нМ TAR1-5d4 = 3 нМ	
				TAR1-5d5 = 200 нМ TAR1-5d6 = 100 нМ В формате Fab TAR1-5CH d2CK = 30 нМ TAR1-5CK d3CH = 100 нМ	= 60 нМ
	Гомотример TAR1-5-19			0,3 нМ	3-10 нМ (например, 3 нМ)
TAR2	Мономеры TAR2	Как мономер TAR1	Как мономер TAR1	от 500 нМ до 100 пМ	от 500 нМ до 50 пМ
	TAR2-10				
	TAR2-5				
Сывороточный альбумин	Мономеры против SA	от 1 нМ до 500 мкМ, предпочтительно 100 нМ до 10 мкМ В формате с двойной специфичностью аффинность к мишени		от 1 нМ до 500 мкМ, предпочтительно 100 нМ до 10 мкМ В формате с двойной специфичностью аффинность к мишени	
		составляет от 1 до 100000 аффинности SA dAb аффинности, например, 1мкМ аффинность к SA		составляет от 1 до 100000 аффинности SA dAb аффинности, например, 1мкМ аффинность к SA	
	MSA-16	200 нМ			
	MSA-26	70 нМ			

Перечень последовательностей

<110> Клуб, Джаспер
 Джесперс, Лорен
 Томлинсон, Айан
 Холт, Люси
 Шон, Оливер

<120> Отдельные переменные домены антител против сывороточного альбумина

<130> 208039-2145

<140> 11/704,832
 <141> 2007-02-08

<150> PCT/GB05/002163
 <151> 2005-05-31

<150> 11/023,959
 <151> 2004-12-28

<150> 60/632,361
 <151> 2004-12-02

<150> 60/576,271
 <151> 2004-06-01

<150> PCT/GB03/002804
 <151> 2003-06-30

<150> GB 0230202.4
 <151> 2002-12-27

<150> PCT/GB02/03014
 <151> 2002-06-28

<160> 263

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 5
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 1
 Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 2
 <211> 40
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (6)..(40)
 <223> Может присутствовать или может не присутствовать

 <220>
 <223> Подробное описание замен и предпочтительных воплощений смотри в описании изобретения

 <400> 2
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30

 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 35 40

 <210> 3
 <211> 8
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(8)
 <223> Вариабельная аминокислота

 <400> 3
 Lys Val Glu Ile Lys Xaa Xaa Xaa
 1 5

 <210> 4
 <211> 8
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(8)
 <223> Вариабельная аминокислота

 <400> 4
 Lys Leu Glu Ile Lys Xaa Xaa Xaa
 1 5

 <210> 5
 <211> 8
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(8)
<223> Вариабельная аминокислота

<400> 5
Lys Val Asp Ile Lys Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 6
<211> 8
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(8)
<223> Вариабельная аминокислота

<400> 6
Arg Leu Glu Ile Lys Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 7
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(8)
<223> Вариабельная аминокислота

<400> 7
Glu Ile Lys Arg Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 8
<211> 8
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(8)
<223> Вариабельная аминокислота

<400> 8
Lys Val Asp Val Leu Xaa Xaa Xaa

1 5

<210> 9
<211> 8
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(8)
<223> Варибельная аминокислота

<400> 9
Lys Leu Asp Val Leu Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 10
<211> 8
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(8)
<223> Варибельная аминокислота

<400> 10
Gln Leu Asp Val Leu Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 11
<211> 8
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(8)
<223> Варибельная аминокислота

<400> 11
Val Thr Val Ser Ser Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 12
<211> 45
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(45)
 <223> Может присутствовать или может не присутствовать

<220>
 <223> Подробное описание замен и предпочтительных воплощений смотри в описании изобретения

<400> 12
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 35 40 45

<210> 13
 <211> 45
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(45)
 <223> Может присутствовать или может не присутствовать

<220>
 <223> Подробное описание замен и предпочтительных воплощений смотри в описании изобретения

<400> 13
 Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser
 1 5 10 15

Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser
 20 25 30

Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Ser Gly
 35 40 45

<210> 14
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 14
Ser Ser Ser Ala Ser Ala Ser Ser Ala
1 5

<210> 15
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 15
Gly Ser Pro Gly Ser Pro Gly
1 5

<210> 16
<211> 11
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 16
Ala Thr Thr Thr Gly Ser Ser Pro Gly Pro Thr
1 5 10

<210> 17
<211> 18
<212> ПРТ
<213> Неизвестный организм

<220>
<223> Описание неизвестного организма: Природный пептидный линкер

<400> 17
Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser
1 5 10 15

Leu Asp

<210> 18
<211> 35
<212> ПРТ
<213> Camelus dromedarius

<400> 18
Glu Pro Lys Ile Pro Gln Pro Gln Pro Lys Pro Gln Pro Gln Pro Gln
1 5 10 15

Pro Gln Pro Lys Pro Gln Pro Lys Pro Glu Pro Glu Cys Thr Cys Pro

20

25

30

Lys Cys Pro
35

<210> 19
<211> 12
<212> ПРТ
<213> Camelus dromedarius

<400> 19
Gly Thr Asn Glu Val Cys Lys Cys Pro Lys Cys Pro
1 5 10

<210> 20
<211> 15
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 20
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 21
<211> 25
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 21
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 22
<211> 35
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 22
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

20

25

30

Gly Gly Ser
35

<210> 23
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
праймер

<400> 23
cggccatggc gtcaacggac at 22

<210> 24
<211> 23
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
праймер

<400> 24
atgtgcgctc gagcgtttga ttt 23

<210> 25
<211> 15
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
пептид

<400> 25
Glu Pro Lys Ser Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10 15

<210> 26
<211> 50
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
пептид

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(50)
<223> Может присутствовать или может не присутствовать

<220>
<223> Подробное описание замен и предпочтительных воплощений смотри в описании
изобретения

<400> 26
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 35 40 45

Gly Ser
 50

<210> 27
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
 полинуклеотид

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(342)

<400> 27
 tgg agc gcg tgg acg gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tct ctg 48
 Trp Ser Ala Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 1 5 10 15
 tct gca tct gta gga gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag 96
 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
 20 25 30
 agc att gat agt tat tta cat tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc 144
 Ser Ile Asp Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 35 40 45
 cct aag ctc ctg atc tat agt gca tcc gag ttg caa agt ggg gtc cca 192
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Glu Leu Gln Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 tca cgt ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc 240
 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80
 agc agt ctg caa cct gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag gtt 288
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val
 85 90 95
 gtg tgg cgt cct ttt acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 336
 Val Trp Arg Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 cgg tgc taataaggat cgggc 357
 Arg Cys

<210> 28
 <211> 114
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

 <400> 28
 Trp Ser Ala Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu
 1 5 10 15

 Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln
 20 25 30

 Ser Ile Asp Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala
 35 40 45

 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Glu Leu Gln Ser Gly Val Pro
 50 55 60

 Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75 80

 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val
 85 90 95

 Val Trp Arg Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

 Arg Cys

<210> 29
 <211> 39
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

 <400> 29
 tggagcgcgt cgaaggacat ccagatgacc cagtctcca 39

<210> 30
 <211> 39
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический праймер

<400> 30
ttagcagccg gacccctatt agcaccgttt gatttccac

39

<210> 31
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 31
Ser Ser Tyr Leu Asn
1 5

<210> 32
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 32
Phe Lys Ser Leu Lys
1 5

<210> 33
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 33
Tyr Tyr His Leu Lys
1 5

<210> 34
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 34
Arg Arg Tyr Leu Lys
1 5

<210> 35
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 35

Tyr Asn Trp Leu Lys
1 5

<210> 36

<211> 5

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 36

Leu Trp His Leu Arg
1 5

<210> 37

<211> 5

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 37

Phe Arg Tyr Leu Ala
1 5

<210> 38

<211> 5

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 38

Phe Tyr His Leu Ala
1 5

<210> 39

<211> 5

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 39

Ile Trp His Leu Asn
1 5

<210> 40
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 40
Tyr Arg Tyr Leu Arg
1 5

<210> 41
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 41
Leu Lys Tyr Leu Lys
1 5

<210> 42
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 42
Leu Arg Tyr Leu Arg
1 5

<210> 43
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 43
Leu Arg Ser Leu Lys
1 5

<210> 44
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 44
Phe Arg His Leu Lys
1 5

<210> 45
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 45
Arg Lys Tyr Leu Arg
1 5

<210> 46
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 46
Arg Arg Tyr Leu Asn
1 5

<210> 47
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 47
Ile Lys His Leu Lys
1 5

<210> 48
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 48
Tyr Lys His Leu Lys
1 5

<210> 49
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Вариабельная аминокислота

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Вариабельная аминокислота

<400> 49
Xaa Ala Ser Xaa Leu Gln Ser
1 5

<210> 50
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 50
Arg Ala Ser Pro Leu Gln Ser
1 5

<210> 51
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 51
Asn Ala Ser Tyr Leu Gln Ser
1 5

<210> 52
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 52
Lys Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

<210> 53
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 53
Gln Ala Ser Val Leu Gln Ser
1 5

<210> 54
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 54
Arg Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 55
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 55
His Ala Ser Leu Leu Gln Ser
1 5

<210> 56
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 56
His Ala Ser His Leu Gln Ser
1 5

<210> 57
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 57
Pro Ala Ser Lys Leu Gln Ser
1 5

<210> 58
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 58
Arg Ala Ser Arg Leu Gln Ser
1 5

<210> 59
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 59
Lys Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 60
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 60
Asn Ala Ser His Leu Gln Ser
1 5

<210> 61
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 61
Lys Ala Ser Trp Leu Gln Ser
1 5

<210> 62
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 62
Ala Ala Ser Arg Leu Gln Ser
1 5

<210> 63
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 63
Thr Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 64
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 64
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 65
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 65
Gly Ala Ser Arg Leu Gln Ser
1 5

<210> 66
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(6)
<223> Вариабельная аминокислота

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Вариабельная аминокислота

<400> 66
Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr
1 5

<210> 67
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 67
Gln Gln Thr Tyr Ser Val Pro Pro Thr
1 5

<210> 68
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 68
Gln Gln Thr Tyr Arg Ile Pro Pro Thr
1 5

<210> 69
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 69
Gln Gln Val Val Tyr Trp Pro Val Thr
1 5

<210> 70
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 70

Gln Gln Val Arg Lys Val Pro Arg Thr
1 5

<210> 71

<211> 9

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 71

Gln Gln Gly Leu Tyr Pro Pro Ile Thr
1 5

<210> 72

<211> 9

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 72

Gln Gln Asn Val Val Ile Pro Arg Thr
1 5

<210> 73

<211> 9

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 73

Gln Gln Ser Ala Val Tyr Pro Lys Thr
1 5

<210> 74

<211> 9

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 74

Gln Gln Arg Leu Leu Tyr Pro Lys Thr
1 5

<210> 75
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 75
Gln Gln Arg Ala Arg Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 76
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 76
Gln Gln Val Ala Arg Val Pro Arg Thr
1 5

<210> 77
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 77
Gln Gln Tyr Val Gly Tyr Pro Arg Thr
1 5

<210> 78
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 78
Gln Gln Thr Thr Tyr Tyr Pro Ile Thr
1 5

<210> 79
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 79

Gln Gln Val Leu Tyr Tyr Pro Gln Thr
1 5

<210> 80

<211> 9

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 80

Gln Gln Val Val Tyr Trp Pro Ala Thr
1 5

<210> 81

<211> 9

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 81

Gln Gln Val Ala Leu Tyr Pro Lys Thr
1 5

<210> 82

<211> 9

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 82

Gln Gln Asn Leu Phe Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 83

<211> 9

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 83

Gln Gln Met Leu Phe Tyr Pro Lys Thr
1 5

<210> 84

<211> 9

<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 84
Gln Gln Gly Ala Arg Trp Pro Gln Thr
1 5

<210> 85
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 85
Gln Gln Val Gly Arg Tyr Pro Lys Thr
1 5

<210> 86
<211> 6
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 86
Trp Val Tyr Gln Met Asp
1 5

<210> 87
<211> 6
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 87
Trp Ser Tyr Gln Met Thr
1 5

<210> 88
<211> 17
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Вариабельная аминокислота

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(5)
 <223> Вариабельная аминокислота

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(8)
 <223> Вариабельная аминокислота

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Вариабельная аминокислота

<400> 88
 Xaa Ile Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Thr Xaa Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 89
 <211> 17
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 89
 Ser Ile Ser Ala Phe Gly Ala Lys Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 90
 <211> 17
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 90
 Ser Ile Ser Ser Phe Gly Ser Ser Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 91
 <211> 7
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 91
 Leu Ser Gly Lys Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 92
 <211> 11
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 92
 Gly Arg Asp His Asn Tyr Ser Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 93
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 93
 tatccttatg atgttcctga ttatgca

27

<210> 94
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 94
 Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 1 5

<210> 95
 <211> 11
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 95
Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly Ser Gln Leu Ser
1 5 10

<210> 96
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 96
Trp Arg Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 97
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 97
Ala Gln Gly Ala Ala Leu Pro Arg Thr
1 5

<210> 98
<211> 7
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 98
Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu
1 5

<210> 99
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 99
Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe
1 5

<210> 100
<211> 9
<212> ПРТ
<213> Homo sapiens

<400> 100
Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu
1 5

<210> 101

<211> 6
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<400> 101
 Met Tyr Pro Pro Pro Tyr
 1 5

<210> 102
 <211> 4
 <212> ПРТ
 <213> Неизвестный организм

<220>
 <223> Описание неизвестного организма: Пептид

<400> 102
 Tyr Trp Thr Asp
 1

<210> 103
 <211> 360
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(360)

<400> 103
 gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttt agg att agc gat gag 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Arg Ile Ser Asp Glu
 20 25 30
 gat atg ggc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gta 144
 Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 tca agc att tat ggc cct agc ggt agc aca tac tac gca gac tcc gtg 192
 Ser Ser Ile Tyr Gly Pro Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgt gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tat tgc 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gcg agt gct ttg gag ccg ctt tcg gag ccc ctg ggc ttt tgg ggt cag 336
 Ala Ser Ala Leu Glu Pro Leu Ser Glu Pro Leu Gly Phe Trp Gly Gln
 100 105 110
 gga acc ctg gtc acc gtc tcg agc 360
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 104
 <211> 120
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<400> 104
 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 Arg Ile Ser Asp Glu
 20 25 30
 Asp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Tyr Gly Pro Ser Gly 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 Ser Ala Leu Glu Pro Leu Ser Glu Pro Leu Gly Phe Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 105
 <211> 348
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(348)

<400> 105
 gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt gat ctt tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Leu Tyr
 20 25 30
 aat atg ttt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc 144
 Asn Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 tca ttt att agt cag act ggt agg ctt aca tgg tac gca gac tcc gtg 192
 Ser Phe Ile Ser Gln Thr Gly Arg Leu Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val

020464

50	55	60	
aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat			240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt			288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
gcg aaa acg ctg gag gat ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc			336
Ala Lys Thr Leu Glu Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
	100	105	110
acc gtc tcg agc			348
Thr Val Ser Ser			
	115		

<210> 106
 <211> 116
 <212> PPT
 <213> Homo sapiens

<400> 106
 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

Asn Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 107
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 107

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc gtt aag gag ttt 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Lys Glu Phe
 20 25 30

tta tgg tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
 Leu Trp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

tat atg gca tcc aat ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
 Tyr Met Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag aag ttt aag ctg cct cgt 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Lys Phe Lys Leu Pro Arg
 85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 108

<211> 108

<212> ΠPT

<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 Val Lys Glu Phe
 20 25 30

Leu Trp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Met Ala Ser Asn 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 Phe Lys Leu Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 109
 <211> 362
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 109
 gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgcgtetc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttgag tggattgga tgggttgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg gtctagagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcccgcgaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgcg tgccgaggac accgcggtat attactgtgc gaaagttaag 300
 ttgggggggg ggctaattt tgactactgg ggccagggaa cctggtcac cgtctcagac 360
 gc 362

<210> 110
 <211> 120
 <212> ППТ
 <213> Homo sapiens

<400> 110
 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 Glu Trp Tyr
 20 25 30
 Trp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly 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 Lys Leu Gly Gly Gly Pro Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 111
 <211> 360
 <212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(360)

<400> 111

```

gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg      48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt gag tgg tat      96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Glu Trp Tyr
                20           25           30

tgg atg ggt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc     144
Trp Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
                35           40           45

tca gct att agt ggt agt ggt ggt agc aca tac tac gca gac tcc gtg     192
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
                50           55           60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat     240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65           70           75           80

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt     288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85           90           95

gcg aaa gtt aag ttg ggg ggg ggg cct aat ttt gac tac tgg ggc cag     336
Ala Lys Val Lys Leu Gly Gly Gly Pro Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
                100           105           110

gga acc ctg gtc acc gtc tcg agc      360
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                115           120

```

<210> 112

<211> 324

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 112

```

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tct ctg tct gca tct gta gga      48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att gat agt tat      96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Tyr
                20           25           30

tta cat tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc     144
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
                35           40           45

tat agt gca tcc gag ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc     192
Tyr Ser Ala Ser Glu Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

```

```

      50              55              60
agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65              70              75              80

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag gtt gtg tgg cgt cct ttt      288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro Phe
85              90              95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgc      324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100              105

<210> 113
<211> 108
<212> ПРТ
<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 Asp Ser Tyr
20              25              30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35              40              45

Tyr Ser Ala Ser Glu 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 Trp Arg Pro Phe
85              90              95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100              105

<210> 114
<211> 324
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 114
gac atc cag atg acc cag tct oca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga      48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1              5              10              15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att ttt atg aat      96

```

020464

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Phe Met Asn
 20 25 30
 tta ttg tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
 Leu Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 tat aat gca tcc gtg ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
 Tyr Asn Ala Ser Val Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag gtt gtg tgg cgt cct ttt 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro Phe
 85 90 95
 acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 115
 <211> 108
 <212> HPT
 <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 Ser Ile Phe Met Asn
 20 25 30

Leu Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asn 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 Val Val Trp Arg Pro Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 116
 <211> 324
 <212> DHK
 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 116

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att tat gat gcg 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Asp Ala
 20 25 30

tta gag tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
 Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

tat act gca tcc cgg ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
 Tyr Thr Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag gtt atg cag cgt cct gtt 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Met Gln Arg Pro Val
 85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 117

<211> 108

<212> HPT

<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 Ser Ile Tyr Asp Ala
 20 25 30

Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Thr 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 Met Gln Arg Pro Val
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 118
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)

<400> 118
 gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att tat gat gct 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Asp Ala
 20 25 30
 tta cag tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
 Leu Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 tat act gca tcc cgg ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
 Tyr Thr Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 gaa gat ttt gct acg tac cac tgt caa cag gtt atg cag cgt cct gtt 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr His Cys Gln Val Met Gln Arg Pro Val
 85 90 95
 acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 119
 <211> 108
 <212> ПРТ
 <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 Ser Ile Tyr Asp Ala
 20 25 30
 Leu Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Thr 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 His Cys Gln Gln Val Met Gln Arg Pro Val
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 120

<211> 324

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 120

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc gtt aag gag ttt 96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Lys Glu Phe
20 25 30

tta tgg tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
Leu Trp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

tat atg gca tcc aat ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
Tyr Met Ala Ser Asn Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag aag ttt aag ctg cct cgt 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Lys Phe Lys Leu Pro Arg
85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 121

<211> 108

<212> ПРТ

<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 Ser Val Lys Glu Phe
20 25 30

Leu Trp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Met Ala Ser Asn 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 Phe Lys Leu Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 122
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)

<400> 122
 gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att tgg acg aag 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Trp Thr Lys
 20 25 30
 tta cat tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 tat atg gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
 Tyr Met Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag tgg ttt agt aat cct agt 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Phe Ser Asn Pro Ser
 85 90 95
 acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgc 324
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 123
 <211> 108
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<400> 123

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 Trp Thr Lys
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Met 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 Trp Phe Ser Asn Pro Ser
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 124

<211> 324

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 124

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att tag ccg att 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gln Pro Ile
 20 25 30

tta tgt tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
 Leu Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag att cag cat att cct gtg 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Gln His Ile Pro Val
 85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 125
 <211> 108
 <212> HPT
 <213> Homo sapiens

<400> 125
 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 Gln Pro Ile
 20 25 30

Leu Cys 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 Ile Gln His Ile Pro Val
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 126
 <211> 324
 <212> DHK
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)

<400> 126
 gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att ggg tag gat 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Gln Asp
 20 25 30

tta cat tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

tat acg gca tcc ctt ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
 Tyr Thr Ala Ser Leu Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

020464

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag cag agt gct ttt cct aat 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gln Ser Ala Phe Pro Asn
 85 90 95

acg ctc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
 Thr Leu Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 127
 <211> 108
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<400> 127
 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 Gln Asp
 20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Thr 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 Gln Ser Ala Phe Pro Asn
 85 90 95

Thr Leu Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 128
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)

<400> 128
 gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tcc gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc ata acg aag aat 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Thr Lys Asn

20	25	30	
tta ctt tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc Leu Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile 35 40 45			144
tat tag gca tcc tct ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc Tyr Gln Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly 50 55 60			192
agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro 65 70 75 80			240
gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag ctt cgt cat aag cct ccg Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Arg His Lys Pro Pro 85 90 95			288
acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg 100 105			324

<210> 129

<211> 108

<212> PPT

<213> Homo sapiens

<400> 129

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 Thr Lys Asn 20 25 30

Leu Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile 35 40 45

Tyr Gln 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 Leu Arg His Lys Pro Pro 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg 100 105
--

<210> 130

<211> 324

<212> DHK

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 130

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att tag aag tct 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gln Lys Ser
 20 25 30

tta agg tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
 Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

tat cat gca tcc gat ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
 Tyr His Ala Ser Asp Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag atg gtt aat agt cct gtt 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Met Val Asn Ser Pro Val
 85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 131

<211> 108

<212> NPPT

<213> Homo sapiens

<400> 131

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 Gln Lys Ser
 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 Asp 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 Val Asn Ser Pro Val
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 132
 <211> 324
 <212> ДHK
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)

<400> 132
 gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att tag acg gcg 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gln Thr Ala
 20 25 30
 tta cat tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 tat tct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
 Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag tcg agt ttt ttg cct ttt 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Phe Leu Pro Phe
 85 90 95
 acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 133
 <211> 108
 <212> ПPT
 <213> Homo sapiens

<400> 133
 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 Gln Thr Ala
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser 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

Leu Glu 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 Gln Met Gly Arg Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 136

<211> 324

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 136

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att aag cat tag 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Lys His Gln
 20 25 30

tta gct tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

tat aag gca tcc gtg ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
 Tyr Lys Ala Ser Val Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag ctt agg cgt cgt cct act 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Arg Arg Arg Pro Thr
 85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 137

<211> 108

<212> ПРТ

<213> Homo sapiens

<400> 137

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 Lys His Gln
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Lys 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 Leu Arg Arg Arg Pro Thr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 138

<211> 324

<212> DHK

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 138

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc gtt aag gct tag 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Lys Ala Gln
 20 25 30

tta act tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
 Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

tat aag gca tcc act ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
 Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag cat agt tct agg cct tat 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Ser Ser Arg Pro Tyr
 85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 139
 <211> 108
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<400> 139
 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 Val Lys Ala Gln
 20 25 30

Leu Thr 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 His Ser Ser Arg Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 140
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)

<400> 140
 gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att gag aat cgg 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Glu Asn Arg
 20 25 30

tta ggt tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
 Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

tat tag gcg tcc ttg ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
 Tyr Gln Ala Ser Leu Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag gat tcg tat ttt cct cgt 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Ser Tyr Phe Pro Arg
 85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 141
 <211> 108
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<400> 141
 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 Glu Asn Arg
 20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gln 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 Asp Ser Tyr Phe Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 142
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)

<400> 142
 gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att atg gat aag 96

020464

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Met Asp Lys
 20 25 30
 tta aag tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
 Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 tat tag gca tcc att ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
 Tyr Gln Ala Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag gat agt ggg ggt cct aat 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Ser Gly Gly Pro Asn
 85 90 95
 acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 143
 <211> 108
 <212> ПРТ
 <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 Met Asp Lys
 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 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 Asp Ser Gly Gly Pro Asn
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 144
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 144

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att ggg agg aat 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Arg Asn
 20 25 30

tta gag tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
 Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

tat gat gca tcc cat ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
 Tyr Asp Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag tcg cgt tgg ctt cct cgt 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Arg Trp Leu Pro Arg
 85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 145

<211> 108

<212> NPT

<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 Gly Arg Asn
 20 25 30

Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp 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 Ser Arg Trp Leu Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 146

<211> 324

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 146

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agg aag atg 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Arg Lys Met
 20 25 30

tta gtt tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
 Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

tat cgg gca tcc tat ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
 Tyr Arg Ala Ser Tyr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag gct ttt cgg cgg cct agg 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Phe Arg Arg Pro Arg
 85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 147

<211> 108

<212> ППТ

<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 Arg Lys Met
 20 25 30

Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Arg 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 Ala Phe Arg Arg Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 148
<211> 345
<212> ДHK
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(345)

<400> 148
gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt gat ctt tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Leu Tyr
20 25 30

aat atg ttt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc 144
Asn Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

tca ttt att agt cag act ggt agg ctt aca tgg tac gca gac tcc gtg 192
Ser Phe Ile Ser Gln Thr Gly Arg Leu Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg aaa acg ctg gag gat ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc 336
Ala Lys Thr Leu Glu Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

acc gtc tcg 345
Thr Val Ser
115

<210> 149
<211> 115
<212> ПPT
<213> Homo sapiens

<400> 149
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

Asn Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

Thr Val Ser
 115

<210> 150

<211> 357

<212> DHK

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(357)

<400> 150

gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt ccg gtt tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Pro Val Tyr
 20 25 30

atg atg ggt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc 144
 Met Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

tca tcg att gat gct ctt ggt ggg cgg aca ggt tac gca gac tcc gtg 192
 Ser Ser Ile Asp Ala Leu Gly Gly Arg Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg aaa act atg tcg aat aag acg cat acg ttt gac tac tgg ggc cag 336

Ala Lys Thr Met Ser Asn Lys Thr His Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

gga acc ctg gtc acc gtc tcg
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115

357

<210> 151
 <211> 119
 <212> PPT
 <213> Homo sapiens

<400> 151
 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 Pro Val Tyr
 20 25 30

Met Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Asp Ala Leu Gly Gly Arg Thr Gly 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 Ser Asn Lys Thr His Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115

<210> 152
 <211> 345
 <212> DHK
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(345)

<400> 152
 gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt gtg gct tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Val Ala Tyr
 20 25 30

020464

```

aat atg act tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc      144
Asn Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35                      40                      45

tca agt att aat act ttt ggt aat tag aca agg tac gca gac tcc gtg      192
Ser Ser Ile Asn Thr Phe Gly Asn Gln Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
      50                      55                      60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat      240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
      65                      70                      75                      80

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt      288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                      90                      95

gcg aaa ggt agt agg cct ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc      336
Ala Lys Gly Ser Arg Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
      100                      105                      110

acc gtc tcg
Thr Val Ser
      115

<210> 153
<211> 115
<212> HPT
<213> Homo sapiens

<400> 153
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 Val Ala Tyr
      20                      25                      30

Asn Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35                      40                      45

Ser Ser Ile Asn Thr Phe Gly Asn Gln Thr Arg 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 Ser Arg Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
      100                      105                      110

Thr Val Ser
      115

<210> 154

```

<211> 357
 <212> DHK
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(357)

<400> 154

```

gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg      48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1                               5                               10          15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt tag ggg tat      96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gln Gly Tyr
                20                               25          30

cgt atg ggt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc      144
Arg Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
                35                               40          45

tca tgg att acg cgt act ggt ggg acg aca cag tac gca gac tcc gtg      192
Ser Trp Ile Thr Arg Thr Gly Gly Thr Thr Gln Tyr Ala Asp Ser Val
                50                               55          60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat      240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                               70                               75          80

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt      288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                               90          95

gcg aaa ccg gcg aag ctt gtt ggg gtt ggg ttt gac tac tgg ggc cag      336
Ala Lys Pro Ala Lys Leu Val Gly Val Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
                100                               105          110

gga acc ctg gtc acc gtc tcg                                          357
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
                115

```

<210> 155
 <211> 119
 <212> NPPT
 <213> Homo sapiens

<400> 155

```

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 Gln Gly Tyr
                20                               25          30

Arg Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
                35                               40          45

Ser Trp Ile Thr Arg Thr Gly Gly Thr Thr Gln 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 Pro Ala Lys Leu Val Gly Val Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 156

<211> 357

<212> DHK

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(357)

<400> 156

gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt cgg aag tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Lys Tyr
20 25 30

tag atg ggg tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc 144
Gln Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

tca cag att ggt gcg aag ggt cag tct aca gat tac gca gac tcc gtg 192
Ser Gln Ile Gly Ala Lys Gly Gln Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg aaa aag aag agg ggg gag aat tat ttt ttt gac tac tgg ggc cag 336
Ala Lys Lys Lys Arg Gly Glu Asn Tyr Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

gga acc ctg gtc acc gtc tcg 357
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 157

<211> 119

<212> NPT

<213> Homo sapiens

<400> 157

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 Lys Tyr
 20 25 30

Gln Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115

<210> 158

<211> 357

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(357)

<400> 158

gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt cgg cgg tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Arg Tyr
 20 25 30

agt atg tcg tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc 144
 Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

tca gat att tct cgt tct ggt cgg tat aca cat tac gca gac tcc gtg 192
 Ser Asp Ile Ser Arg Ser Gly Arg Tyr Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt 288

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gcg aaa cgt att gat tct tct cag aat ggg ttt gac tac tgg ggc cag 336
 Ala Lys Arg Ile Asp Ser Ser Gln Asn Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 gga acc ctg gtc acc gtc tcg 357
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115

<210> 159
 <211> 119
 <212> HPT
 <213> Homo sapiens

<400> 159
 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 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 Asp Ile Ser Arg Ser Gly Arg Tyr Thr His 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 Ile Asp Ser Ser Gln Asn Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115

<210> 160
 <211> 345
 <212> DHK
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(345)

<400> 160
 gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

020464

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt tag ggg tat	96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gln Gly Tyr	
20 25 30	
aag atg ttt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc	144
Lys Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
tca gct att agt ggt agt ggt ggt agc aca tac tac gca gac tcc gtg	192
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val	
50 55 60	
aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat	240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
65 70 75 80	
ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt	288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	
85 90 95	
gcg aaa cag aag gag aat ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc	336
Ala Lys Gln Lys Glu Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val	
100 105 110	
acc gtc tcg	345
Thr Val Ser	
115	
<210> 161	
<211> 115	
<212> NPPT	
<213> Homo sapiens	
<400> 161	
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 Gln Gly Tyr	
20 25 30	
Lys Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly 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 Gln Lys Glu Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val	
100 105 110	
Thr Val Ser	

115

<210> 162
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(357)

<400> 162
 gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt ggg gat tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Asp Tyr
 20 25 30
 gct atg tgg tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc 144
 Ala Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 tca gtg att agt tcg aat ggt ggg agt aca ttt tac gca gac tcc gtg 192
 Ser Val Ile Ser Ser Asn Gly Gly Ser Thr Phe Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gcg aaa cgt gtt cgt aag agg act cct gag ttt gac tac tgg ggc cag 336
 Ala Lys Arg Val Arg Lys Arg Thr Pro Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 gga acc ctg gtc acc gtc tcg 357
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115

<210> 163
 <211> 119
 <212> ППТ
 <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 Gly Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met Trp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

020464

Ser Val Ile Ser Ser Asn Gly Gly Ser Thr 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 Lys Arg Val Arg Lys Arg Thr Pro Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115

<210> 164

<211> 357

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(357)

<400> 164

gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt agg agg tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Arg Tyr
 20 25 30

aag atg ggt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc 144
 Lys Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

tca gcg att ggg agg aat ggt acg aag aca aat tac gca gac tcc gtg 192
 Ser Ala Ile Gly Arg Asn Gly Thr Lys Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg aaa att tat acg ggg aag cct gct gcg ttt gac tac tgg ggc cag 336
 Ala Lys Ile Tyr Thr Gly Lys Pro Ala Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

gga acc ctg gtc acc gtc tcg 357
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115

<210> 165
 <211> 119
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<400> 165
 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 Arg Tyr
 20 25 30

Lys Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Gly Arg Asn Gly Thr Lys Thr Asn 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 Ile Tyr Thr Gly Lys Pro Ala Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115

<210> 166
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(357)

<400> 166
 gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt aag aag tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Lys Tyr
 20 25 30

tag atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc 144
 Gln Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

020464

35	40	45	
tca gct att agt ggt agt ggt ggt agc aca tac tac gca gac tcc gtg			192
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
50	55	60	
aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat			240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80
ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt			288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85	90	95	
gcg aaa atg ctg agg act aag aat aag gtg ttt gac tac tgg ggc cag			336
Ala Lys Met Leu Arg Thr Lys Asn Lys Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln			
100	105	110	
gga acc ctg gtc acc gtc tcg			357
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser			
115			

<210> 167

<211> 119

<212> ПРТ

<213> Homo sapiens

<400> 167

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 Lys Tyr																		
20								25								30		

Gln Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val																		
35								40								45		

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly 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 Met Leu Arg Thr Lys Asn Lys Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln																			
100																105			110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser					
115					

<210> 168

<211> 357

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(357)

<400> 168

```

gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg      48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1                               5                               10                               15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt agg agg tat      96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Arg Tyr
                               20                               25                               30

aag atg ggt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc      144
Lys Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
                               35                               40                               45

tca gcg att ggg agg aat ggt acg aag aca aat tac gca gac tcc gtg      192
Ser Ala Ile Gly Arg Asn Gly Thr Lys Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
                               50                               55                               60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat      240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                               70                               75                               80

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt      288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                               85                               90                               95

gcg aaa att tat acg ggg aag cct gct gcg ttt gac tac tgg ggc cag      336
Ala Lys Ile Tyr Thr Gly Lys Pro Ala Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
                               100                              105                              110

gga acc ctg gtc acc gtc tcg                                          357
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
                               115

```

<210> 169

<211> 119

<212> NPPT

<213> Homo sapiens

<400> 169

```

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 Arg Tyr
                               20                               25                               30

Lys Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
                               35                               40                               45

Ser Ala Ile Gly Arg Asn Gly Thr Lys Thr Asn 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 Ile Tyr Thr Gly Lys Pro Ala Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115

<210> 170
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(357)

<400> 170
 gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt tag agt tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gln Ser Tyr
 20 25 30
 cgg atg ggt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc 144
 Arg Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 tca agt att tcg tcg agg ggt agg cat aca tct tac gca gac tcc gtg 192
 Ser Ser Ile Ser Ser Arg Gly Arg His Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gcg aaa agg gtt ccg ggt cgg ggg cgt tct ttt gac tac tgg ggc cag 336
 Ala Lys Arg Val Pro Gly Arg Gly Arg Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 gga acc ctg gtc acc gtc tcg 357
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115

<210> 171
 <211> 119
 <212> ППТ
 <213> Homo sapiens

<400> 171
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

020464

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gln Ser Tyr
20 25 30

Arg Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Arg Gly Arg His Thr Ser 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 Val Pro Gly Arg Gly Arg Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115

<210> 172
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(357)

<400> 172

gag	gtg	cag	ctg	ttg	gag	tct	ggg	gga	ggc	ttg	gta	cag	cct	ggg	ggg		48
Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly		
1				5					10					15			
tcc	ctg	cgt	ctc	tcc	tgt	gca	gcc	tcc	gga	ttc	ccc	ttt	cgt	cgg	tat		96
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Pro	Phe	Arg	Arg	Tyr		
			20					25					30				
cgg	atg	agg	tgg	gtc	cgc	cag	gct	cca	ggg	aag	ggg	cta	gag	tgg	gtc		144
Arg	Met	Arg	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
		35					40					45					
tca	ggg	att	tct	cgg	ggt	ggt	aag	cat	aca	acg	tac	gca	gac	tcc	gtg		192
Ser	Gly	Ile	Ser	Pro	Gly	Gly	Lys	His	Thr	Thr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val		
		50				55					60						
aag	ggc	cgg	ttc	acc	atc	tcc	cgc	gac	aat	tcc	aag	aac	acg	ctg	tat		240
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr		
65					70					75				80			
ctg	caa	atg	aac	agc	ctg	cgt	gcc	gag	gac	acc	gcg	gta	tat	tac	tgt		288
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90					95			

gcg aaa ggt gag ggg ggg gcg agt tct gcg ttt gac tac tgg ggc cag 336
 Ala Lys Gly Glu Gly Gly Ala Ser Ser Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

gga acc ctg gtc acc gtc tcg 357
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115

<210> 173
 <211> 119
 <212> NPT
 <213> Homo sapiens

<400> 173
 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 Pro Phe Arg Arg Tyr
 20 25 30

Arg Met Arg Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Pro Gly Gly Lys His Thr Thr 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 Glu Gly Gly Ala Ser Ser Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 115

<210> 174
 <211> 357
 <212> DHK
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(357)

<400> 174
 gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt tag cgg tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gln Arg Tyr

	20		25		30	
ggg atg gtt tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc						144
Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val						
	35		40		45	
tca gct att agt ggt agt ggt ggt agc aca tac tac gca gac tcc gtg						192
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val						
	50		55		60	
aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgc gac aat tcc aag aac acg ctg tat						240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr						
	65		70		75	80
ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt						288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys						
		85		90		95
gcg aaa cgg cat agt tct gag gct agg cag ttt gac tac tgg ggc cag						336
Ala Lys Arg His Ser Ser Glu Ala Arg Gln Phe Asp Tyr Trp Gly Gln						
	100		105		110	
gga acc ctg gtc acc gtc tcg						357
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser						
	115					
<210> 175						
<211> 119						
<212> NPPT						
<213> Homo sapiens						
<400> 175						
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 Gln Arg Tyr						
	20		25		30	
Gly Met Val Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val						
	35		40		45	
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly 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 Arg His Ser Ser Glu Ala Arg Gln Phe Asp Tyr Trp Gly Gln						
	100		105		110	
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser						
	115					

<210> 176
 <211> 720
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(720)

 <400> 176
 gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt agc agc tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

 gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc 144
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 tca gct att agt ggt agt ggt ggt agc aca tac tac gca gac tcc gtg 192
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

 aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgt gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

 ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 gcg aaa agt tat ggt gct ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc 336
 Ala Lys Ser Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

 acc gtc tcg agc ggt gga ggc ggt tca ggc gga ggt ggc agc ggc ggt 384
 Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125

 ggc ggg tcg acg gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct 432
 Gly Gly Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 130 135 140

 gca tct gta gga gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc 480
 Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 145 150 155 160

 att agc agc tat tta aat tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct 528
 Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 165 170 175

 aag ctc ctg atc tat gct gca tcc agt tgg caa agt ggg gtc cca tca 576
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Trp Gln Ser Gly Val Pro Ser
 180 185 190

 cgt ttc agt ggc agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc 624
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 195 200 205

 agt ctg caa cct gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag agt tac 672

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr
 210 215 220

agt acc cct aat acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 720
 Ser Thr Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 225 230 235 240

<210> 177
 <211> 240
 <212> PPT
 <213> Homo sapiens

<400> 177
 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 Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly 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 Ser Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125

Gly Gly Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
 130 135 140

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 145 150 155 160

Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 165 170 175

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Trp Gln Ser Gly Val Pro Ser
 180 185 190

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 195 200 205

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr
 210 215 220

Ser Thr Pro Asn Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 225 230 235 240

<210> 178
 <211> 269
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (69)..(269)

<400> 178
 caggaaacag ctatgacat gattacgcca agcttgcatg caaattctat ttcaaggaga 60

cagtcata atg aaa tac cta ttg cct acg gca gcc gct gga ttg tta tta 110
 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu
 1 5 10

ctc gcg gcc cag ccg gcc atg gcc gag gtg ttt gac tac tgg ggc cag 158
 Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 15 20 25 30

gga acc ctg gtc acc gtc tcg agc ggt gga ggc ggt tca ggc gga ggt 206
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 35 40 45

ggc agc ggc ggt ggc ggg tcg acg gac atc cag atg acc cag gcg gcc 254
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ala Ala
 50 55 60

gca gaa caa aaa ctc 269
 Ala Glu Gln Lys Leu
 65

<210> 179
 <211> 67
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<400> 179
 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 20 25 30

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 35 40 45

Gly Gly Gly Gly Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ala Ala Ala Glu
 50 55 60

Gln Lys Leu
65

<210> 180
<211> 90
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(90)

<400> 180
cat cat cat cac cat cac ggg gcc gca atc tca gaa gag gat ctg aat 48
His His His His His His Gly Ala Ala Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
1 5 10 15
ggg gcc gca tag act gtt gaa agt tgt tta gca aaa cct cat 90
Gly Ala Ala Gln Thr Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys Pro His
20 25 30

<210> 181
<211> 30
<212> ППТ
<213> Homo sapiens

<400> 181
His His His His His His Gly Ala Ala Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
1 5 10 15
Gly Ala Ala Gln Thr Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys Pro His
20 25 30

<210> 182
<211> 116
<212> ППТ
<213> Homo sapiens

<400> 182
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 Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly 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

020464

		85							90					95			
Ala	Lys	Ser	Tyr	Gly	Ala	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val		
			100					105					110				
Thr	Val	Ser	Ser														
			115														
<210> 183																	
<211> 116																	
<212> NPT																	
<213> Homo sapiens																	
<400> 183																	
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	Ser	Tyr		
			20					25					30				
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
		35					40					45					
Ser	His	Ile	Ser	Pro	Tyr	Gly	Ala	Asn	Thr	Arg	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	Leu	Arg	Ala	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val		
			100					105					110				
Thr	Val	Ser	Ser														
			115														
<210> 184																	
<211> 116																	
<212> NPT																	
<213> Homo sapiens																	
<400> 184																	
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	Ser	Tyr		
			20					25					30				
Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		

020464

35

40

45

Ser Asp Ile Gly Ala Thr Gly Ser Lys Thr Gly Tyr Ala Asp Pro 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 Val Leu Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 185
<211> 116
<212> NPT
<213> Homo sapiens

<400> 185
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 Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Arg Ile Asn Gly Pro Gly Gln Ala Thr Gly 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 Ile Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys His Gly Ala Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 186
<211> 116
<212> NPT

<213> Homo sapiens

<400> 186

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 Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Pro Ala Ser Gly Leu His Thr Arg 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 Pro Gly Leu Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 187

<211> 116

<212> HPT

<213> Homo sapiens

<400> 187

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 Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 188
 <211> 116
 <212> IPT
 <213> Homo sapiens

<400> 188
 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 Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Glu Ile Ser Ala Asn Gly Ser Lys Thr Gln Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Leu 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 Val Leu Gln Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 189
 <211> 116
 <212> IPT
 <213> Homo sapiens

<400> 189
 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 Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

020464

Ser Thr Ile Pro Ala Asn Gly Gln Val Thr Arg 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 Leu Leu Gln Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 190
 <211> 116
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<400> 190
 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 Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Asp Ile Ala Ala Thr Gly Ser Ala Thr Ser 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 Ile Leu Lys Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 191
 <211> 116
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<400> 191

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 Ser Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Thr Ile Ser Ser Val Gly Gln Ser Thr Arg 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 Leu Met Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 192

<211> 108

<212> NPPT

<213> Homo sapiens

<400> 192

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 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 Ser Tyr Ser Thr Pro Asn
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

020464

100

105

<210> 193

<211> 108

<212> HPT

<213> Homo sapiens

<400> 193

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 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 Pro Trp Arg Ser Pro Gly
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 194

<211> 108

<212> HPT

<213> Homo sapiens

<400> 194

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 Val 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 Leu 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 Asn Trp Trp Leu Pro Pro

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 195

<211> 108

<212> ПРТ

<213> Homo sapiens

<400> 195

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 Gln 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 Arg Val Tyr Asp Pro Leu
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 196

<211> 269

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (69)..(269)

<400> 196

caggaaacag ctatgacccat gattacgccca agcttgcctg caaattctat ttcaaggaga 60

cagtcata atg aaa tac cta ttg cct acg gca gcc gct gga ttg tta tta 110
 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu
 1 5 10

ctc gcg gcc cag ccg gcc atg gcc gag gtg ttt gac tac tgg ggc cag 158
 Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 15 20 25 30

gga acc ctg gtc acc gtc tcg agc ggt gga ggc ggt tca ggc gga ggt 206
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 35 40 45

ggc agc ggc ggt ggc ggg tcg acg gac atc cag atg acc cag gcg gcc 254
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ala Ala
 50 55 60

gca gaa caa aaa ctc 269
 Ala Glu Gln Lys Leu
 65

<210> 197

<211> 67

<212> ПРТ

<213> Homo sapiens

<400> 197

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 20 25 30

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 35 40 45

Gly Gly Gly Gly Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ala Ala Ala Glu
 50 55 60

Gln Lys Leu
 65

<210> 198

<211> 90

<212> ДНН

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(90)

<400> 198

cat cat cat cac cat cac ggg gcc gca atc tca gaa gag gat ctg aat 48
 His His His His His His Gly Ala Ala Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
 1 5 10 15

ggg gcc gca tag act gtt gaa agt tgt tta gca aaa cct cat 90
 Gly Ala Ala Gln Thr Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys Pro His
 20 25 30

<210> 199

<211> 30

<212> ПРТ

<213> Homo sapiens

<400> 199

His His His His His His Gly Ala Ala Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn
 1 5 10 15

Gly Ala Ala Gln Thr Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys Pro His
 20 25 30

<210> 200

<211> 348

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(348)

<400> 200

gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt agc agc tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc 144
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

tca gct att agt ggt agt ggt ggt agc aca tac tac gca gac tcc gtg 192
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgt gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg aaa agt tat ggt gct ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc 336
 Ala Lys Ser Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

acc gtc tcg agc 348
 Thr Val Ser Ser
 115

<210> 201

<211> 360

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(360)

<220>

<221> modified_base

<222> (307)..(308)

<223> a, c, t, g, неизвестно или другое

<220>

<221> modified_base

<222> (310)..(311)

<223> а, с, т, г, неизвестно или другое

<220>

<221> modified_base

<222> (313)..(314)

<223> а, с, т, г, неизвестно или другое

<220>

<221> modified_base

<222> (316)..(317)

<223> а, с, т, г, неизвестно или другое

<400> 201

gag gtg cag ctg ttg gag tct ggg gga ggc ttg gta cag cct ggg ggg 48
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

tcc ctg cgt ctc tcc tgt gca gcc tcc gga ttc acc ttt agc agc tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

gcc atg agc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggt cta gag tgg gtc 144
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

tca gct att agt ggt agt ggt ggt agc aca tac tac gca gac tcc gtg 192
 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgt gac aat tcc aag aac acg ctg tat 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

ctg caa atg aac agc ctg cgt gcc gag gac acc gcg gta tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gcg aaa agt tat ggt gct nnk nnk nnk nnk ttt gac tac tgg ggc cag 336
 Ala Lys Ser Tyr Gly Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

gga acc ctg gtc acc gtc tcg agc 360
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 202

<211> 120

<212> ПРТ

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MOD_RES

<222> (103)..(106)

<223> Вариабельная аминокислота

<400> 202

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 Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly 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 Ser Tyr Gly Ala Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 203

<211> 324

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<400> 203

gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att agc agc tat 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

tta aat tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

tat gct gca tcc agt ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag agt tac agt acc cct aat 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Asn
 85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 204
 <211> 108
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<400> 204
 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 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 Ser Tyr Ser Thr Pro Asn
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 205
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)

<400> 205
 gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att att aag cat 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ile Lys His
 20 25 30

tta aag tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
 Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

tat ggt gca tcc cgg ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc 192
 Tyr Gly Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag ggg gct cgg tgg cct cag 288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Arg Trp Pro Gln
 85 90 95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg 324
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 206
 <211> 108
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens

<400> 206
 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> 207
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)

<400> 207
 gac atc cag atg acc cag tct cca tcc tcc ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac cgt gtc acc atc act tgc cgg gca agt cag agc att tat tat cat 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Tyr His
 20 25 30

tta aag tgg tac cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
 Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

```

          35              40              45
tat aag gca tcc acg ttg caa agt ggg gtc cca tca cgt ttc agt ggc      192
Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50              55              60

agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt ctg caa cct      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65              70              75              80

gaa gat ttt gct acg tac tac tgt caa cag gtt cgg aag gtg cct cgg      288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Arg Lys Val Pro Arg
            85              90              95

acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgg      324
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100              105

```

<210> 208

<211> 108

<212> ПРТ

<213> Homo sapiens

<400> 208

```

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> 209

<211> 108

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 209

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

```

020464

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

<210> 210
<211> 108
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
 полипептид

<400> 210
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> 211
 <211> 108
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 211
 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> 212
 <211> 108
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 212
 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

020464

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> 213

<211> 108

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 213

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> 214

<211> 108

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 214

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> 215

<211> 108

<212> PPT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 215

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 Val Ser 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 Tyr Asn
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys Arg
 100 105

<210> 216

<211> 108

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 216

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> 217

<211> 108

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 217

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

020464

	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	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> 220
 <211> 108
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

	20	25	30
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	1	5	10
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	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> 221
 <211> 108
 <212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 221

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> 222

<211> 108

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 222

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> 223

<211> 108

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 223

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> 224

<211> 108

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 224

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> 225

<211> 108

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 225

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 Phe 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 Tyr Thr Val Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gln
 100 105

<210> 226

<211> 108

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 226

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 Thr 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> 227

<211> 108

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 227

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 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 Tyr Asn Val Pro Pro

85

90

95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 228

<211> 108

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
 полипептид

<400> 228

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 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 Phe Ala Val Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 229

<211> 108

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
 полипептид

<400> 229

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

020464

35 40 45

Tyr Arg Asn Ser Pro 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 Tyr Arg Val Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 230
 <211> 109
 <212> PPT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 230
 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 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Arg Ser Ser Leu Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Lys Tyr Asn Leu Pro
 85 90 95

Tyr Thr Ser Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 231
 <211> 108
 <212> PPT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический

полипептид

<400> 231

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 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 Tyr Ser Ile Pro Pro
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 232

<211> 108

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 232

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 Thr Leu Leu Ile
 35 40 45

Trp Phe Gly 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 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> 233

<211> 108

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 233

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 Thr Leu Leu Ile
35 40 45

Ala Trp Ala Ser Val 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 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> 234

<211> 108

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 234

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 Thr Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asn Ala Ser Tyr 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 His Ala His Leu Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 235

<211> 108

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 235

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 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 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> 236

<211> 108

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 236

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

Arg Arg Val Ser Val 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 Ser Gln Gly Arg Trp Pro Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 237

<211> 108

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 237

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 Tyr Gly Ser Val 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 Ser Gln Gly Arg Trp Pro Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100

105

<210> 238

<211> 116

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 238

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
 115

<210> 239

<211> 117

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 239

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

<210> 241
 <211> 118
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

 <400> 241
 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
 115

<210> 242
 <211> 118
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

 <400> 242
 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
 115

<210> 243

<211> 118

<212> PPT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 243

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
 115

<210> 244

<211> 120

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 244

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
 115 120

<210> 245

<211> 122

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 245

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

020464

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
 115 120

<210> 246
 <211> 119
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
 полипептид

<400> 246
 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 Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Lys Val Arg Ser Met Arg Pro Tyr Lys Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 247
 <211> 120
 <212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 247

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
115 120

<210> 248

<211> 121

<212> PPT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 248

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 Asp Tyr
20 25 30

Val Met Gly Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Leu Ile Lys Pro Asn Gly Ser Pro 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 Gly Arg Phe Asn Val Leu Gln Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 249

<211> 118

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 249

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 Arg Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg His Tyr
20 25 30

Arg Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Trp Ile Arg Pro Asp Gly Thr 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 Ser Tyr Met Gly Asp Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 250

<211> 116

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 250

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 Trp Asp
 20 25 30

Lys Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 251

<211> 117

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 251

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 Ala Tyr
 20 25 30

Pro Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Trp Gly Thr Gly 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

020464

```

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 Gln Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
           100                105                110

Val Thr Val Ser Ser
           115

<210> 252
<211> 120
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
        полипептид

<400> 252
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> 253
<211> 123
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический

```

полипептид

<400> 253

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> 254

<211> 119

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 254

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 Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 50 55 60

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80

020464

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

Cys Ala Lys Gln Asn Pro Ser Tyr Gln Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 255

<211> 118

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 255

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> 256

<211> 117

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

020464

<400> 256

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> 257

<211> 118

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 257

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

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

020464

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> 258
<211> 118
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 258
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> 259
<211> 118
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 259
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

020464

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
 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> 260
 <211> 118
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический
 полипептид
 <400> 260
 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
 115

<210> 261

<211> 197

<212> IPT

<213> Homo sapiens

<400> 261

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
 20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
 35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
 50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
 65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
 85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu
 100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His
 115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Leu Tyr Leu Glu Ile Ala Arg
 130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg
 145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala
 165 170 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser
 180 185 190

Ser Ala Lys Gln Arg

195

<210> 262

<211> 196

<212> HPT

<213> Homo sapiens

<400> 262

Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln
 1 5 10 15

Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser
 20 25 30

Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr
 35 40 45

Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu
 50 55 60

Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln
 65 70 75 80

Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu
 85 90 95

Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala
 100 105 110

Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys
 115 120 125

Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr
 130 135 140

Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg
 145 150 155 160

Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala
 165 170 175

Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu
 180 185 190

Val Glu Glu Pro
 195

<210> 263

<211> 204

<212> HPT

<213> Homo sapiens

<400> 263

Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu
 1 5 10 15

Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr
 20 25 30

Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg
 35 40 45

Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys
 50 55 60

Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu
 65 70 75 80

Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys
 85 90 95

Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu
 100 105 110

Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr
 115 120 125

Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys
 130 135 140

Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr
 145 150 155 160

Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu
 165 170 175

Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly
 180 185 190

Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly
 195 200

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Лиганд, содержащий отдельный вариабельный домен легкой цепи антитела, специфично связывающий сывороточный альбумин и включающий одну из аминокислотных последовательностей dAb7h14, dAb7h11, dAb7h9, представленных на фиг. 24, или аминокислотных последовательностей, по меньшей мере на 80% идентичных указанным последовательностям.

2. Лиганд по п.1, где указанный отдельный вариабельный домен антитела специфично связывает человеческий сывороточный альбумин и сывороточный альбумин из источника, не являющегося человеком, со значениями константы диссоциации K_d , отличающимися друг от друга не более чем в 10 раз.

3. Лиганд по п.1, где указанный отдельный вариабельный домен легкой цепи антитела специфично связывает домен II человеческого сывороточного альбумина.

4. Лиганд по п.1, где указанный отдельный вариабельный домен легкой цепи антитела, специфично связывающий сывороточный альбумин, содержит один или более гипервариабельных участков (CDR) из отдельного вариабельного домена антитела, выбранного из dAb7h14, dAb7h11 и dAb7h9, где процент идентичности, указанный в п.1, относится к CDR участкам.

5. Лиганд по п.4, где указанный отдельный переменный домен легкой цепи антитела, специфично связывающий сывороточный альбумин, дополнительно содержит каркас, выбранный из группы, состоящей из СТЛА-4, липокалина, стафилококкового белка А (SpA), аффитела, авимера, GroEl, GroEs, трансферрина и фибронектина.

6. Лиганд по любому из пп.1-5, где указанный отдельный переменный домен легкой цепи антитела, специфично связывающий сывороточный альбумин, связывает человеческий сывороточный альбумин и крысиный сывороточный альбумин и где период полувыведения Тв указанного лиганда и период полувыведения Тв крысиного сывороточного альбумина в крысе-хозяине, по существу, одинаковы.

7. Лиганд по любому из пп.1-5, где указанный отдельный переменный домен легкой цепи антитела, специфично связывающий сывороточный альбумин, связывает человеческий сывороточный альбумин и сывороточный альбумин обезьян рода *Synomolgus* и где период полувыведения Тв указанного лиганда и период полувыведения Тв сывороточного альбумина обезьян рода *Synomolgus* в хозяине, представляющем собой обезьяну рода *Synomolgus*, по существу, одинаковы.

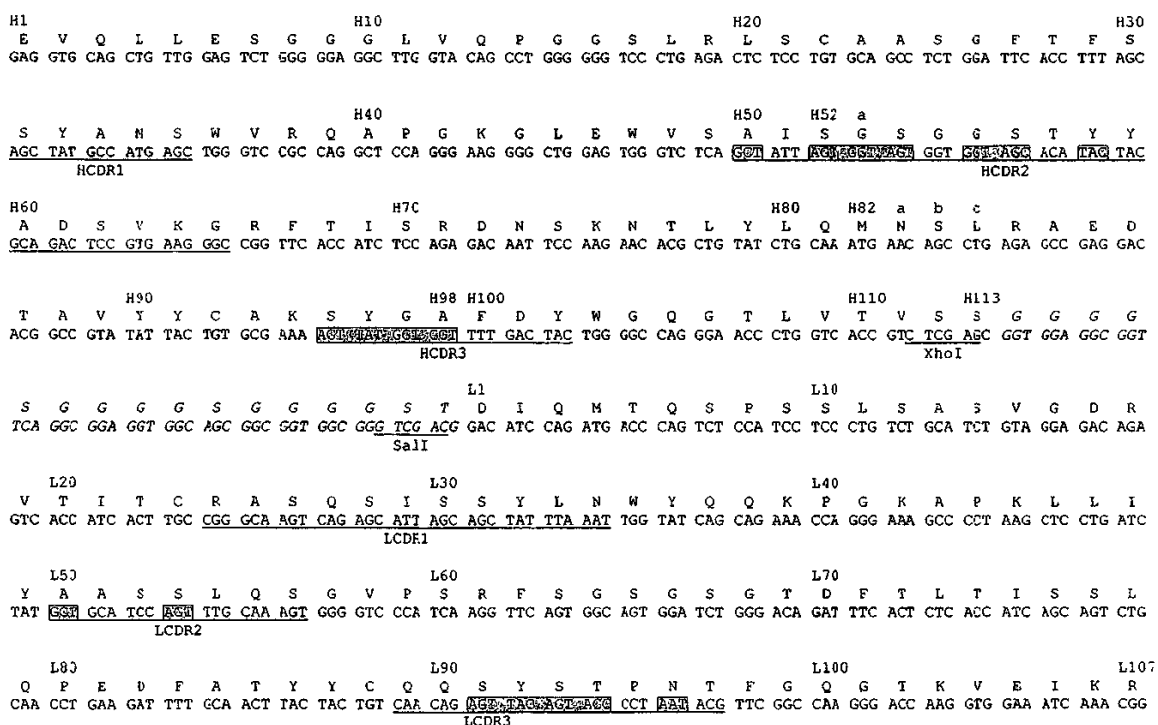
8. Лиганд по любому из пп.1-7, где указанный отдельный переменный домен легкой цепи антитела способен специфично связывать крысиный, человеческий сывороточный альбумин и сывороточный альбумин обезьян рода *Synomolgus*.

9. Лиганд по любому из пп.1-7, где указанный отдельный переменный домен легкой цепи антитела способен специфично связывать мышинный, человеческий сывороточный альбумин и сывороточный альбумин обезьян рода *Synomolgus*.

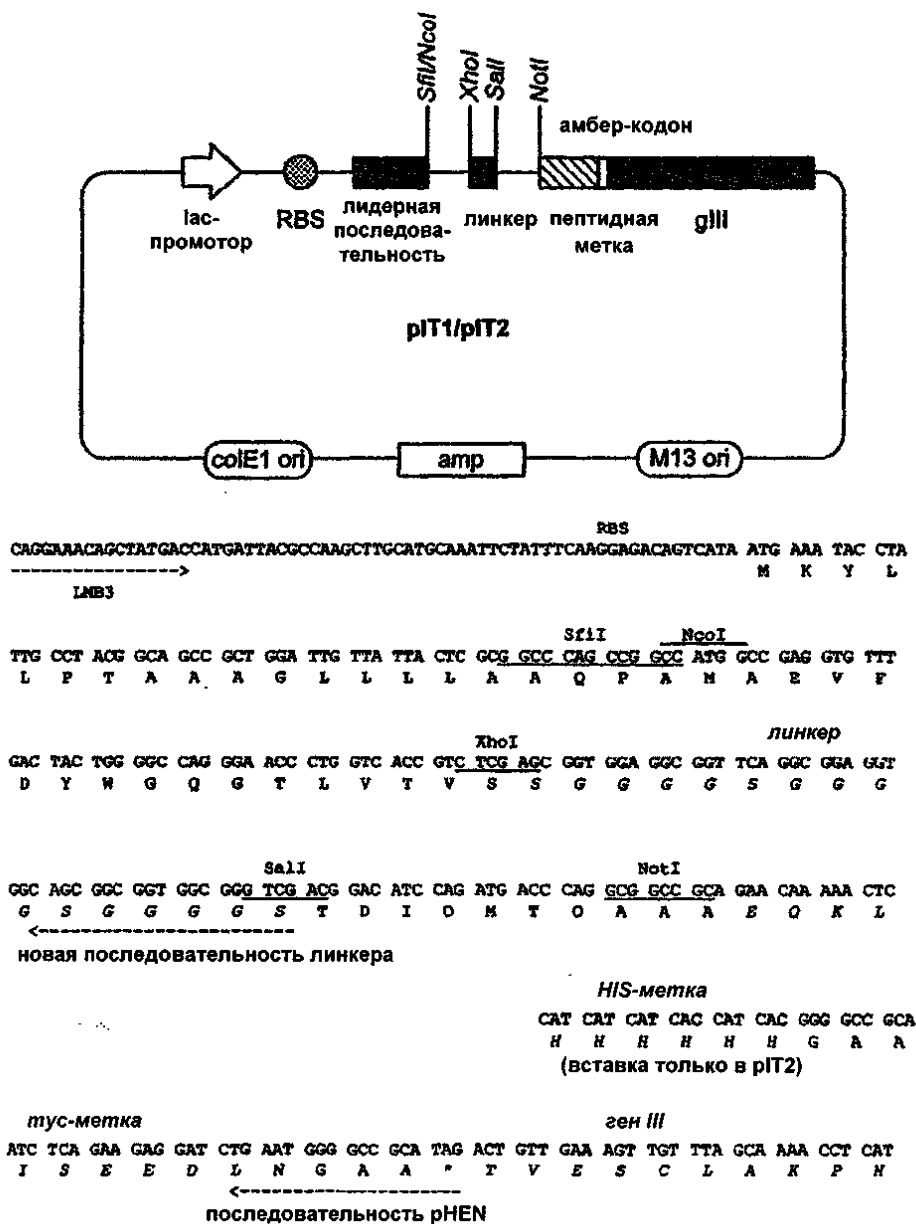
10. Лиганд по любому из пп.1-7, где указанный отдельный переменный домен легкой цепи антитела способен специфично связывать крысиный, мышинный, человеческий сывороточный альбумин и сывороточный альбумин обезьян рода *Synomolgus*.

11. Слитый белок, содержащий первый отдельный переменный домен, как он определен в п.1, специфично связывающий сывороточный альбумин, и второй отдельный переменный домен, где каждый из указанных первого и второго отдельных переменных доменов представляет собой отдельный переменный домен, не встречающийся в природе, и где либо (1) первый отдельный переменный домен связан с N-концевой областью второго отдельного переменного домена, либо (2) первый отдельный переменный домен связан с C-концевой областью второго отдельного переменного домена, либо (3) первый отдельный переменный домен присоединен как к N-концевой области второго отдельного переменного домена, так и к C-концевой области второго отдельного переменного домена.

12. Лиганд по п.1, где указанный отдельный переменный домен антитела специфично связывает сывороточный альбумин *in vitro* как при pH 7, так и при pH внутриклеточного компартмента.



Фиг. 1



Фиг. 2

Цепи V_H

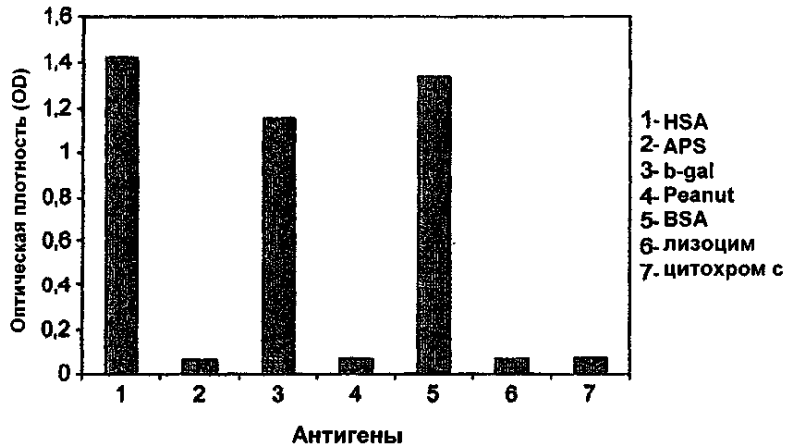
	FR1			CDR1	FR2	CDR2		FR3			CDR3	FR4
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
	123456789012345678901234567890		12345	67890123456789	012a3456789012345		67890123456789012abc345678901234		567801	234567890123		
Модельный V _H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	SYMS	WVRQAPGKLEWVS	ALSGGSGSTTYADSVK	RFTEIRNSKNTLYLQMSLRADYAVIYCAK	SYGAFDY	WGQSTLVTVSS					
K8	-----	-----	-----	H-SPY-AM-R	-----	GLRA	-----					
VH2	-----	-----	-----	D-GAT-SK-G-P	-----	KVLT	-----					
VH4	-----	-----	-----	R-NGP-A-G	-----	NGAP	-----					
VHC11	-----	-----	-----	S-PAS-LK-R	-----	PGLG	-----					
VHA10ed	-----	-----	-----	D-ERT-Y*-R	-----	KVLV	-----					
VHA1sd	-----	-----	-----	K-SAN-SK-Q	-I-----	KVLQ	-----					
VHA5sd	-----	-----	-----	T-PAN-V-R	-----	SLIQ	-----					
VHC5sd	-----	-----	-----	D-ANT-SA-S	-----	KILK	-----					
VHC11sd	-----S-----	-----	-----	T-SIV-QS-R	-----	NLMS	-----					

Цепи V_K

	FR1		CDR1	FR2	CDR2	FR3			CDR3	FR4
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	12345678901234567890123		45678901234	567890123456789	0123436	78901234567890123456789012345678		901234567		89012345678
Модельный V _K	DIQMTQSPFSLASVGDRTVITC	RASQSISSYLN	WYQQKPKGAPKLLIY	AASSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTYSISLQPEDFATYYC	QQSYSTPPT	FGQGTIVEIKR			
K8	-----	-----	-----	R-H---	-----	FWRS-G-	-----			
E5sd	-----	-----V-----	-----	L-R---	-----	NWNL-P-	-----			
C3	-----	-----	-----	*-L---	-----	RVYD-L-	-----			

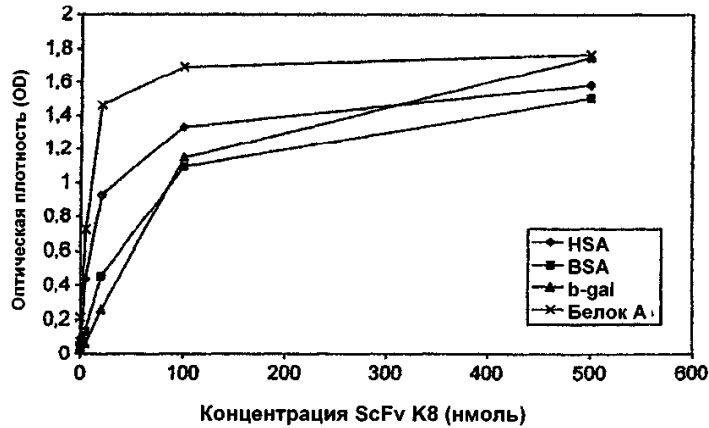
Фиг. 3

Фаговый ELISA ScFv антитела K8 с двойной специфичностью



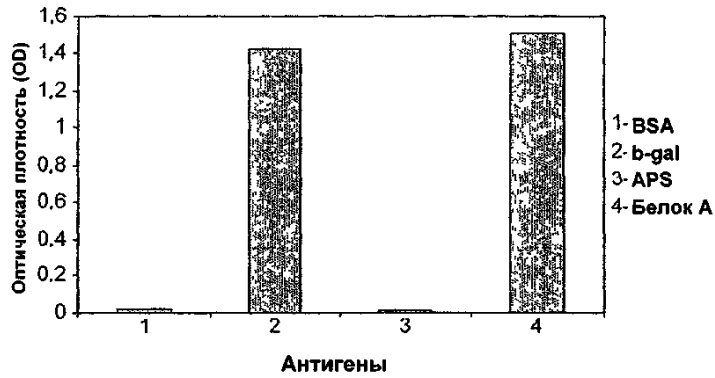
Фиг. 4

ELISA растворимого ScFv антитела K8 с двойной специфичностью



Фиг. 5

ELISA растворимого ScFv антитела K8V_K / клона модельного V_H



Фиг. 6

RBS

CAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTGCATGCAAAATTCTATTTC AAGGAGACAGTCATA ATG AAA TAC STA
 -----> M K Y L

LMB3

SfiI NcoI

TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA TTG TTA TTA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAG GTG TTT
 L P T A A A G L L L L A A Q P A M A E V F

XhoI линкер

GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCG AGC GGT GGA GGC GGT TCA GGC GGA GGT
 D Y W G Q G T L V T V S S G G G C S G G G

Sall NotI

GCC AGC GGC GGT GGC GGG TCG ACG GAC ATC CAG ATG ACC CAG GCG GCC GCA GAA CAA AAA CTC
 G S G G G S T D I Q M T Q A A A E Q K L

-----<

новая последовательность линкера

HIS-метка

CAT CAT CAT CAC CAT CAC GGS GCC GCA
 H H H H H H H G A A

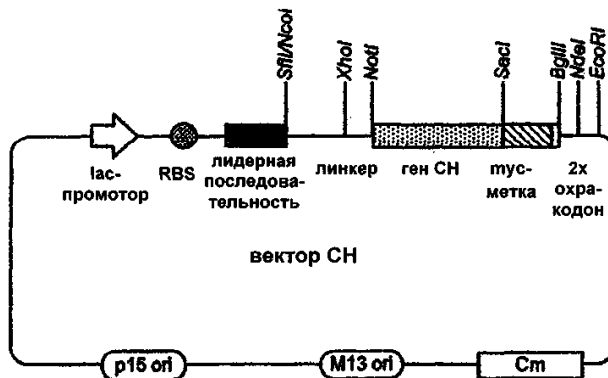
(вставка только в V-домен 2 вектора)

тис-метка III ген

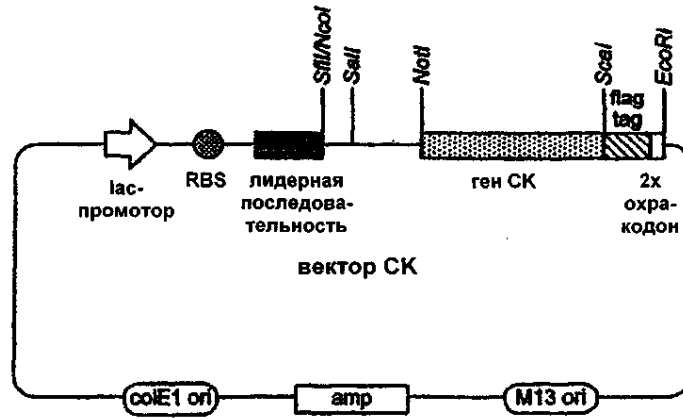
ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC GCA TAG ACT GTT GAA AGT TGT TTA GCA AAA CCT CAT
 I S E E D L N G A A * T V E S C L A K P H

последовательность pHEN

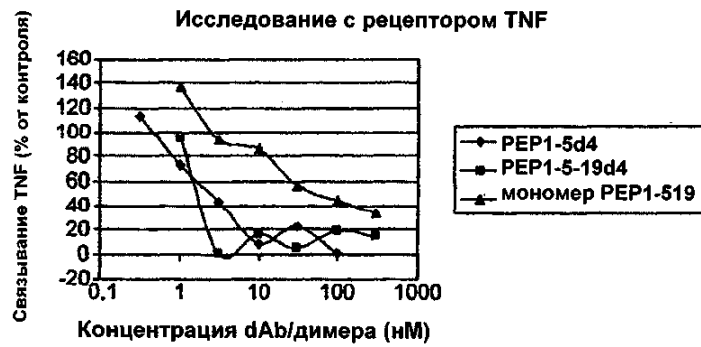
Фиг. 7



Фиг. 8



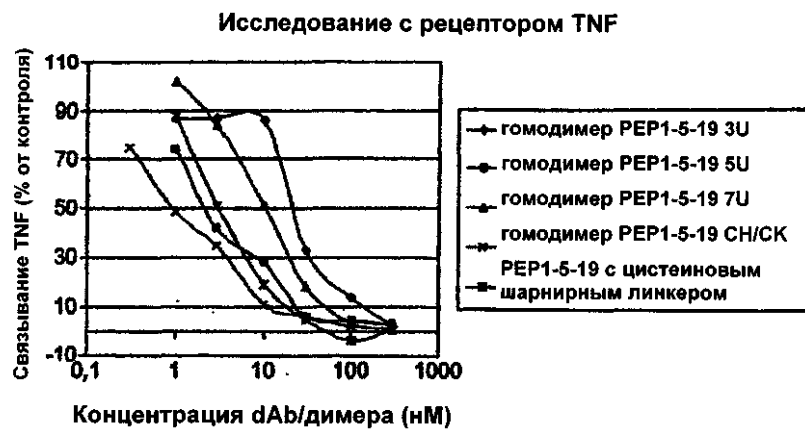
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

Последовательность модельного V_H для библиотеки 1

1 E V Q L L E S G G G L V Q P G G
 GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG
 CTC CAC GTC GAC AAC CTC AGA CCC CCT CCG AAC CAT GTC GGA CCC CCC
 49 S L R L S C A A S G F T F S S Y
 TCC CTG CGT CTC TCC TGT GCA GCC TCC GGA TTC ACC TTT AGC AGC TAT
 AGG GAC GCA GAG AGG ACA CGT CCG AGG CCT AAG TGG AAA TCG TCG ATA
 97 A M E W V R Q A P G K G L E W V
GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGT CTA GAG TGG GTC
CGG TAC TCG ACC CAG GCG GTC CGA GGT CCC TTC CCA GAT CTC ACC CAG
 145 S A I S G S G G S T Y Y A D S V
 TCA GCT ATT AGT GGT AGT GGT GGT AGC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG
 AGT CGA TAA TCA CCA TCA CCA CCA TCG TGT ATG ATG CGT CTG AGG CAC
 193 K G R F T I S R D N S K N T L Y
 AAG GGC CCG TTC ACC ATC TCC CGT GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT
 TTC CCG GCC AAG TGG TAG AGG GCA CTG TTA AGG TTC TTG TGC GAC ATA
 241 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C
 CTG CAA ATG AAC AGC CTG CGT GCC GAG GAC ACC GCG GTA TAT TAC TGT
 GAC GTT TAC TTG TCG GAC GCA CCG CTC CTG TGG CCG CAT ATA ATG ACA
 289 A K S Y G A F D Y W G Q G T L V
 GCG AAA AGT TAT GGT GCT TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC
 CCG TTT TCA ATA CCA CGA AAA CTG ATG ACC CCG GTC CCT TGG GAC CAG
 337 T V S S
 ACC GTC TCG AGC
 TGG CAG AGC TCG

Фиг. 13

Последовательность модельного V_H для библиотеки 2

1 E V Q L L E S G G G L V Q P G G
 GAG GTG CAG CTG TTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT GGG GGG
 CTC CAC GTC GAC AAC CTC AGA CCC CCT CCG AAC CAT GTC GGA CCC CCC
 49 S L R L S C A A S G F T F S S Y
 TCC CTG CGT CTC TCC TGT GCA GCC TCC GGA TTC ACC TTT AGC AGC TAT
 AGG GAC GCA GAG AGG ACA CGT CCG AGG CCT AAG TGG AAA TCG TCG ATA
 97 A M E W V R Q A P G K G L E W V
GCC ATG AGC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGT CTA GAG TGG GTC
CGG TAC TCG ACC CAG GCG GTC CGA GGT CCC TTC CCA GAT CTC ACC CAG
 145 S A I S G S G G S T Y Y A D S V
 TCA GCT ATT AGT GGT AGT GGT GGT AGC ACA TAC TAC GCA GAC TCC GTG
 AGT CGA TAA TCA CCA TCA CCA CCA TCG TGT ATG ATG CGT CTG AGG CAC
 193 K G R F T I S R D N S K N T L Y
 AAG GGC CCG TTC ACC ATC TCC CGT GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT
 TTC CCG GCC AAG TGG TAG AGG GCA CTG TTA AGG TTC TTG TGC GAC ATA
 241 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C
 CTG CAA ATG AAC AGC CTG CGT GCC GAG GAC ACC GCG GTA TAT TAC TGT
 GAC GTT TAC TTG TCG GAC GCA CCG CTC CTG TGG CCG CAT ATA ATG ACA
 289 A K S Y G A X X X X F D Y W G Q
 GCG AAA AGT TAT GGT GCT NNN NNN NNN NNN TTT GAC TAC TGG GGC CAG
 CCG TTT TCA ATA CCA CGA NNN NNN NNN NNN AAA CTG ATG ACC CCG GTC
 337 G T L V T V S S
 GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCG AGC
 CCT TGG GAC CAG TGG CAG AGC TCG

Фиг. 14

Последовательность модельного V_k для библиотеки 3

1 D I Q M T Q S P S S L S A S V G
 GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA
 CTG TAG GTC TAC TGG GTC AGA GGT AGG AGG GAC AGA CGT AGA CAT CCT

49 D R V T I T C R A S Q S I S S Y
 GAC CGT GTC ACC ATC ACT TGC CCG GCA AGT CAG AGC ATT AGC AGC TAT
 CTG GCA CAG TGG TAG TGA ACG GCC CGT TCA GTC TCG TAA TCG TCG ATA

97 L N W Y Q Q K P G K A P K L L I
 TTA AAT TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG CTC CTG ATC
 AAT TTA ACC ATG GTC GTC TTT GGT CCC TTT CCG GGA TTC GAG GAC TAG

145 Y A A S S L Q S G V P S R F S G
 TAT GCT GCA TCC AGT TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA CGT TTC AGT GGC
 ATA CGA CGT AGG TCA AAC GTT TCA CCC CAG GGT AGT GCA AAG TCA CCG

193 S G S G T D F T L T I S S L Q P
 AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTG CAA CCT
 TCA CCT AGA CCC TGT CTA AAG TGA GAG TGG TAG TCG TCA GAC GTT GGA

241 E D F A T Y Y C Q Q S Y S T P N
 GAA GAT TTT GCT ACG TAC TAC TGT CAA CAG AGT TAC AGT ACC CCT AAT
 CTT CTA AAA CGA TGC ATC ATC ACA GTT CTC TCA ATG TCA TGG GGA TTA

289 T F G Q G T K V E I K R
 ACC TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CCG
 TGC AAG CCG GTT CCC TGG TTC CAC CTT TAG TTT GCC

Фиг. 15

Нуклеотидная и аминокислотная последовательность dAb против MSA

MSA 16 и MSA 26

A: MSA 16

GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT
 D I Q M T Q S P S S L S A S
 CTA CGA CAC CGT GTC ACC ATC ACT TGC CCG GCA AGT CAG AGC
 V G D R V T I T C R A S Q S
 ATT ATT AAG CAT TTA AAG TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG AAA
 I I K H L K W Y Q Q K P G K
 GCC CCT AAG CTC CTG ATC TAT GGT GCA TCC CCG TTG CAA AGT
 A P K L L I Y G A S R L Q S
 GGG GTC CCA TCA CGT TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT
 G V P S R F S G S G S G T D
 TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCT
 F T L T I S S L Q P E D F A
 ACG TAC TAC TGT CAA CAG GGG GCT CCG TGG CCT CAG ACG TTC
 T Y Y C Q Q G A R W P Q T F
 GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CCG
 G Q G T K V E I K R

B: MSA 26

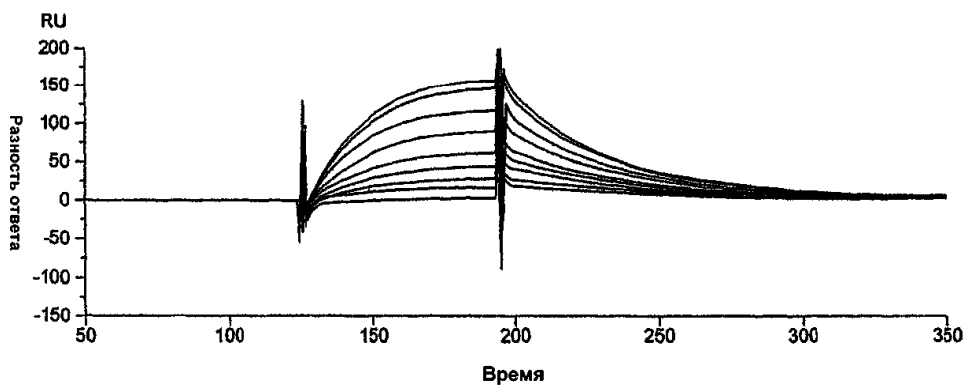
GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT
 D I Q M T Q S P S S L S A S
 GTA GGA GAC CGT GTC ACC ATC ACT TGC CCG GCA AGT CAG AGC
 V G D R V T I T C R A S Q S
 ATT TAT TAT CAT TTA AAG TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG AAA
 I Y Y H L K W Y Q Q K P G K
 GCC CCT AAG CTC CTG ATC TAT AAG GCA TCC ACG TTG CAA AGT
 A P K L L I Y K A S T L Q S
 GGG GTC CCA TCA CGT TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT
 G V P S R F S G S G S G T D
 TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCT
 F T L T I S S L Q P E D F A
 ACG TAC TAC TGT CAA CAG GTT CCG AAG GTG CCT CCG AUG TTC
 T Y Y C Q Q V R K V P R T F
 GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA CCG
 G Q G T K V E I K R

Фиг. 16

Високо-ингибирование MSA16

(a)

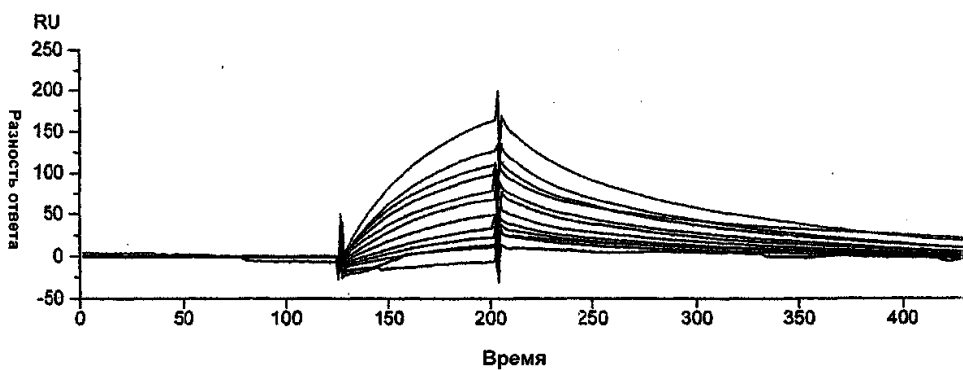
0 нМ	MSA конкуренция 19. Fc=4-3 - 10	10 нМ	MSA конкуренция 19. Fc=4-3 - 11	50 нМ	MSA конкуренция 19. Fc=4-3 - 12
100 нМ	MSA конкуренция 19. Fc=4-3 - 13	200 нМ	MSA конкуренция 19. Fc=4-3 - 14	300 нМ	MSA конкуренция 19. Fc=4-3 - 15
400 нМ	MSA конкуренция 19. Fc=4-3 - 16	600 нМ	MSA конкуренция 19. Fc=4-3 - 17	800 нМ	MSA конкуренция 19. Fc=4-3 - 18



Високо-ингибирование MSA26

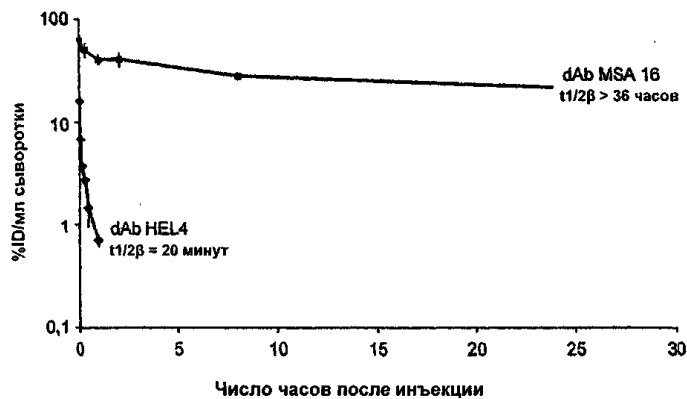
(б)

7.1.03 клон 26 ингибирует Fc=4-3 - 1	7.1.03 клон 26 ингибирует Fc=4-3 - 2	7.1.03 клон 26 ингибирует Fc=4-3 - 3
7.1.03 клон 26 ингибирует Fc=4-3 - 4	7.1.03 клон 26 ингибирует Fc=4-3 - 5	7.1.03 клон 26 ингибирует Fc=4-3 - 6
7.1.03 клон 26 ингибирует Fc=4-3 - 7	7.1.03 клон 26 ингибирует Fc=4-3 - 8	7.1.03 клон 26 ингибирует Fc=4-3 - 9
7.1.03 клон 26 ингибирует Fc=4-3 - 10	7.1.03 клон 26 ингибирует Fc=4-3 - 11	7.1.03 клон 26 ингибирует Fc=4-3 - 12

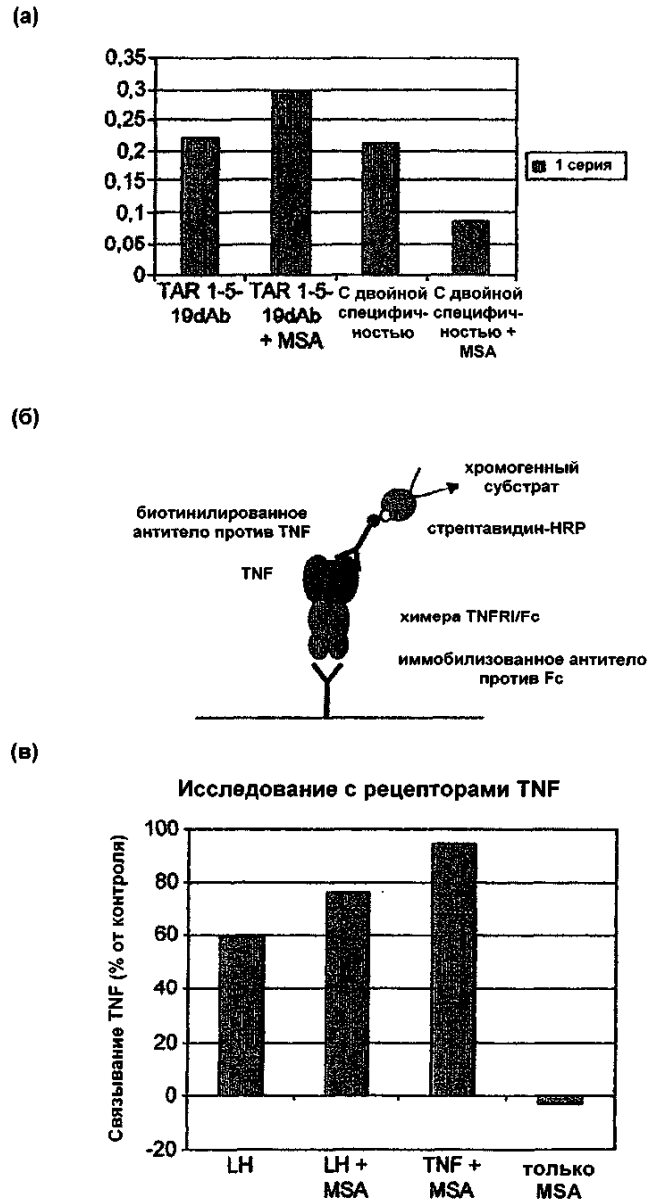


Фиг. 17

Сывороточные уровни MSA16 после инъекции

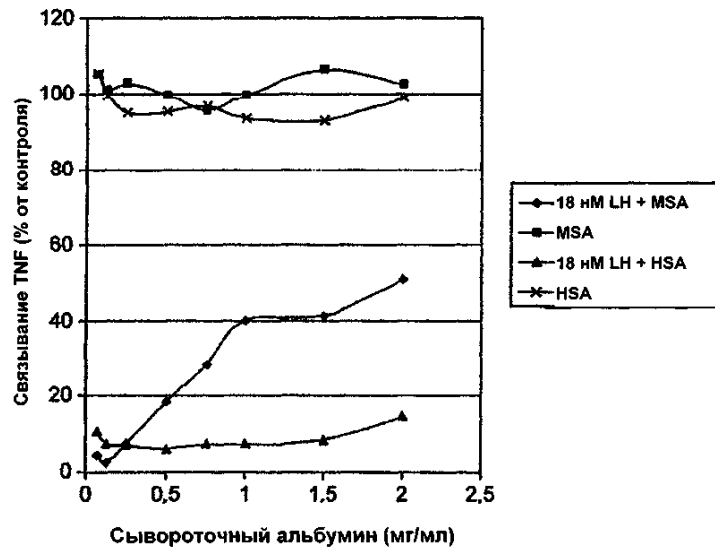


Фиг. 18

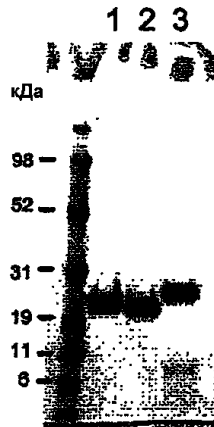


Фиг. 19

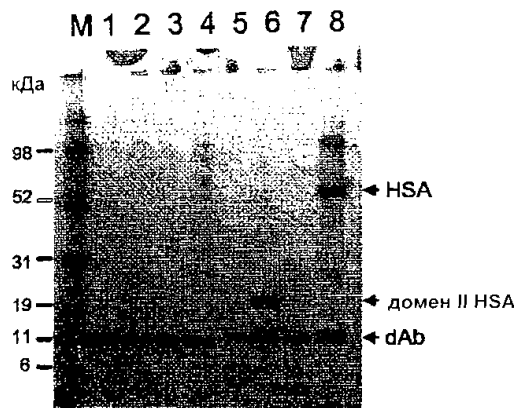
Исследование с рецепторами TNF



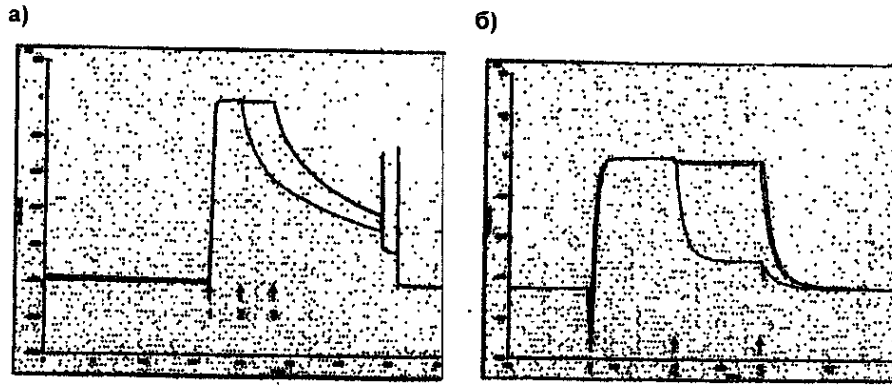
Фиг. 20



Фиг. 21



Фиг. 22



Фиг. 23

Последовательности антител клонов AlbuAb, идентифицированных фаговой селекцией

	FR1		CDR1	FR2	CDR2	FR3		CDR3	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
123456789012345678901234	56789012345678901234	45678901234	567890123456789	0123456	789012345678901234567890123456789	901234567	89012345678	901234567	89012345678
germline	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQSISSYLN	WYQQKPKGAPKLLIY	AASRLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	QQSYSTPNT	PGQGTKVEIKR	
dAb7m12	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQSIIFRHLLK	WYQQKPKGAPKLLIY	AASRLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	QQVALYPKT	PGQGTKVEIKR	
dAb7m16	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQSIKHLLK	WYQQKPKGAPKLLIY	GASRLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	QQGARWPT	PGQGTKVEIKR	
dAb7m26	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQSIYHLLK	WYQQKPKGAPKLLIY	KASLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	QQVRKVPRT	PGQGTKVEIKR	
dAb7r1	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQYIGRYLR	WYQQKPKGAPKLLIY	DSSVLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	QQRYMPPT	PGQGTKVEIKR	
dAb7r3	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQYIGRYLR	WYQQKPKGAPKLLIY	DSSVLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	QQRYMPPT	PGQGTKVEIKR	
dAb7r4	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQWIGRYLR	WYQQKPKGAPKLLIY	NGSQLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	QQRYLQPT	PGQGTKVEIKR	
dAb7r5	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQYISRQLR	WYQQKPKGAPKLLIY	GAASVLSQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	QQRYTTPPT	PGQGTKVEIKR	
dAb7r7	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQYIGRYLR	WYQQKPKGAPKLLIY	DSSVLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	QQRYSSPPT	PGQGTKVEIKR	
dAb7r8	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQWIHRQLK	WYQQKPKGAPKLLIY	YASLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	QQYFSKPST	PGQGTKVEIKR	
dAb7r13	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQHIHREL	WYQQKPKGAPKLLIY	QASRLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	QQYLRVPT	PGQGTKVEIKR	
dAb7r14	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQHIHREL	WYQQKPKGAPKLLIY	QASRLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	QQYLRVPT	PGQGTKVEIKR	
dAb7r15	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQSIGRRLK	WYQQKPKGAPKLLIY	RTSMLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	QQRYLQPT	PGQGTKVEIKR	
dAb7r16	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQKIYNNLR	WYQQKPKGAPKLLIY	NSSILQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	QQRYLSPPT	PGQGTKVEIKR	
dAb7r17	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQKIYNNLR	WYQQKPKGAPKLLIY	NTSILQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	QQRYLSPPT	PGQGTKVEIKR	
dAb7r18	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQMIYKSLG	WYQQKPKGAPKLLIY	QSSLLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	QQYHMPPT	PGQGTKVEIKR	
dAb7r19	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQMIYRHLR	WYQQKPKGAPKLLIY	DASRLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	QQYHMPPT	PGQGTKVEIKR	
dAb7h1	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQSISSYLN	WYQQKPKGAPKLLIY	RNSFLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	QQTYVPTPT	PGQGTKVEIKR	
dAb7h2	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQKIATYLN	WYQQKPKGAPKLLIY	RSSSLQS	AVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	QQTYAVPPT	PGQGTKVEIKR	
dAb7h6	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQSISSYLN	WYQQKPKGAPKLLIY	RLSVLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	QQTYNVPTPT	PGQGTKVEIKR	
dAb7h7	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQSISSYLN	WYQQKPKGAPKLLIY	RNSQLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	QQTFVAVPT	PGQGTKVEIKR	
dAb7h8	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQSISSYLN	WYQQKPKGAPKLLIY	RNSPLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	QQTYRVPTPT	PGQGTKVEIKR	
dAb7h9	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQHIGLWLH	WYQQKPKGAPKLLIY	RSSLLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	QQYKMLPPT	PGQGTKVEIKR	
dAb7h10	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQSISSYLN	WYQQKPKGAPKLLIY	RNSPLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	QQTYSIPTPT	PGQGTKVEIKR	
dAb7h11	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASRPITGTL	WYQQKPKGAPKLLIY	FGSRLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	AQAGTHPTPT	PGQGTKVEIKR	
dAb7h12	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASKYIGSQLN	WYQQKPKGAPKLLIY	WASVLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	RQGAASPTPT	PGQGTKVEIKR	
dAb7h13	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQFIYRYLS	WYQQKPKGAPKLLIY	NASYLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	QQYHMLPPT	PGQGTKVEIKR	
dAb7h14	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQWIGSQLS	WYQQKPKGAPKLLIY	WRSSLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	AQGAALPPT	PGQGTKVEIKR	
dAb7p1	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQSISSYLN	WYQQKPKGAPKLLIY	RVSVLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	SQGRVPTPT	PGQGTKVEIKR	
dAb7p2	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITC	RASQSISSYLN	WYQQKPKGAPKLLIY	YGSVLQS	GVPSRFSGSGSGTDFTLTIS	SLQPEDFATYYC	SQGRNPPTPT	PGQGTKVEIKR	

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
	1	2	3	4	5	6	7
123456789012345678901234	56789012345678901234	12345	67890123456789	0123456789012345	67890123456789012345	6789012345678901234	56789
Germline	EVQLLESGGGLVQPGSSLRLS	CAASGFTFW	PYTMS	WVRQAPGKGLLEWVS	TISPPFSITTYADSVKIG	RFTISRDNSKNTLYIQMNSLR	RAEDTAVYYCAK
dAb7r20	EVQLLESGGGLVQPGSSLRLS	CAASGFTFW	PYTMS	WVRQAPGKGLLEWVS	TISPPFSITTYADSVKIG	RFTISRDNSKNTLYIQMNSLR	RAEDTAVYYCAK
dAb7r21	EVQLLESGGGLVQPGSSLRLS	CAASGFTFW	PYTMS	WVRQAPGKGLLEWVS	TISPPFSITTYADSVKIG	RFTISRDNSKNTLYIQMNSLR	RAEDTAVYYCAK
dAb7r22	EVQLLESGGGLVQPGSSLRLS	CAASGFTFW	PYTMS	WVRQAPGKGLLEWVS	TISPPFSITTYADSVKIG	RFTISRDNSKNTLYIQMNSLR	RAEDTAVYYCAK
dAb7r23	EVQLLESGGGLVQPGSSLRLS	CAASGFTFW	PYTMS	WVRQAPGKGLLEWVS	TISPPFSITTYADSVKIG	RFTISRDNSKNTLYIQMNSLR	RAEDTAVYYCAK
dAb7r24	EVQLLESGGGLVQPGSSLRLS	CAASGFTFW	PYTMS	WVRQAPGKGLLEWVS	TISPPFSITTYADSVKIG	RFTISRDNSKNTLYIQMNSLR	RAEDTAVYYCAK
dAb7r25	EVQLLESGGGLVQPGSSLRLS	CAASGFTFW	PYTMS	WVRQAPGKGLLEWVS	TISPPFSITTYADSVKIG	RFTISRDNSKNTLYIQMNSLR	RAEDTAVYYCAK
dAb7r26	EVQLLESGGGLVQPGSSLRLS	CAASGFTFW	PYTMS	WVRQAPGKGLLEWVS	TISPPFSITTYADSVKIG	RFTISRDNSKNTLYIQMNSLR	RAEDTAVYYCAK
dAb7r27	EVQLLESGGGLVQPGSSLRLS	CAASGFTFW	PYTMS	WVRQAPGKGLLEWVS	TISPPFSITTYADSVKIG	RFTISRDNSKNTLYIQMNSLR	RAEDTAVYYCAK
dAb7r28	EVQLLESGGGLVQPGSSLRLS	CAASGFTFW	AYTMS	WVRQAPGKGLLEWVS	TISPPFSITTYADSVKIG	RFTISRDNSKNTLYIQMNSLR	RAEDTAVYYCAK
dAb7r29	EVQLLESGGGLVQPGSSLRLS	CAASGFTFW	DYIMT	WVRQAPGKGLLEWVS	MTSSGGLWITYADSVKIG	RFTISRDNSKNTLYIQMNSLR	RAEDTAVYYCAK
dAb7r30	EVQLLESGGGLVQPGSSLRLS	CAASGFTFW	DYIMG	WVRQAPGKGLLEWVS	LIKQAGSPITYADSVKIG	RFTISRDNSKNTLYIQMNSLR	RAEDTAVYYCAK
dAb7r31	EVQLLESGGGLVQPGSSLRLS	CAASGFTFW	HYRMG	WVRQAPGKGLLEWVS	WIRPDGHTITYADSVKIG	RFTISRDNSKNTLYIQMNSLR	RAEDTAVYYCAK
dAb7r32	EVQLLESGGGLVQPGSSLRLS	CAASGFTFW	WDRMG	WVRQAPGKGLLEWVS	FIGREYGYITYADSVKIG	RFTISRDNSKNTLYIQMNSLR	RAEDTAVYYCAK
dAb7r33	EVQLLESGGGLVQPGSSLRLS	CAASGFTFW	AYPMS	WVRQAPGKGLLEWVS	SISWGIGITYADSVKIG	RFTISRDNSKNTLYIQMNSLR	RAEDTAVYYCAK
dAb7h21	EVQLLESGGGLVQPGSSLRLS	CAASGFTFW	LYDMS	WVRQAPGKGLLEWVS	SIVNSGVRTITYADSVKIG	RFTISRDNSKNTLYIQMNSLR	RAEDTAVYYCAK
dAb7h22	EVQLLESGGGLVQPGSSLRLS	CAASGFTFW	KYVMS	WVRQAPGKGLLEWVS	SIDRPHGITYADSVKIG	RFTISRDNSKNTLYIQMNSLR	RAEDTAVYYCAK
dAb7h23	EVQLLESGGGLVQPGSSLRLS	CAASGFTFW	DYIMS	WVRQAPGKGLLEWVS	TITHGIGITYADSVKIG	RFTISRDNSKNTLYIQMNSLR	RAEDTAVYYCAK
dAb7h24	EVQLLESGGGLVQPGSSLRLS	CAASGFTFW	RYSMS	WVRQAPGKGLLEWVS	TILGGDQITYADSVKIG	RFTISRDNSKNTLYIQMNSLR	RAEDTAVYYCAK
dAb7h25	EVQLLESGGGLVQPGSSLRLS	CAASGFTFW	KYAMA	WVRQAPGKGLLEWVS	TILGEGNITYADSVKIG	RFTISRDNSKNTLYIQMNSLR	RAEDTAVYYCAK
dAb7h26	EVQLLESGGGLVQPGSSLRLS	CAASGFTFW	EYVMS	WVRQAPGKGLLEWVS	TILPHGDRITYADSVKIG	RFTISRDNSKNTLYIQMNSLR	RAEDTAVYYCAK
dAb7h27	EVQLLESGGGLVQPGSSLRLS	CAASGFTFW	DYRMS	WVRQAPGKGLLEWVS	TIISNGKITYADSVKIG	RFTISRDNSKNTLYIQMNSLR	RAEDTAVYYCAK
dAb7h30	EVQLLESGGGLVQPGSSLRLS	CAASGFTFW	TYTMA	WVRQAPGKGLLEWVS	SITSSGSGITYADSVKIG	RFTISRDNSKNTLYIQMNSLR	RAEDTAVYYCAK
dAb7h31	EVQLLESGGGLVQPGSSLRLS	CAASGFTFW	PTIMS	WVRQAPGKGLLEWVS	TTITIGARTITYADSVKIG	RFTISRDNSKNTLYIQMNSLR	RAEDTAVYYCAK

Фиг. 24

```

7
HSAD1 (7) DAHKS----EVAHRFKDLGHEHFKALVLLAFQAQLQCCPFEDHVKLVNEV 56
HSAD2 (7) GKASSAKQRLKCASLQKPGERAFKANAVARLSQRFFKAEFAEVSKLVTDL
HSAD3 (7) VEEPCNLLKQWCELFEQLGHEKFNALLVRYTKKVPQVSTFTLVVEVSRML
Консенсусная (7) S K C P LGE FKA LLIRFSQKLPQ F DLVKLV DL
последовательность 57 106
HSAD1 (53) TEPAKTCVAD--ESAENCDSLETLFGDKLCTVATLRETYGENADCCAKQ
HSAD2 (57) TKVHTCCBG---DLLECADDRADLAK--Y-ICENQDSISSKLRKCCSKP
HSAD3 (57) GKVGSKCKHPKAKRMPCAEYLSVVLNQLCVLHSEKTPVSDRVTKCCSTES
Консенсусная (57) TKVAS CC L CADD SL LCYL IS KL DCC K
последовательность 107 156
HSAD1 (101) EPRNECFLQHKDDNEMLPRLVREVDVM---CTAFHDNESTFLKKYLY
HSAD2 (101) LLKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADPVESKDVCKNYAERAKDVFLGMFLY
HSAD3 (107) LVNRRPCFSALEVDYTYVPKEFNAETFFHADICTLSEKERQIKKQIALV
Консенсусная (107) LLER CFA LE DE LPK AE FV DICT F D KDIFL FLY
последовательность 157 206
HSAD1 (147) EIARRHPYFYAPELLEFFAKRYKAAPTECCQAADEKAACLLPKLDELDEGEK
HSAD2 (151) EYARRHPDYSVVLLLELAKTYETTLKCCAADPHCYAKVDFEFPKPLVE
HSAD3 (157) ELVHKPKATKQQLKAVMDDEFAAFVHKCCKADDEKFTCPAEBGKLVASQ
Консенсусная (157) EIAREHP FS LL LAK Y A LKCC AADK CFA DELK
последовательность 207
HSAD1 (197) ASSAKQR
HSAD2 (201) EP-----
HSAD3 (207) AALG---
Консенсусная (207) AA A
последовательность

```

Фиг. 25

