

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201690299** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2016.11.30

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

(22) Дата подачи заявки
2014.07.30

(54) **СТАБИЛИЗАЦИЯ Fc-СОДЕРЖАЩИХ ПОЛИПЕПТИДОВ**

(31) **61/860,800**

(32) **2013.07.31**

(33) **US**

(86) **PCT/US2014/048908**

(87) **WO 2015/017548 2015.02.05**

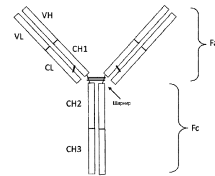
(88) **2015.11.05**

(71) Заявитель:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Каннан Гунасекаран, Лавалле
Дженнифер, Джекобсен Фредерик У.
(US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящем изобретении предложены полипептиды, содержащие Fc-область антитела, которая имеет делецию по меньшей мере одного остатка цистеина в шарнирной области и замену по меньшей мере одной аминокислоты на поверхности домена CH3 на остаток аминокислоты, содержащий сульфгидрильную группу. Также предложены гибридные Fc-белки и антитела, содержащие такие полипептиды, нуклеиновые кислоты и векторы, кодирующие указанные полипептиды, а также клетки-хозяева и способы получения указанных полипептидов.



201690299
A1

201690299
A1

СТАБИЛИЗАЦИЯ Fc-СОДЕРЖАЩИХ ПОЛИПЕПТИДОВ**ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США №61/860800, поданной 31 июля 2013 г., которая включена в настоящий документ посредством ссылки.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка включает перечень последовательностей, который был подан в электронном виде в формате ASCII и полностью включен в настоящий документ посредством ссылки. Указанная копия в формате ASCII, созданная 28 июля 2014 г., имеет название A-1852-WO-PCIT_SL.txt и размер 122 988 байтов.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Антитела стали объектом, который часто используют в биофармацевтической промышленности, поскольку они обладают рядом характеристик, привлекательных для разработчиков терапевтических молекул. Помимо того, что антитела способны связываться со специфическими структурами или клетками, они делают свои мишени восприимчивыми к фагоцитозу и элиминации, опосредованных клетками, содержащими Fc-рецепторы (Raghavan and Bjorkman 1996). Кроме того, способность антитела к pH-зависимому взаимодействию с неонатальным Fc-рецептором (FcRn) увеличивает период полувыведения антитела из сыворотки крови (Ghetie and Ward 2000). Указанное уникальное свойство антител позволяет увеличивать период полувыведения терапевтического белка или пептида из сыворотки посредством конструирования гибридных Fc-молекул.

Антитела принадлежат к белкам класса иммуноглобулинов, который включает IgG, IgA, IgE, IgM и IgD. Наиболее часто встречающийся подкласс иммуноглобулинов в сыворотке человека – IgG, схематическая структура которого представлена на фиг. 1 (Deisenhofer 1981; Huber 1984; Roux 1999). Структура IgG включает четыре цепи, две легких и две тяжелых; каждая легкая цепь содержит два домена, а каждая тяжелая цепь содержит четыре домена. Антигенсвязывающий сайт расположен в области Fab

(Fragment antigen binding, антигенсвязывающем фрагменте), которая содержит переменный домен легкой (VL) и переменный домен тяжелой (VH) цепи, а также константный домен легкой (LC) и константный домен тяжелой (CH1) цепи. Часть тяжелой цепи, включающую шарнирную область, домен CH2 и домен CH3 называют «Fc» (кристаллизуемый фрагмент). Молекулу IgG можно рассматривать как гетеротетрамер, содержащий две тяжелые цепи, которые удерживают вместе дисульфидные связи (-S-S-) в шарнирной области, и две легкие цепи. Число дисульфидных связей в шарнирной области варьирует в разных подклассах иммуноглобулинов (Paradea and Check 1989). Сайт связывания FcRn расположен в Fc-области антитела (Martin, West et al. 2001), и, соответственно, характеристика антитела, заключающаяся в увеличенном периоде полувыведения из сыворотки, определяется Fc-фрагментом. Сама по себе Fc-область может рассматриваться как гомодимер тяжелых цепей, содержащий область шарнира, домены CH2 и CH3.

Fc-область встречающихся в природе антител IgG представляет собой гомодимер; и её можно экспрессировать и очистить в виде димера. Как обсуждается выше, Fc-область антитела обеспечивает период полувыведения из сыворотки за счет механизма рециклирования FcRn. Поэтому Fc используют в качестве партнера для слияния, увеличивающего период полувыведения из сыворотки терапевтических белков, пептидов (пептител) и доменов белка. Однако для некоторых вариантов терапевтического применения может потребоваться удаление шарнирной области, устраняющее ковалентную связь между двумя полипептидными цепями, которые образуют Fc. Например, при рекомбинантном объединении Fc-области с белком, который содержит внутренние дисульфидные связи или свободные остатки цистеина, дисульфидные связи в области шарнира могут влиять на укладку и приводить к агрегации. При этом удаление шарнирной области устраняет ковалентную связь между двумя полипептидными цепями. Это может приводить к диссоциации нековалентных взаимодействий между двумя цепями Fc на этапе получения или *in vivo*, и приводить к связыванию цепей Fc с другими белками/молекулами.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Согласно настоящему описанию в настоящем документе введение дисульфидной связи в область контактной поверхности СНЗ-домена может повышать термостабильность Fc-содержащих молекул, не содержащих дисульфидных связей в составе шарнирной области. Кроме того, ковалентная связь обеспечивает интактность двух полипептидных цепей, которые образуют димер в структуре Fc, предотвращая их диссоциацию *in vitro* или *in vivo*. Как показано на Фиг. 3, согласно определенным вариантам реализации, единственной ковалентной связью между двумя цепями Fc в гомодимере Fc дикого типа с удаленным шарниром и мутантным гетеродимере Fc с удаленным шарниром является указанная введенная дисульфидная связь.

Согласно определенным вариантам реализации один или более остатков, составляющих поверхность контакта СНЗ-СНЗ на обоих доменах СНЗ, заменены на остаток аминокислоты, содержащий сульфгидрильную группу таким образом, что взаимодействие стабилизируется за счет формирования дисульфидной связи (-S-S-) между доменами СНЗ. Согласно предпочтительным вариантам реализации аминокислота указанной поверхности, такая как лейцин, треонин, серин или тирозин, заменена на цистеин или метионин, предпочтительно, на цистеин. Согласно определенным вариантам реализации указанная аминокислота заменена на неприродную аминокислоту с требуемыми характеристиками заряда, такую как гомоцистеин или глутатион.

Согласно первому аспекту настоящего изобретения полипептид содержит Fc-область антитела, имеющую делецию или замену одного или более остатков цистеина шарнирной области, и замену одной или более аминокислот контактной поверхности СНЗ на остаток аминокислоты, содержащий сульфгидрильную группу, предпочтительно, цистеин. В шарнирной области могут отсутствовать остатки цистеина в результате замены или делеции. Согласно определенным вариантам реализации шарнирная область в Fc-фрагменте отсутствует полностью. Согласно другим вариантам реализации удалена только часть шарнирной области, предпочтительно часть, содержащая остатки цистеина.

Согласно определенным вариантам реализации указанного

первого аспекта аминокислота Y349, L351, S354, T394 на контактной поверхности CH3 или Y407 заменена на остаток содержащий сульфгидрильную группу, предпочтительно цистеин. Согласно предпочтительным вариантам реализации Fc-фрагмент содержит замену L351C. При взаимодействии в подходящих условиях двух Fc-содержащих полипептидов, имеющих замену L351C, формируется дисульфидная связь между остатками L351C в двух цепях. Аналогичным образом, при взаимодействии в подходящих условиях двух Fc-содержащих полипептидов, имеющих замену T394C, формируется дисульфидная связь между остатками T394C в двух цепях. Кроме того, при взаимодействии в подходящих условиях двух Fc-содержащих полипептидов, имеющих замену Y407C, формируется дисульфидная связь между остатками Y407C в двух цепях. При взаимодействии в подходящих условиях Fc-содержащего полипептида, имеющего замену Y349C, с Fc-содержащим полипептидом, имеющим замену S354C, формируется дисульфидная связь между остатком Y349C одной цепи и остатком S354C другой цепи.

Fc-область полипептида согласно первому аспекту может включать одну или большее количество дополнительных замен аминокислот в области CH2 и/или CH3. Согласно предпочтительным вариантам реализации Fc в области CH2 включает одну или более замен аминокислот, изменяющих эффекторную функцию Fc-содержащего белка по сравнению с аналогичным белком, содержащим CH2 дикого типа. Согласно другим вариантам реализации Fc в области CH3 включает одну или более замен аминокислот, изменяющих способность Fc-содержащего полипептида к гомодимеризации и/или увеличивающих способность к гетеродимеризации с Fc-содержащим полипептидом, содержащим реципрокные замены аминокислот в области CH3.

Согласно определенным вариантам реализации указанного первого аспекта, удалены или заменены одна или большее количество аминокислот на C-конце Fc-области. Согласно предпочтительным вариантам реализации C-концевой лизин удален или заменен на другую аминокислоту. Согласно другим вариантам реализации две или три концевые аминокислоты удалены или заменены на другую аминокислоту.

Согласно определенным вариантам реализации указанного первого аспекта указанный полипептид представляет собой тяжелую цепь антитела. Согласно другим вариантам реализации указанный полипептид представляет собой гибридный Fc-белок. Указанный гибридный Fc-белок может содержать линкер на N-конце и/или C-конце молекулы Fc.

Во втором аспекте настоящего изобретения нуклеиновая кислота кодирует полипептид согласно указанному первому аспекту.

В третьем аспекте экспрессионный вектор содержит нуклеиновую кислоту согласно указанному второму аспекту, функционально связанную с регуляторной последовательностью, такой как гетерологичный промотор и/или энхансер.

В четвертом аспекте клетка-хозяин содержит экспрессионный вектор согласно указанному третьему аспекту. Согласно предпочтительным вариантам реализации указанная клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, например, дрожжевую клетку или клетку линии клеток млекопитающих. Предпочтительной линией клеток млекопитающих является линия клеток яичника китайского хомячка (CHO).

Пятый аспект настоящего изобретения представляет собой способ получения полипептида согласно указанному первому аспекту. Предложенные способы включают культивирование клетки-хозяина согласно указанному четвертому аспекту в условиях, при которых активна регуляторная область в указанной клетке-хозяине, и выделение указанного полипептида из культуры.

Согласно шестому аспекту фармацевтическая композиция содержит полипептид согласно указанному первому аспекту.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фиг. 1. Схематическое изображение антитела IgG1 с указанием доменов. Антитело IgG1 представляет собой Y-образный тетрамер, содержащий две тяжелых цепи (большей длины) и две легких цепи (меньшей длины). Указанные две тяжелых цепи соединены между собой дисульфидными связями (-S-S-) в шарнирной области. Fab - антигенсвязывающий фрагмент, Fc - кристаллизуемый фрагмент, VL - переменный домен легкой цепи, VH - переменный домен тяжелой цепи, CL - константный (без вариаций последовательности) домен

легкой цепи, СН1 – константный домен тяжелой цепи 1, СН2 – константный домен тяжелой цепи 2, СН3 – константный домен тяжелой цепи 3.

Фиг. 2. Схемы димеров Fc, в которых отсутствует шарнирная область («удаленный шарнир»), с введенной дисульфидной связью в область контактной поверхности СН3-домена, (а) в случае гомодимера Fc дикого типа и (b) в случае мутантного гетеродимера Fc, где также были введены мутации (например, мутации типа «выступы-во-впадины» или мутации пар заряженных остатков) в область контактной поверхности СН3-домена.

Фиг. 3. ДСН-ПААГ-электрофорез, дающий основную одиночную полосу, подтверждающую наличие ковалентной связи между положительно заряженными («+») и отрицательно заряженными («-») цепями Fc для гибридной конструкции гетеродимера Fc с мутацией пар заряженных остатков и удаленным шарниром с введенной дисульфидной связью L351C в область контактной поверхности СН3-домена.

Фиг. 4. Обзор фармакокинетики гетеродимерных (с мутациями пар заряженных остатков) гибридных Fc-белков, в которых отсутствует шарнирная область. А. Fc-гибрид без шарнира и без линкера между терапевтическим пептидом и Fc. В. То же, что и А, за исключением вариации в терапевтическом пептиде. С. То же, что и В, за исключением того, что Fc соединен с терапевтическим пептидом посредством негликозилированного линкера. D. То же, что и С, за исключением другого линкера. Е. То же, что и А, за исключением того, что одна цепь Fc включает замену Y349C, а другая включает замену S354C. F. То же, что и В, за исключением того, что одна цепь Fc включает замену Y349C, а другая включает замену S354C.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В настоящем документе описаны способы повышения стабильности Fc-каркасов антител, в частности, Fc-каркасов, не содержащих шарнирной области, не содержащих части шарнирной области, образующей дисульфидные связи, или отличающихся тем, что их шарнирная область включает замену одного или большего количества остатков цистеина. Такие способы включают введение

одной или большего числа сконструированных дисульфидных связей в область контактной поверхности CH3-домена.

Как видно на Фиг.1, антитело IgG1 представляет собой Y-образный тетрамер с двумя тяжелыми цепями (большей длины) и двумя легкими цепями (меньшей длины). Указанные две тяжелых цепи соединены между собой дисульфидными связями (-S-S-) в шарнирной области. Молекулу IgG можно считать гетеротетрамером, состоящим из двух тяжелых цепей, удерживаемых вместе дисульфидными связями (-S-S-) в шарнирной области, и двух легких цепей. Число дисульфидных связей в шарнире в подклассах иммуноглобулинов варьирует.

Ковалентную связь между двумя тяжелыми цепями во встречающихся в природе антителах обеспечивают дисульфидные связи в шарнирной области (контактирующей с растворителем). Соответственно, в димере Fc или антителе, не содержащем шарнирной области, ковалентная связь между двумя тяжелыми цепями отсутствует. Дисульфиды шарнирной области, наряду с дисульфидной связью между легкими и тяжелыми цепями (CL-CH1), удерживают все четыре цепи в ковалентно связанном состоянии. Молекулярная масса интактного антитела составляет приблизительно 150 кДа, и оно образует одну полосу при анализе способом невосстанавливающего ДСН-ПААГ-электрофореза. Дисульфидная связь в области контактной поверхности CH3-домена в IgG1 / Fc дикого типа (WT) отсутствует.

Примером последовательности аминокислот IgG1 Fc человека является

```
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 9)
```

В приведенной выше последовательности DKTHTCPPCPAPELLGG (SEQ ID NO: 10) соответствует шарнирной области.

Аминокислоты, составляющие поверхность контакта CH3-CH3, описаны в следующих предварительных заявках того же заявителя: 61/019569, поданной 1/7/2008, и 61/120305, поданной 12/5/09, а также PCT/US2009/000071, поданной 1/6/2009 (все указанные источники полностью включены в настоящий документ посредством

ссылки).

Всего было идентифицировано 48 кристаллических структур антител с координатами, соответствующими Fc-области из Базы данных белковых структур (PDB) (Bernstein, Koetzle et al. 1977), с применением алгоритма поиска на основе структуры (Ye and Godzik 2004). Исследование идентифицированных кристаллических структур Fc показало, что структура, определенная при максимальном разрешении, соответствует Fc-фрагменту ритуксимаба, связанному с минимизированным вариантом В-домена белка А, называемым Z34C (код PDB: 1L6X). Биологическую структуру гомодимера Fc для 1L6X устанавливали с использованием координат и кристаллической симметрии осажденного мономера Fc. Для идентификации остатков, участвующих во взаимодействии CH3-CH3-доменов, использовали два способа: (i) контактный способ, основанный на критерии предельного расстояния и (ii) анализ площади доступной для растворителя поверхности.

В соответствии с контактным способом остатки на поверхности по определению представляют собой остатки, тяжелые атомы боковых цепей которых расположены ближе установленного предела к тяжелым атомам любых остатков второй цепи. Хотя предельное расстояние 4,5А является предпочтительным, для идентификации остатков контактной поверхности можно использовать и большее предельное расстояние (например, 5,5А) (Bahar and Jernigan 1997).

Второй способ включает вычисление площади доступной для растворителя поверхности (ASA) остатков CH3-домена в присутствии и в отсутствие второй цепи (Lee and Richards 1971). Остатки, демонстрирующие разную ASA ($>1 \text{ \AA}^2$) в двух расчетах, идентифицируют как остатки контактной поверхности. С помощью обоих способов был идентифицирован аналогичный набор остатков поверхности контакта. Кроме того, полученные данные согласовались с опубликованным исследованием (Miller 1990).

В Таблице 1 приведены 24 остатка поверхности контакта, идентифицированные с применением критерия контактного способа при пределе расстояния 4,5А. Дополнительно исследовали консервативность структуры указанных остатков. С указанной целью 48 идентифицированных в PDB кристаллических структур Fc

совмещали и анализировали путем вычисления среднеквадратичного отклонения для тяжелых атомов боковых цепей. Обозначения остатков основаны на системе нумерации EU по Kabat, соответствующей также нумерации в Базе данных белковых структур (PDB).

Таблица 1

<i>Остатки контактной поверхности цепи А</i>	<i>Остатки контактной поверхности цепи В</i>
GLN A 347	LYS B 360'
TYR A 349	SER B 354' ASP B 356' GLU B 357' LYS B 360'
THR A 350	SER B 354' ARG B 355'
LEU A 351	LEU B 351' PRO B 352' PRO B 353' SER B 354' THR B 366'
SER A 354	TYR B 349' THR B 350' LEU B 351'
ARG A 355 ^b	THR B 350'
ASP A 356	TYR B 349' LYS B 439'
GLU A 357	TYR B 349' LYS B 370'
LYS A 360 ^b	GLN B 347' TYR B 349'
SER A 364	LEU B 368' LYS B 370'
THR A 366	LEU B 351' TYR B 407'
LEU A 368	SER B 364' LYS B 409'
LYS A 370	GLU B 357' SER B 364'
ASN A 390	SER B 400'
LYS A 392	LEU B 398' ASP B 399' SER B 400' PHE B 405'
THR A 394	THR B 394' VAL B 397' PHE B 405' TYR B 407'
PRO A 395	VAL B 397'
VAL A 397	THR B 393' THR B 394' PRO B 395'
ASP A 399	LYS B 392' LYS B 409'
SER A 400	ASN B 390' LYS B 392'
PHE A 405	LYS B 392' THR B 394' LYS B 409'
TYR A 407	THR B 366' THR B 394' TYR B 407' SER B 408' LYS B 409'
LYS A 409	LEU B 368' ASP B 399' PHE B 405' TYR B 407'

LYS A 439

ASP B 356'

Определяли кристаллическую структуру Fc дикого типа и анализировали её на наличие потенциальных положения для введения остатков цистеина для сконструированной дисульфидной связи. В частности, были выбраны остатки T394 и L351. Остатки T394 цепей Fc дикого типа расположены рядом в области контактной поверхности СН3-домена. Мутация с заменой T394 на цистеин в обеих цепях Fc обеспечивает образование дисульфидной связи. Аналогичным образом, остатки L351 цепей Fc дикого типа расположены рядом в области контактной поверхности СН3-домена. Мутация с заменой L351 на цистеин в обеих цепях Fc также обеспечивает образование дисульфидной связи. Мутация с заменой на цистеин как T394, так и L351 в обеих цепях Fc обеспечивает образование двух дисульфидных связей.

Поскольку в дисульфидной связи задействованы одни и те же остатки на обеих цепях, как положение T394, так и L351 подходит для применения в случае гомодимеров Fc дикого типа, а также сконструированных гетеродимеров Fc, таких как цепи Fc с мутациями типа «выступы-во-впадины» или мутациями пар заряженных остатков.

Положения Y349 и S354 расположены рядом на контактной поверхности СН3 Fc дикого типа. В гетеродимере Fc одна область СН3 может включать замену Y349C, а другая СН3 область может включать замену S354C. Было обнаружено, что стабильность гетеродимеров с парами заряженных остатков, содержащих мутации типа «цистеиновый зажим» (Y349C/S354C), выше, чем у гетеродимеров, не содержащих цистеиновый зажим. В частности, мономеры гетеродимеров с парами заряженных остатков без цистеинового зажима были представлены в виде отдельных полос на ДСН-ПААГ, тогда как гетеродимеры с парами заряженных остатков с мутацией типа «цистеиновый зажим» были представлены в виде одной полосы. То же самое было справедливо и для гетеродимеров с парами заряженных остатков, содержащих (L351C/L351C) мутацию типа «цистеиновый зажим».

Гетеродимеры, содержащие первую СН3-содержащую молекулу, включающую замену Y349C, и вторую СН3-содержащую молекулу,

включающую замену S354C, демонстрировали более высокую стабильность и более высокий процент гетеродимеров по сравнению с содержащими в указанных положениях остатки аминокислот дикого типа. Кроме того, гетеродимеры, содержащие первую и вторую СН3-содержащую молекулу, каждая из которых включала замену L351C, демонстрировали более высокую стабильность и более высокую продуктивность, чем содержащие L351 молекулы.

Остатки контактной поверхности в составе домена СН3 демонстрируют тенденцию к высокой консервативности в различных подклассах и классах антител, и даже у разных видов. Соответственно, хотя предложенные варианты реализации относятся к IgG1 человека, конструирование с использованием цистеинов подходит и для других Fc-содержащих молекул. Примеры последовательностей Fc представлены ниже. Остатки, соответствующие Y349, L351, S354, T394 или Y407 IgG1 человека в составе приведенных ниже последовательностей могут быть заменены на содержащий сульфгидрил остаток, предпочтительно цистеин. Соответствующие остатки IgG человека других подклассов выделены жирным шрифтом.

>IGHG1 человека (SEQ ID NO: 11)

PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPP
VLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>IGHG2 человека (SEQ ID NO: 12)

RKCCVECPSPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDS
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

>IGHG3 человека (SEQ ID NO: 13)

LKTP LGDTTHTCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQ
FKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTT
PPMLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

>IGHG4 человека (SEQ ID NO: 14)

SKYGPPCPSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYV

DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKA
 KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
 SDGSFFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSSLGK

>IGHG1 мыши (SEQ ID NO: 15)

VPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVL TITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVD
 DVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTK
 GRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPI MNT
 NGSYFVYSKLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGK

>IGHG2A мыши (SEQ ID NO: 16)

DKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDD
 PDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPA
 PIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWTNNGKTELN
 YKNTPEVLDS DGSYFMYSKLRVEKKNWVERNYSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

>IGHG2B мыши (SEQ ID NO: 17)

EPSPGPISTINPCPPCKECHKCPAPNLEGGPSVFI FPPNIKDVL MISLTPKVTCVVVDVSE
 DDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTIRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDL
 PSPIERTISKIKGLVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWTNNGKTELN
 ENYKDTAPVLDS DGSYFIYSKLVNMKTSKWEKTD SFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK

>IGHG2C мыши (SEQ ID NO: 18)

EPRVPITQNPCPPLKECPPCAAPDLLGGPSVFI FPPKIKDVL MISLSPMVTCVVVDVSED
 DDPDVQISWVFNNEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNRALP
 SPIERTISKIPRGVVRAPQVYVLPPEEEMTKKEFSLTCMITGFLPAEIAVDWTSNGRTEQ
 NYKNTATVLDSDGSYFMYSKLRVQKSTWERGSLFACSVVHEVLHNHLTTKTI SRSLGK

>IGHG3 мыши (SEQ ID NO: 19)

EPRI PKPSTPPGSSCPPGNILGGPSVFI FPPKPKDAL MISLTPKVTCVVVDVSEDDPDVH
 VSWFVDNKEVHTAWTQPREAQYNSTFRVVSALPIQHQDWMRGKEFKCKVNNKALPAPIER
 TISKPKGRAQTPQVYTI PPPREQMSKKVSLTCLVTNFFSEAI SVEWERNGELEQDYKNT
 PPILDS DGTYFLYSKLVDTDSWLQGEIFTCSVVHEALHNHHTQKNLSRSPGK

>IGHG1 овцы (SEQ ID NO: 20)

EPGCPDPCKHCRCPPPELPGGPSVFI FPPKPKDVL TITLTPKVTCVVVDVGQDDPEVQFS
 WFVDNVEVRTARTKPREEQFNSTFRVVSALPIQHQDWTGGKEFKCKVHNEALPAPIVRTI
 SRTKGQAREPQVYVLPPEEELSKSTLSVTCLVTGFYPDYIAVEWQKNGQPESEDKYGTT
 TSQLDADGSYFLYSRLRVDKNSWQEGDTYACVVMHEALHNHYTQKSI SKPPGK

>IGHG2 овцы (SEQ ID NO: 21)

GISSDYSKCSKPPCVSRPSVFI FPPKPKDSL MITGTPEVTCVVVDVQGDPEVQFSWFVDN
 VEVRTARTKPREEQFNSTFRVVSALPIQHHDHWTGGKEFKCKVHSGKLPAPIVRTISRAGK

QAREPQVYVLAPPQEELSKSTLSVTCLVTGFYPDYIAVEWQRRARQPESEDKYGTTTSQLD
ADGSYFLYSRLRVDKSSWQRGDTYACVVMHEALHNHYTQKSIKPPGK

>IGHG1 коровы (SEQ ID NO: 22)

DPTCKPSPCDCCPPPELPGGSPVFI FPPKPKDTLTISGTPEVTCVVVDVGHDDPEVKFSW
FVDDVEVNTATTKPREEQFNSTYRVVSALRIQHQDWTGGKEFKCKVHNEGLPAPIVRTIS
RTKGPAREPQVYVLAPPQEELSKSTVSLTCMVTSFYDPYIAVEWQRNGQPESEDKYGTTT
PQLDADSSYFLYSKLRVDRNSWQEGDTYTCVVMHEALHNHYTQKSTSKSAGK

>IGHG2 коровы (SEQ ID NO: 23)

GVSSDCSKPNNQHCCVREPSVFI FPPKPKDTLMITGTPEVTCVVVNVGHDNPEVQFSWFV
DDVEVHTARTKPREEQFNSTYRVVSALPIQHQDWTGGKEFKCKVNIKGLSASIVRIISRS
KGPAREPQVYVLDPPKEELSKSTVSVTCMVIGFY PEDVDVEWQRDRQTESEDKYRTPPQ
LDADRSYFLYSKLRVDRNSWQRGDTYTCVVMHEALHNHYMQKSTSKSAGK

>IGHG3 коровы (3) (SEQ ID NO: 24)

KSEVEKTPCQCSKCPEPLGGLSVFI FPPKPKDTLTISGTPEVTCVVVDVGQDDPEVQFSW
FVDDVEVHTARTKPREEQFNSTYRVVSALRIQHQDWLQKKEFKCKVNNKGLPAPIVRTIS
RTKGQAREPQVYVLAPPREELSKSTLSLTCLITGFYP EIDVEWQRNGQPESEDKYHTTA
PQLDADGSYFLYSKLRVNKSSWQEGDHYTCAVMHEALRNHYKEKSI SRSPGK

>IGHG1 крысы (SEQ ID NO: 25)

VPRNCGGDCKPCICTGSEVSSVFI FPPKPKDVLITITLTPKVTCVVVDISQDDPEVHFSWF
VDDVEVHTAQTRPREEQFNSTFRSVSELPILHQDWLNGRTFRCKVTSAAFPSPIEKTISK
PEGRTQVPHVYTMSPKTEEMTQNEVSITCMVKG FYPPDIYVEWQMNGQPQENYKNTPTM
DTDGSYFLYSKLNKKEKWQQGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK

>IGHG2A крысы (SEQ ID NO: 26)

VPRECNPCGCTGSEVSSVFI FPPKTKDVLITITLTPKVTCVVVDISQNDPEVRF SWFIDDV
EVHTAQTHAPEKQSNSTLRVSELPVHRDWLNGKTFKCKVNSGAFPAPIEKSIKPEGT
PRGPQVYTMAPPKEEMTQSQVSITCMVKG FYPPDIYTEWKMNGQPQENYKNTPTMDTDG
SYFLYSKLNKKEKWQQGNTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK

>IGHG2B крысы (SEQ ID NO: 27)

ERRNGGIGHKCPCTCPTCHKCPPELLGGPSVFI FPPKPKDILLISQNAKVTCVVVDVSEE
EPDVQFSWFVNNVEVHTAQTPREEQYNSTFRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKALP
SPIEKTISKPKGLVRKPQVYVMGPPTEQLTEQTVSLTCLTSGFLPNDIGVEWTSNGHIEK
NYKNTEPVMDS DGSFFMYSKLNVERSRWDSRAPFVCSVVHEGLHNHHVEKSI SRPPGK

>IGHG кролика (SEQ ID NO: 28)

APSTCSKPTCPPPELLGGPSVFI FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSEDDPEVQFTWYI
NNEQVRTARPLREQQFNSTIRVVSTLPIAHEDWLRGKEFKCKVHNKALPAPIEKTISKA
RGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLD

SDGSYFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK

>IGHG1 лошади (SEQ ID NO: 29)

EPIPDNHQKVCDSKCPKCPAPELLGGPSVFI FPPNPKDTLMI TRTPEVTCVVVDVSQEN
 PDVKFNWYMDGVEVRTATTRPKEEQFNSTYRVVSVLRIQHQDWLSGKEFKCKVNNQALPQ
 PIERTITKTKGRSQEPQVYVLAPHPDEDSKSKVSVTCLVKDFYPPEINIEWQSNGQPELE
 TKYSTTQAQQDSGDGSYFLYSKLSVDRNRWQQGTTFTCGVMHEALHNHYTQKNVSKNPGK

>IGHG2 лошади (SEQ ID NO: 30)

ARVTPVCSLCRGRYPHPIGGPSVFI FPPNPKDALMIS RTPVVT CVVNLSDQYPDVQFSW
 YVDNTEVHSAITKQREAQFNSTYRVVSVLPIQHQDWLSGKEFKCSVTNVGVPQPI SRAIS
 RGKGPSRVPQVYVLPPHPDELAKSKVSVTCLVKDFYPPDISVEWQSNRWPELEGKYSTTP
 AQLDGDGSYFLYSKLSLET SRWQQVESFTCAVMHEALHNHFTKTDISESLGK

>IGHG3 лошади (SEQ ID NO: 31)

EPVLPKPTTPARTVPLTTTVPVETTTTPPCPCCEPKCPAPELLGGPSVFI FPPKPKDVLMI
 TRTPEVTCLVVDVSHDSSDVLFTWYVDGTEVKTAKTMPNEEQNNSTYRVVSVLRIQHQDW
 LNGKFKCKVNNQALPAPVERTISKATGQTRVPQVYVLAPHPDELSKNKSVTCLVKDFL
 PTDITVEWQSNEHPEPEGKYRTTEAQKDSGDGSYFLYSKLTVETDRWQQGTTFTCVVMHEA
 LHNHVMQKNVSHSPGK

>IGHG4 лошади (SEQ ID NO: 32)

VIKECGGCPTCPECLSVGPSVFI FPPKPKDVLMI SRTPTVTCVVVDVGHDFPDVQFNWYV
 DGVETHHTATTEPKQEQQNNSTYRVVSVLAIQHKDWLSGKEFKCKVNNQALPAPVQKTISKP
 TGQPREPQVYVLAPHRAELSKNKVSVTCLVKDFYPTDIDIEWKSNGQPEPETKYSTTPAQ
 L DSDGSYFLYSKLTVETNRWQQGTTFTCAVMHEALHNHYTEKSVSKSPGK

>IGHG5 лошади (SEQ ID NO: 33)

VVKGSPCPCPAPPELPGGPSVFI FPPKPKDVLKISRKPEVTCVVVDLGHDDPDVQFTWV
 DGVETHHTATTEPKEEQFNSTYRVVSVLPIQHQDWLSGKEFKCSVTNKALPAPVERTT SKA
 KGQLRVPQVYVLAPHPDELAKNTVSVTCLVKDFYPPPEIDVEWQSNEHPEPEGKYSTTPAQ
 LNSDGSYFLYSKLSVETSRWKQGESFTCGVMHEAVENHYTQKNVSHSPGK

>IGHG6 лошади (SEQ ID NO: 34)

VIKEPCCCPKCPDSKFLGRPSVFI FPPNPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQENPDVKFNWY
 VDGVEAHTATTKAKEKQDNSTYRVVSVLPIQHQDWRRGKEFKCKVNNRALPAPVERTITK
 AKGELQDPKVYILAPHREEVTKNVSVTCLVKDFYPPDINVEWQSNEEPEPEVKYSTTPA
 QLDGDGSYFLYSKLTVETDRWEQGESFTCVVMHEAIRHTYRQKSITNFP GK

>IGHG1 макака-крабоеда (SEQ ID NO: 35)

EIKTCGGGSKPPTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPD
 VKFNWYVNGAEVHHAQTKPRETQYNSTYRVVSVLTVTHQDWLNGKEYTCKVSNKALPAPI
 QKTISKDKGQPREPQVYTLPPSREELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIVEWESSGQPE NTYK

TTPPVLDSDGSYFLYSKLTVDKSRWRQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> IGHG1 макака-резуса (SEQ ID NO: 36)

EIKTCGGGSKPPTCPPCTSPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPD
VKFNWYVNGAEVHHAQTKPRETQYNSTYRVVSVLTVTHQDWLNGKEYTCKVSNKALPAPI
QKTISKDKGQPREPQVYTLPPSREELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIVVEWESSGQPENTYK
TTPPVLDSDGSYFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> IGHG2 макака-резуса (SEQ ID NO: 37)

GLPCRSTCPPCPAELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEEPDKFNWYV
DGVEVHNAQTKPREEQFNSTYRVVSVLTVTHQDWLNGKEYTCKVSNKALPAPKQKTVSKT
KGQPREPQVYTLPPPRKELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIVVEWASNGQPENTYKTTTPVLD
SDGSYFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

> IGHG3 макака-резуса (SEQ ID NO: 38)

EFTPPCGDTPPPCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV
QFNWYVDGAEVHHAQTKPREEQFNSTYRVVSVLTVTHQDWLNGKEYTCKVSNKGLPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYILPPPQEELTKNQVSLTCLVTGFYPSDIAVEWESNGQPENTYKT
TPPVLDSDGSYFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSVSP

> IGHG1 свиньи (SEQ ID NO: 39)

GIHQPQTCPICPGCEVAGPSVFIFFPKPKDTLMISQTPEVTCVVVDVSKEHAEVQFSWYV
DGVEVHTAETRPKEEQFNSTYRVVSVLPIQHQDWLKGKEFKCKVNNVDLPAPITRTISKA
IGQSREPQVYTLPPPAEELSRKVTTLCLVIGFYPPDIHVEWKSNGQPEPENTYRTPPQ
QDVDGTFFLYSKLAVDKARWDHGDKFECAMHEALHNHYTQKSISKTOGK

> IGHG2A свиньи (SEQ ID NO: 40)

GTKTKPPCPICPACESPGPSVFIFFPKPKDTLMISRTPOVTCVVVDVSQENPEVQFSWYV
DGVEVHTAQTRPKEEQFNSTYRVVSVLPIQHQDWLNGKEFKCKVNNKDLPAPITRIISKA
KGQTRPQVYTLPPHAEELSRKVSITCLVIGFYPPDIDVEWQRNGQPEPEGNRYRTPPQ
QDVDGTFFLYSKFSDKASWQGGGIFQCAVMHEALHNHYTQKSISKTPGK

> IGHG2B свиньи (SEQ ID NO: 41)

GTKTKPPCPICPACESPGPSVFIFFPKPKDTLMISRTPOVTCVVVDVSQENPEVQFSWYV
DGVEVHTAQTRPKEEQFNSTYRVVSVLPIQHQDWLNGKEFKCKVNNKDLPAPITRIISKA
KGQTRPQVYTLPPHAEELSRKVSITCLVIGFYPPDIDVEWQRNGQPEPEGNRYRTPPQ
QDVDGTFFLYSKFSDKASWQGGGIFQCAVMHEALHNHYTQKSISKTPGK

> IGHG3 свиньи (SEQ ID NO: 42)

GTKTKPPCPICPGCEVAGPSVFIFFPKPKDTLMISQTPEVTCVVVDVSKEHAEVQFSWYV
DGVEVHTAETRPKEEQFNSTYRVVSVLPIQHQDWLKGKEFKCKVNNVDLPAPITRTISKA
IGQSREPQVYTLPPPAEELSRKVTVTCLVIGFYPPDIHVEWKSNGQPEPEGNRYRTPPQ
QDVDGTFFLYSKLAVDKARWDHGETFECAMHEALHNHYTQKSISKTOGK

>IGHG4 свиньи (SEQ ID NO: 43)

GTKTKPPCPICPACEGPGPSAFIFPPKPKDTLMISRTPKVTCTVVVDVSQENPEVQFSWYV
 DGVEVHTAQTRPKKEEQFNSTYRVVSVLPIQHQDWLNGKEFKCKVNNKDLPAPI TRIISKA
 KGQTRREPQVYTLPPPTTEELSRKSVTLTCLVTGFYPPDIDVEWQRNGQPEPEGNYRTPPQ
 QDVDGTYFLYSKLAVDKASWQRGDTFQCAVMHEALHNHYTQKSI FKTPGK

>IGHG5 свиньи (SEQ ID NO: 44)

GRPCPICPACEGPGPSAFIFPPKPKDTFMISRTPKVTCTVVVDVSQENPEVQFSWYVDGVE
 VHTAQTRPKKEEQFNSTYRVVSVLPIQHQDWLNGKEFKCKVNNKDLPAPI TRIISKAKGQT
 REPQVYTLPPPTTEELSRKLSVTCLITGFYPPDIDVEWQRNGQPEPEGNYRTPPQQD
 GTYFLYSKLAVDKASWQRGDPFQCAVMHEALHNHYTQKSI FKTPGN

Согласно определенным вариантам реализации полипептид, содержащий область CH3, представляет собой молекулу IgG и дополнительно содержит домены CH1 и CH2. Примеры последовательностей IgG человека включают константные области IgG1 (например, SEQ ID NO:1), IgG2 (например, SEQ ID NO:2), IgG3 (например, SEQ ID NO:3) и IgG4 (например, SEQ ID NO:4).

Fc-область также может входить в состав или происходить из константной области тяжелой цепи IgA (например, SEQ ID NO:5), IgD (например, SEQ ID NO:6), IgE (например, SEQ ID NO:7) и IgM (например, SEQ ID NO: 8).

Предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения включают, не ограничиваясь перечисленными, антитело, биспецифическое антитело, моноспецифическое моновалентное антитело, биспецифическое макситело (макситело относится к scFv-Fc), монотело, пептитело, биспецифическое пептитело, моновалентное пептитело (пептид, соединенный с одним плечом гетеродимерной молекулы Fc) и гибридный белок рецептор-Fc.

Согласно некоторым вариантам реализации указанная стратегия может использоваться наряду с другими стратегиями для изменения взаимодействий доменов антитела, например, изменения CH3-домена для уменьшения или стимуляции способности указанного домена к взаимодействию с самим собой.

Если замены скоординированы надлежащим образом, изменения способствуют образованию дисульфидной связи между остатками контактной поверхности, которая стабилизирует формирование гетеродимера.

Согласно определенным аспектам настоящего изобретения предложен способ получения гетеродимерного белка. Указанный гетеродимер может содержать первый СНЗ-содержащий полипептид и второй СНЗ-содержащий полипептид, которые при объединении образуют контактную поверхность, сконструированную для стимуляции и стабилизации формирования гетеродимера. Указанные первый СНЗ-содержащий полипептид и второй СНЗ-содержащий полипептид сконструированы таким образом, что в состав контактной поверхности входят одна или большее количество аминокислот, содержащих сульфгидрильную группу, расположение которых обеспечивает образование дисульфидной связи между сульфгидрильной группой аминокислоты на первом СНЗ-содержащем гетеродимере и сульфгидрильной группой аминокислоты на втором СНЗ-содержащем гетеродимере.

Согласно определенным вариантам реализации СНЗ-содержащий полипептид содержит Fc-область IgG, предпочтительно происходящую из Fc-область IgG человека дикого типа. Под Fc IgG человека «дикого типа» понимается последовательность аминокислот, которая встречается в природе в популяции человека. Разумеется, как может незначительно варьировать последовательность Fc у разных индивидуумов, так же одно или несколько изменений может быть внесено в последовательность дикого типа; при этом она по-прежнему будет входить в объем настоящего изобретения. Например, Fc-область может включать дополнительные изменения, не связанные с настоящим изобретением, такие как мутация в сайте гликозилирования, включение не встречающейся в природе аминокислоты, мутации типа «выступы-во-впадины» или мутации пар заряженных остатков.

Дополнительные мутации, которые могут быть внесены в Fc IgG1, включают облегчающие образование гетеродимера между Fc-содержащими полипептидами. Согласно некоторым вариантам реализации Fc-область сконструирована так, чтобы формировались «выступы» и «впадины», облегчающие образование гетеродимера двух разных Fc-содержащих полипептидных цепей при совместной экспрессии в клетке. Патент США 7695963. Согласно другим вариантам реализации Fc-область изменяют с использованием

эффекта электростатического взаимодействия для стимуляции формирования гетеродимера наряду с предотвращением образования гомодимера двух разных Fc-содержащих полипептидов при совместной экспрессии в клетке. WO 09/089004, включенная в настоящий документ посредством ссылки полностью. Предпочтительные гетеродимерные Fc включают Fc, одна цепь которых включает замены D399K и E356K, а другая цепь включает замены K409D и K392D. Согласно другим вариантам реализации одна цепь Fc включает замены D399K, E356K и E357K, а другая цепь Fc включает замены K409D, K392D и K370D.

Тяжелые цепи могут также содержать одну или большее количество мутаций, влияющих на связывание антитела, содержащего указанные тяжелые цепи, с одним или большим количеством Fc-рецепторов. Одна из функций Fc-части антитела заключается в коммуникации с иммунной системой при связывании антителом мишени. Указанную коммуникацию называют «эффекторной функцией». Коммуникация обуславливает антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ), антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ) и/или комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ). АЗКЦ и АЗКФ опосредованы связыванием Fc с Fc-рецепторами на поверхности клеток иммунной системы. КЗЦ опосредована связыванием Fc с белками системы комплемента, например, C1q.

Подклассы IgG варьируют в отношении способности опосредовать эффекторные функции. Например, IgG1 значительно превосходит IgG2 и IgG4 в отношении опосредования АЗКЦ и КЗЦ. Эффекторная функция антитела может быть увеличена или уменьшена путем введения в Fc одной или нескольких мутаций. Варианты реализации настоящего изобретения включают Fc-содержащие белки, например, антитела или гибридные Fc-белки, содержащие Fc, сконструированный для увеличения эффекторной функции (U.S. 7317091 и Strohl, *Curr. Opin. Biotech.*, 20:685-691, 2009; оба источника включены в настоящий документ посредством ссылки полностью). Примеры молекул Fc IgG1 с повышенной эффекторной функцией включают (согласно системе нумерации Eu) содержащие следующие замены:

S239D/I332E

S239D/A330S/I332E
S239D/A330L/I332E
S298A/D333A/K334A
P247I/A339D
P247I/A339Q
D280H/K290S
D280H/K290S/S298D
D280H/K290S/S298V
F243L/R292P/Y300L
F243L/R292P/Y300L/P396L
F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L
G236A/S239D/I332E
K326A/E333A
K326W/E333S
K290E/S298G/T299A
K290N/S298G/T299A
K290E/S298G/T299A/K326E
K290N/S298G/T299A/K326E
K334V
L235S+S239D+K334V
Q311M+K334V
S239D+K334V
F243V+K334V
E294L+K334V
S298T+K334V
E233L+Q311M+K334V
L234I+Q311M+K334V
S298T+K334V
A330M+K334V
A330F+K334V
Q311M+A330M+K334V
Q311M+A330F+K334V
S298T+A330M+K334V
S298T+A330F+K334V
S239D+A330M+K334V
S239D+S298T+K334V

L234Y+K290Y+Y296W

L234Y+F243V+ Y296W

L234Y+E294L+ Y296W

L234Y + Y296W

K290Y + Y296W

Дополнительные варианты реализации настоящего изобретения включают Fc-содержащие белки, например, антитела или гибридные Fc-белки, с Fc, сконструированным таким образом, чтобы понижать эффекторную функцию. Примеры молекул Fc с пониженной эффекторной функцией включают (при использовании системы нумерации Eu) содержащие следующие замены:

N297A или N297Q (IgG1)

L234A/L235A (IgG1)

V234A/G237A (IgG2)

L235A/G237A/E318A (IgG4)

H268Q/V309L/A330S/A331S (IgG2)

C220S/C226S/C229S/P238S (IgG1)

C226S/C229S/E233P/L234V/L235A (IgG1)

L234F/L235E/P331S (IgG1)

S267E/L328F (IgG1)

Другой способ повышения эффекторной функции содержащих Fc IgG белков заключается в уменьшении фукозилирования Fc. Удаление коровой фукозы из олигосахаридов типа биантенарных комплексов, присоединенных к Fc, значительно повышало эффекторную функцию АЗКЦ без изменения связывания антигена или эффекторной функции КЗЦ. Известен ряд способов уменьшения или предотвращения фукозилирования содержащих Fc молекул, например, антител. Они включают рекомбинантную экспрессию в определенных линиях клеток млекопитающих, в том числе линии клеток, с нокаутом FUT8, варианте линии клеток CHO Lec13, линии клеток гибридомы крысы YB2/0, линии клеток, содержащей малые интерферирующие РНК, направленные конкретно против гена FUT8, и линии клеток, коэкспрессирующих β -1,4-N-ацетилглюкозаминилтрансферазу III и α -маннозидазу II комплекса Гольджи. Как вариант, содержащая Fc молекула может экспрессироваться в не принадлежащей

млекопитающему клетке, такой как растительная, дрожжевая или прокариотическая клетка, например, *E. coli*. Соответственно, согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения композиция содержит Fc, отличающийся пониженным фукозилированием или полностью нефукозилированный.

Известно, что IgG1 человека содержит участок гликозилирования в положении N297 (система нумерации EU), и гликозилирование вносит вклад в эффекторную функцию антител IgG1. Группы вводили мутации по остатку N297 с целью получения агликозилированных антител. Указанные мутации в основном относились к заменам N297 на аминокислоты, напоминающие аспарагин в физико-химическом отношении, например, на глутамин (N297Q) или на аланин (N297A), который имитирует аспарагины без полярных групп.

В настоящем документе «агликозилированное антитело», или «агликозилированный Fc» относится к статусу гликозилирования остатка в положении 297 в составе Fc. Антитело или другая молекула может быть гликозилировано(а) по одному или нескольким другим положениям, но, тем не менее, будет считаться агликозилированным антителом или агликозилированным гибридным Fc-белком.

В предварительной заявке на патент США сер. №. 61/784669, принадлежащей заявителям настоящей заявки, поданной 14 марта 2013, полностью включенной в настоящий документ посредством ссылки, описан лишенный эффекторной функции Fc IgG1. Мутация аминокислоты N297 IgG1 человека с заменой на глицин, т.е. N297G, обеспечивает значительно более эффективное очищение и лучшие биофизические свойства по сравнению с заменами указанного остатка на другие аминокислоты. Соответственно, согласно предпочтительным вариантам реализации антитело или гибридный Fc-белок содержит Fc IgG1 человека с заменой N297G.

Агликозилированные содержащие Fc IgG1 молекулы, как было показано, менее стабильны, чем гликозилированные содержащие Fc IgG1 молекулы. Fc-область может также быть сконструирована таким образом, чтобы повышать стабильность агликозилированной молекулы. Согласно некоторым вариантам реализации одна или

большее количество аминокислот заменены на цистеин таким образом, чтобы формировались дисульфидные связи в димерном состоянии. Остатки V259, A287, R292, V302, L306, V323 или I332 области CH₂ могут быть заменены на цистеин. Согласно предпочтительным вариантам реализации специфические пары остатков заменены таким образом, что они преимущественно образуют дисульфидную связь друг с другом, таким образом ограничивая или предотвращая образование перекрестных дисульфидных связей. Предпочтительные пары включают, не ограничиваясь перечисленными, A287C и L306C, V259C и L306C, R292C и V302C, V323C и I332C.

В настоящем изобретении предложены Fc-содержащие молекулы, отличающиеся тем, что один или большее количество остатков V259, A287, R292, V302, L306, V323 или I332 заменены на цистеин. Предпочтительные Fc-содержащие молекулы включают содержащие замены A287C и L306C, V259C и L306C, R292C и V302C, или V323C и I332C.

Представляющий интерес полипептид может быть присоединен к N-концу или C-концу Fc-области IgG для получения гибридного Fc-белка. Согласно определенным вариантам реализации указанный гибридный Fc-белок содержит линкер между Fc и представляющим интерес полипептидом. В данной области техники известно множество различных линкерных полипептидов, которые могут использоваться в контексте гибридного Fc-белка. Согласно предпочтительным вариантам реализации гибридный Fc-белок содержит одну или большее количество копий пептида, включающего GGGGS (SEQ ID NO: 45), GGNGT (SEQ ID NO: 46) или YGNGT (SEQ ID NO: 47) между Fc и представляющим интерес пептидом или полипептидом. Согласно некоторым вариантам реализации указанная область полипептида между Fc-областью и область представляющего интерес пептида или полипептида содержит одну копию GGGGS (SEQ ID NO: 45), GGNGT (SEQ ID NO: 46) или YGNGT (SEQ ID NO: 47). Линкеры GGNGT (SEQ ID NO: 46) или YGNGT (SEQ ID NO: 47) подвергаются гликозилированию при экспрессии в подходящих клетках; такое гликозилирование может помогать стабилизации белка в растворе и/или при введении *in vivo*. Соответственно,

согласно определенным вариантам реализации гибридный Fc-белок содержит гликозилированный линкер между Fc-областью и областью представляющего интерес белка.

В предварительной заявке на патент США 61/591161, поданной 1/26/12, принадлежащей заявителям настоящей заявки, и PCT-заявке №PCT/US2013/023456, поданной 1/28/13 (обе заявки полностью включены в настоящий документ посредством ссылки), описаны гибридные белки GDF15-Fc. Согласно определенным вариантам реализации настоящего изобретения полипептид содержит Fc-область антитела, из которой удалены или в которой заменены один или большее количество цистеинов шарнирной области, и одна или большее количество аминокислот контактной поверхности СНЗ заменены на содержащий остаток с сульфгидрильной группой, предпочтительно цистеин, при этом указанный полипептид не является гибридом Fc и GDF15. В частности, полипептид содержит Fc-область антитела, из которой удалены или в которой заменены один или большее количество цистеинов шарнирной области, и одна или большее количество аминокислот контактной поверхности СНЗ заменены на содержащий остаток с сульфгидрильной группой, предпочтительно цистеин, при этом указанный полипептид не является гибридным белком Fc с GDF15 согласно описанию в PCT-заявке №PCT/US2013/023456, например, как гибридные GDF15-белки, содержащие:

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTCPP
SRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 48);

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTCPP
SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 49);

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTCPP
SRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWAD
WVLSPREVQVTMCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTPAPCCVPASYNPMVLIQKTDTG

VSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 50);

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
 PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTCPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
 KSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGARNGDHCPLGPG
 RCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAP
 CCVPASYNPMVLIQKTDGTVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 51);

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
 PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTCPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVL
 DSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:
 52);

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 CRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 53);

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPP
 SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVLDSDGSFFLYSDLTVDKSRW
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 54);

APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 CRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLKSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGARNGDHCPLGPGRCCRLHTVRASLEDLGWAD
 WVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAPCCVPASYNPMVLIQKTDG
 VSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 55);

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
 PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVYTLPPCRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
 KSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGARNGDHCPLGPG
 RCCRLHTVRASLEDLGWADWVLSPREVQVTCIGACPSQFRAANMHAQIKTSLHRLKPDTVPAP
 CCVPASYNPMVLIQKTDGTVSLQTYDDLLAKDCHCI (SEQ ID NO: 56); или

MEWSWVFLFFLSVTTGVHSAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED
 PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
 TISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYDTTPPVL
 DSDGSFFLYSDLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:

57).

Полинуклеотиды, кодирующие антитела и гибридные Fc-белки

Настоящим изобретением охвачены нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелые цепи антитела и гибридные Fc-белки. Аспекты настоящего изобретения включают варианты полинуклеотидов (например, обусловленные вырожденностью), которые кодируют описанные в настоящем документе последовательности аминокислот.

Последовательности нуклеотидов, соответствующие описанным в настоящем документе последовательностям аминокислот, для применения в качестве зондов или праймеров для выделения нуклеиновых кислот, или в качестве запрашиваемых последовательностей для поиска в базах данных, могут быть получены путем «обратной трансляции» последовательностей аминокислот. Хорошо известная процедура полимеразной цепной реакции (ПЦР) может быть применена для выделения и амплификации последовательности ДНК, кодирующей тяжелые цепи антитела и гибридные Fc-белки. Олигонуклеотиды, определяющие требуемые концы комбинации фрагментов ДНК, используют в качестве 5'- и 3'-праймеров. Указанные олигонуклеотиды могут дополнительно содержать сайты распознавания рестрикционными эндонуклеазами для облегчения встраивания амплифицированной комбинации фрагментов ДНК в экспрессионный вектор. Техники ПЦР описаны в источниках: Saiki et al., *Science* 239:487 (1988); *Recombinant DNA Methodology*, Wu et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego (1989), pp. 189-196; и *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et. al., eds., Academic Press, Inc. (1990).

Молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению включают ДНК и РНК как в одноцепочечной, так и в двуцепочечной форме, а также соответствующие комплементарные последовательности. «Выделенная нуклеиновая кислота» представляет собой нуклеиновую кислоту, отделенную от соседних генетических последовательностей, присутствующих в геноме организма, из которого была выделена указанная нуклеиновая кислота, в случае нуклеиновых кислот, выделенных из встречающихся в природе источников. Понятно, что в тех случаях, когда нуклеиновые кислоты синтезированы ферментативным способом

на матрице или химическим путем, например, продукты ПЦР, молекулы кДНК или олигонуклеотиды, они представляют собой выделенные нуклеиновые кислоты. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты относится к молекуле нуклеиновой кислоты в виде отдельного фрагмента или в виде компонента конструкции нуклеиновой кислоты большего размера. Согласно одному предпочтительному варианту реализации нуклеиновые кислоты по существу не содержат загрязняющего эндогенного материала. Молекула нуклеиновой кислоты предпочтительно происходит из ДНК или РНК, выделенной по меньшей мере однократно в по существу чистом виде и в количестве или в концентрации, позволяющей проведение идентификации, манипуляций и восстановления последовательности составляющих ее нуклеотидов при помощи стандартных биохимических методов (таких как изложенные в руководстве Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)). Такие последовательности предпочтительно представлены и/или сконструированы в форме открытой рамки считывания, не прерываемой внутренними нетранслируемыми последовательностями, или интронами, которые, как правило, присутствуют в эукариотических генах. Последовательности нетранслируемой ДНК могут присутствовать в направлении 5' или 3' от открытой рамки считывания, где они не мешают манипуляциям с кодирующей областью или ее экспрессии.

Варианты, предложенные в настоящем изобретении, обычно получают путем сайт-специфического мутагенеза нуклеотидов в ДНК, кодирующей тяжелую цепь или гибридный Fc-белок, с применением кассетного или ПЦР-мутагенеза, или других техник, хорошо известных в данной области техники, для получения ДНК, кодирующей указанный вариант, и последующей экспрессии рекомбинантной ДНК в культуре клеток согласно описанию в настоящем документе. Однако содержащие тяжелые цепи и гибридные Fc-белки могут быть получены и путем синтеза *in vitro* с применением общепринятых техник. Указанные варианты, как правило, проявляют такую же в качественном отношении биологическую активность, что и встречающийся в природе аналог,

хотя могут также выбраны варианты, обладающие модифицированными характеристиками, как будет более подробно изложено далее.

Как будет ясно специалистам в данной области техники, ввиду вырожденности генетического кода может быть получено очень большое число нуклеиновых кислот, все из которых кодируют тяжелые цепи и гибридные Fc-белки согласно настоящему изобретению. Соответственно, идентифицировав конкретную последовательность аминокислот, специалисты в данной области техники смогут получить любое число различных нуклеиновых кислот, путем простой модификации последовательности одного или большего количества кодонов способом, который не изменяет последовательность аминокислот кодируемого белка.

В настоящем изобретении также предложены экспрессионные системы и конструкций в форме плазмид, экспрессионных векторов, транскрипционных или экспрессионных кассет, которые содержат по меньшей мере один полинуклеотид согласно описанию выше. Кроме того, в настоящем изобретении предложены клетки-хозяева, содержащие такие экспрессионные системы или конструкции.

Как правило, экспрессионные векторы, используемые в любых клетках-хозяевах, содержат последовательности для поддержания плазмиды, и для клонирования и экспрессии экзогенных последовательностей нуклеотидов. Такие последовательности, в совокупности называемые «фланкирующими последовательностями», согласно определенным вариантам реализации, как правило, включают один или большее количество следующих последовательностей нуклеотидов: промотор, одна или большее количество энхансерных последовательностей, точка начала репликации, последовательность терминации транскрипции, полную интронную последовательность, содержащую донорный и акцепторный участки сплайсинга, последовательность, кодирующую лидерную последовательность для секреции полипептида, участок связывания рибосомы, последовательность полиаденилирования, полилинкерную область для встраивания нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид, который необходимо экспрессировать, и селективируемый маркерный элемент. Каждая из указанных последовательностей описана ниже.

Вектор необязательно может включать кодирующую «метку» последовательность, т.е. молекулу олигонуклеотида, расположенную 5'- или 3'-конце кодирующей тяжелой цепи или гибридный Fc-белок последовательности; указанная последовательность олигонуклеотида кодирует поли-His (например, гекса-His (SEQ ID NO: 58)), или другую «метку», например, FLAG, HA (гемагглютинин вируса гриппа) или тус, для которых существуют коммерчески доступные антитела. Указанную метку, как правило, присоединяют к полипептиду в ходе экспрессии указанного полипептида, и она может служить для аффинной очистки или детекции белка из клетки-хозяина. Аффинную очистку можно осуществлять, например, посредством колоночной хроматографии с применением антител против метки в качестве аффинной матрицы. Необязательно, указанную метку можно впоследствии удалять из очищенной (ого) тяжелой цепи или гибридных Fc-белков различными способами, например, расщеплением с помощью определенных пептидаз.

Фланкирующие последовательности могут быть гомологичными (т.е. принадлежать тому же виду и/или штамму/линии, что и клетка-хозяин), гетерологичными (т.е. принадлежать виду, отличному от вида или штамма/линии клетки-хозяина), гибридными (т.е. представлять собой комбинацию фланкирующих последовательностей более чем из одного источника), синтетическими или нативными. Таким образом, источником фланкирующей последовательности может быть любой прокариотический или эукариотический организм, любой позвоночный или беспозвоночный организм, или любое растение, при условии, что фланкирующая последовательность функциональна в клетке-хозяине и может быть активирована за счет имеющихся у клетки-хозяина механизмов.

Фланкирующие последовательности, подходящие для применения в векторах согласно настоящему изобретению, могут быть получены любыми из ряда способов, хорошо известных в данной области техники. Как правило, фланкирующие последовательности, подходящие для применения согласно настоящему изобретению, ранее были идентифицированы путем картирования и/или расщепления рестрикционными эндонуклеазами и, соответственно, могут быть

выделены из подходящего тканевого источника с применением подходящих рестрикционных эндонуклеаз. В некоторых случаях может быть известна полная последовательность нуклеотидов фланкирующей последовательности. Для целей настоящего изобретения фланкирующая последовательность может быть синтезирована с применением описанных в настоящем документе способов синтеза или клонирования нуклеиновых кислот.

Независимо от того, известна ли вся фланкирующая последовательность или только ее часть, она может быть получена с применением полимеразной цепной реакции (ПЦР) и/или путем скрининга геномной библиотеки с применением подходящего зонда, например, фрагмента олигонуклеотида и/или фланкирующей последовательности из того же или другого вида. Если фланкирующая последовательность неизвестна, фрагмент ДНК, содержащий фланкирующую последовательность, может быть выделен из большего фрагмента ДНК, который может содержать, например, кодирующую последовательность или даже другой ген или гены. Выделение можно осуществлять путем расщепления рестрикционной эндонуклеазой с получением требуемого фрагмента ДНК и последующим выделением посредством очищения хроматографией в агарозном геле на колонке Qiagen® (Чатсворт, Калифорния), или с применением других способов, известных специалисту в данной области техники. Выбор подходящих ферментов для достижения указанной цели будет очевиден для специалиста в данной области техники.

Участок начала репликации, как правило, входит в состав прокариотических экспрессионных векторов из коммерческих источников; указанный участок начала репликации способствует амплификации вектора в клетке-хозяине. Если выбранный вектор не содержит сайта начала репликации, последний может быть химически синтезирован на основе известной последовательности и лигирован в вектор. Например, начало репликации из плазмиды pBR322 (New England Biolabs, Беверли, Массачусетс) подходит для большинства грамотрицательных бактерий, а различные вирусные сайты начала репликации (например, SV40, полиомавируса, аденовируса, вируса везикулярного стоматита (VBS), или папилломавирусов, таких как

ВПЧ или ВПВ) подходят для клонирующих векторов в клетках млекопитающих. Обычно компонент начала репликации для экспрессионных векторов млекопитающих не требуется (например, участок начала репликации SV40 часто используется исключительно постольку, поскольку также содержит ранний вирусный промотор).

Последовательность терминации транскрипции, как правило, расположена в направлении 3' от конца кодирующей области полипептида и служит для терминации транскрипции. Обычно последовательность терминации транскрипции в прокариотических клетках представляет собой богатый G-C фрагмент, за которым следует последовательность поли-T. Хотя указанная последовательность может легко быть клонирована из библиотеки или даже приобретена из коммерческого источника в виде части вектора, ее также можно легко синтезировать с применением способов синтеза нуклеиновых кислот, таких как описанные в настоящем документе.

Селектируемый маркерный ген кодирует белок, необходимый для выживания и роста клетки-хозяина, культивируемой на селективной культуральной среде. Типичные селективные маркерные гены кодируют белки, которые (а) придают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например, ампициллину, тетрациклину или канамицину для прокариотических клеток-хозяев; (b) восполняют ауксотрофную недостаточность клетки; или (c) обеспечивают важнейшие питательные вещества, отсутствующие в комплексной среде или среде определенного состава. Специфические селектируемые маркеры представлены геном устойчивости к канамицину, геном устойчивости к ампициллину и геном устойчивости к тетрациклину. Ген устойчивости к неомицину также может быть успешно использован для отбора как прокариотических, так и эукариотических клеток-хозяев.

Другие селектируемые гены могут быть использованы для амплификации гена, который будет экспрессироваться. Амплификация представляет собой процесс, при котором гены, которые требуются для получения белка, критически важного для роста или выживания клетки, тандемно повторяются в составе хромосом последовательных поколений рекомбинантных клеток. Примеры подходящих

селектируемых маркеров для клеток млекопитающих включают ген дигидрофолатредуктазы (ДГФР) и беспромоторный ген тимидинкиназы. Клетки-трансформанты млекопитающих подвергают селективному давлению, при котором только трансформанты уникальным образом адаптированы для выживания за счет селектируемого гена, присутствующего в векторе. Давление отбора реализуют путем культивирования трансформированных клеток в условиях, когда концентрация селективного агента в среде последовательно повышается, что приводит к амплификации и селектируемого гена, и ДНК, которая кодирует другой ген, например, тяжелую цепь антитела или гибридный Fc-белок. В результате увеличения количества полипептида, например, тяжелой цепи или гибридного Fc-белка, синтезируют из амплифицированной ДНК.

Участок связывания рибосомы обычно необходим для инициации трансляции мРНК и характеризуется последовательностью Шайна-Дальгарно (прокариоты) или последовательностью Козак (эукариоты). Указанный элемент, как правило, расположен в направлении 3' от промотора и в направлении 5' от последовательности полипептида, который требуется экспрессировать. Согласно определенным вариантам реализации одна или большее количество кодирующих областей могут быть функционально связаны с внутренним сайтом связывания рибосомы (IRES), обеспечивая трансляцию двух открытых рамок считывания с одного РНК-транскрипта.

В некоторых случаях, например, если в экспрессионной системе для эукариотической клетки-хозяина требуется гликозилирование, могут быть проведены манипуляции с различными предпоследовательностями или пропоследовательностями для повышения гликозилирования или выхода. Например, можно изменить участок расщепления пептидазой конкретного сигнального пептида, или добавить пропоследовательности, которые также могут влиять на гликозилирование. Конечный белковый продукт может содержать в положении -1 (относительно первой аминокислоты зрелого белка) одну или большее количество дополнительных аминокислот, связанных с экспрессией, которые не обязательно полностью удалены. Например, конечный белковый продукт может содержать

один или два остатка аминокислот, обнаруживаемых в сайте расщепления пептидазой, присоединенных к аминоконцу. Как вариант, применение некоторых сайтов расщепления ферментами может приводить к получению незначительно усеченной формы требуемого полипептида, если расщепление ферментом происходит в такой области зрелого полипептида.

Экспрессионные и клонирующие векторы согласно настоящему изобретению, как правило, содержат промотор, распознаваемый организмом-хозяином и функционально связанный с молекулой, кодирующей тяжелую цепь или гибридный Fc-белок. Промоторы представляют собой нетранскрибируемые последовательности, расположенные выше (т.е. в направлении 5') относительно стартового кодона структурного гена (обычно в пределах приблизительно 100–1000 п.о.), контролирующие транскрипцию структурного гена. Промоторы обычно относят к одному из двух классов: индуцируемые промоторы и конститутивные промоторы. Индуцируемые промоторы инициируют повышение уровней транскрипции ДНК, находящейся под их контролем, в ответ на некоторые изменения условий культивирования, например, присутствие или отсутствие питательного вещества или изменение температуры. Конститутивные промоторы, с другой стороны, постоянно транскрибируют ген, с которым они функционально связаны, то есть в незначительной степени контролируют или не контролируют экспрессию гена. Хорошо известно значительное число промоторов, распознаваемых различными потенциальными клетками-хозяевами.

Подходящие промоторы для применения у хозяев-дрожжей также хорошо известны в данной области техники. Целесообразно использование дрожжевых энхансеров с дрожжевыми промоторами. Подходящие промоторы для применения у клеток-хозяев млекопитающих хорошо известны и включают, не ограничиваясь перечисленными, полученные из геномов вирусов, таких как полиомавирус, вирус оспы кур, аденовирус (например, аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирусы, вирус гепатита В и, предпочтительно, вирус обезьян 40 (SV40). Другие подходящие промоторы млекопитающих включают гетерологичные промоторы

млекопитающих, например, промоторы генов теплового шока и промотор гена актина.

Дополнительные промоторы, которые могут представлять интерес, включают, не ограничиваясь перечисленными: ранний промотор SV40 (Benoist and Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310); промотор ЦМВ (Thornsen *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 81:659-663); промотор, содержащийся в длинном 3'-концевом повторе вируса саркомы Рауса (Yamamoto *et al.*, 1980, *Cell* 22:787-797); промотор тимидинкиназы вируса герпеса (Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-1445); промоторные и регуляторные последовательности гена металлотioneина Prinster *et al.*, 1982, *Nature* 296:39-42); и прокариотические промоторы, такие как бета-лактамазный промотор (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731); или промотор tac (DeBoer *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25). Также представляют интерес следующие области контроля транскрипции животных, демонстрирующие тканеспецифичность и использовавшиеся у трансгенных животных: контрольная область гена эластазы I, активная в ацинарных клетках поджелудочной железы (Swift *et al.*, 1984, *Cell* 38:639-646; Ornitz *et al.*, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409; MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); контрольная область гена инсулина, активная в бета-клетках поджелудочной железы (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-122); контрольная область гена иммуноглобулина, активная в лимфоидных клетках (Grosschedl *et al.*, 1984, *Cell* 38:647-658; Adames *et al.*, 1985, *Nature* 318:533-538; Alexander *et al.*, 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444); контрольная область вируса опухоли молочной железы мышей, активная в клетках яичек, молочной железы, лимфоидных и тучных клетках (Leder *et al.*, 1986, *Cell* 45:485-495); контрольная область гена альбумина, активная в печени (Pinkert *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1:268-276); контрольная область гена альфа-фетопротейна, активная в печени (Krumlauf *et al.*, 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648; Hammer *et al.*, 1987, *Science* 253:53-58); контрольная область гена альфа-1-антитрипсина, активная в печени (Kelsey *et al.*,

1987, *Genes and Devel.* 1:161-171); контрольная область гена бета-глобина, активная в миелоидных клетках (Mogram et al., 1985, *Nature* 315:338-340; Kollias et al., 1986, *Cell* 46:89-94); контрольная область гена основного белка миелина, активная в олигодендроцитах головного мозга (Readhead et al., 1987, *Cell* 48:703-712); контрольная область гена легкой цепи-2 миозина, активная в скелетных мышцах (Sani, 1985, *Nature* 314:283-286); и контрольная область гена гонадотропного релизинг-гормона, активная в гипоталамусе (Mason et al., 1986, *Science* 234:1372-1378).

В вектор может быть встроена энхансерная последовательность для усиления транскрипции у высших эукариот. Энхансеры представляют собой цис-действующие элементы ДНК, обычно имеющие длину приблизительно 10-300 п.о., воздействующие на промотор с усилением транскрипции. Энхансеры являются относительно независимыми от ориентации и расположения, поскольку обнаруживались как в направлении 5', так и в направлении 3' относительно транскрипционной единицы. Известен ряд доступных энхансерных последовательностей из генов млекопитающих (например, глобина, эластазы, альбумина, альфа-фетопротеина и инсулина). Однако, как правило, используют вирусный энхансер. Энхансер SV40, энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы и энхансеры аденовирусов, известные в данной области техники, представляют собой примеры энхансерных элементов для активации эукариотических промоторов. Хотя энхансер может располагаться в векторе либо в направлении 5', либо в направлении 3' относительно кодирующей последовательности, он, как правило расположен на участке в направлении 5' от промотора. Последовательность, кодирующая подходящую нативную или гетерологичную сигнальную последовательность (лидерную последовательность или сигнальный пептид) может быть встроена в экспрессионный вектор для содействия внеклеточной секреции антитела или гибридного Fc-белка. Выбор сигнального пептида или лидера зависит от типа клеток-хозяев, где будет продуцироваться белок, и гетерологичная сигнальная последовательность может замещать нативную сигнальную

последовательность. Примеры сигнальных пептидов, функциональных в клетках-хозяевах млекопитающих, включают следующие: сигнальная последовательность для интерлейкина-7 (IL-7), описанная в патенте США №4965195; сигнальная последовательность для рецептора интерлейкина-2, описанная в Cosman et al., 1984, *Nature* 312:768; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-4, описанный в европейском патенте №0367566; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-1 типа I, описанный в патенте США №4968607; сигнальный пептид рецептора интерлейкина-1 типа II, описанный в европейском патенте №0460846.

Указанный вектор может содержать один или большее количество элементов, облегчающих экспрессию при встраивании вектора в геном клетки-хозяина. Примеры включают элемент EASE (Aldrich et al. 2003 *Biotechnol Prog.* 19:1433-38) и область прикрепления к матриксу (MAR). Области MAR опосредуют структурную организацию хроматина и могут изолировать встроенный вектор, предохраняя его от эффекта «положения». Соответственно, MAR подходят для применения, в частности, когда вектор используется для получения стабильных трансфектантов. В данной области техники известен ряд природных и синтетических содержащих MAR нуклеиновых кислот, см., например, патенты США №№ 6239328; 7326567; 6177612; 6388066; 6245974; 7259010; 6037525; 7422874; 7129062.

Экспрессионные векторы согласно настоящему изобретению могут быть сконструированы из исходного вектора, например, коммерчески доступного вектора. Такие векторы могут содержать или не содержать все требуемые фланкирующие последовательности. Если одна или большее количество фланкирующих последовательностей, согласно описанию в настоящем документе, изначально не присутствуют в векторе, они могут быть получены индивидуально и лигированы в вектор. Способы, применяемые для получения каждой из фланкирующих последовательностей, хорошо известны специалисту в данной области техники.

После того, как вектор сконструирован и молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая тяжелую цепь или гибридный Fc-белок, встроена в надлежащий участок вектора, готовый вектор

может быть встроен в подходящую клетку-хозяина для амплификации и/или экспрессии полипептида. Трансформация экспрессионным вектором выбранной клетки-хозяина может быть осуществлена хорошо известными способами, включая трансфекцию, инфекцию, соосаждение с фосфатом кальция, электропорацию, микроинъекцию, липофекцию, опосредованную ДЭАЭ-декстраном трансфекцию или другие известные техники. Выбранный способ отчасти зависит от типа клетки-хозяина, которую предполагается использовать. Указанные способы и другие подходящие способы хорошо известны специалистам в данной области техники, и представлены, например, у Sambrook *et al.*, 2001, *выше*.

Клетка-хозяин при культивировании в подходящих условиях синтезирует тяжелую цепь или гибридный Fc-белок, который(ая) затем может быть собран(а) из культуральной среды (если клетка-хозяин секретирует его в среду) или получен непосредственно из продуцирующей его клетки-хозяина (если он не секретируется). Выбор подходящей клетки-хозяина зависит от различных факторов, таких как требуемые уровни экспрессии, модификации полипептида, желательные или необходимые для активности (например, гликозилирование или фосфорилирование) и простоты укладки в биологически активную молекулу. Клетка-хозяин может быть эукариотической или прокариотической.

Доступные линии клеток млекопитающих для применения в качестве хозяев для экспрессии хорошо известны в данной области техники и включают, не ограничиваясь перечисленными, иммортализованные линии клеток, доступные в Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection, ATCC); любые линии клеток, используемые в экспрессионных системах, известных в данной области техники, можно применять для получения рекомбинантных полипептидов согласно настоящему изобретению. В общих чертах, клетки-хозяева трансформируют рекомбинантным экспрессионным вектором, который содержит ДНК, кодирующую нужную тяжелую цепь или Fc-гибрид. Подходящие клетки-хозяева включают прокариотические клетки, дрожжи или клетки высших эукариот. Прокариоты включают грамотрицательные или грамположительные организмы, например, *E. coli* или бациллы.

Клетки высших эукариот включают клетки насекомых и устойчивые клеточные линии, происходящие из млекопитающих. Примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих включают линию клеток COS-7 почки обезьяны (ATCC CRL 1651) (Gluzman *et al.*, 1981, *Cell* 23:175), клетки L, клетки 293, клетки C127, клетки 3T3 (ATCC CCL 163), клетки яичника китайского хомячка (CHO) или их производные, такие как Vегgie CHO и родственные линии клеток, растущие на бессывороточной среде (Rasmussen *et al.*, 1998, *Cytotechnology* 28: 31), клетки HeLa, линии клеток ВНК (ATCC CRL 10) и линия клеток CVI/EBNA, происходящая из линии клеток CVI почки африканской зеленой мартышки (ATCC CCL 70), описанная в McMahon *et al.*, 1991, *EMBO J.* 10: 2821, эмбриональные клетки почки человека, такие как 293, 293 EBNA или MSR 293, эпидермальные клетки A431 человека, клетки Colo205 человека, другие линии трансформированных клеток приматов, нормальные диплоидные клетки, линии клеток, происходящие из *in vitro* культуры первичной ткани, первичные эксплантаты, клетки HL-60, U937, HaK или Jurkat. Необязательно, для экспрессии полипептида можно использовать такие клеточные линии млекопитающих, как, например, HepG2/3В, KB, NIH 3T3 или S49, если предполагается применение полипептида в анализе передачи сигналов или репортерных генов.

Как вариант, возможно получение полипептида у низших эукариот, таких как дрожжи, или у прокариот, таких как бактерии. Подходящие дрожжи включают *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, штаммы *Kluveromyces*, *Candida* или любой дрожжевой штамм, способный экспрессировать гетерологичные полипептиды. Подходящие бактериальные штаммы включают *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* или любой бактериальный штамм, способный экспрессировать гетерологичные полипептиды. В том случае, когда полипептид получают в дрожжах или в бактериях, может быть целесообразным модифицировать продуцируемый полипептид, например, путем фосфорилирования или гликозилирования подходящих сайтов, для получения функционального полипептида. Такие ковалентные присоединения можно проводить с применением известных химических

или ферментативных способов.

Полипептид может также быть получен путем функционального связывания выделенной нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению с подходящими контрольными последовательностями в одном или нескольких экспрессионных векторах насекомых, и применения экспрессионной системы для насекомых. Материалы и методы для применения экспрессионных систем на основе бакуловирусов/клеток насекомых коммерчески доступны в виде наборов, например, от Invitrogen, Сан-Диего, Калифорния, США (набор MaxVac®); такие способы хорошо известны в данной области техники, согласно описанию у Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987), и Luckow and Summers, *Bio/Technology* 6:47 (1988). Также для получения полипептидов с применением РНК, происходящих из описанных в настоящем документе конструкций нуклеиновых кислот, можно использовать бесклеточные системы трансляции. Подходящие клонирующие и экспрессионные векторы для применения в бактериальных, грибных, дрожжевых клетках-хозяевах, а также клетках-хозяевах млекопитающих, описаны Pouwels *et al.* (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, 1985). Клетка-хозяин, которая содержит выделенную нуклеиновую кислоту согласно настоящему изобретению, предпочтительно функционально связанную с по меньшей мере одной последовательностью контроля экспрессии, представляет собой «рекомбинантную клетку-хозяина».

ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ

Улучшенная стабильность и пониженная агрегация, свойственные полипептидам согласно настоящему изобретению, в частности, делает их подходящими для применения в фармацевтических композициях. Такие композиции содержат один или большее число дополнительных компонентов таких как физиологически приемлемый носитель, вспомогательное вещество или разбавитель. Необязательно, указанная композиция дополнительно содержит один или большее количество физиологически активных агентов, например, согласно описанию ниже. Согласно различным конкретным вариантам реализации указанная композиция содержит

один, два, три, четыре, пять или шесть физиологически активных агентов помимо одного или большего количества антител и/или гибридных Fc-белков, предложенных в настоящем изобретении.

Согласно одному варианту реализации указанная фармацевтическая композиция содержит антитело и/или гибридный Fc-белок согласно настоящему изобретению наряду с одним или большим количеством веществ, выбранных из группы, состоящей из буфера, антиоксиданта, например, аскорбиновой кислоты, низкомолекулярного полипептида (например, содержащего менее 10 аминокислот), белка, аминокислоты, углевода, такого как глюкоза, сахароза или декстрины, хелатирующего агента, такого как EDTA, глутатиона, стабилизатора и вспомогательного вещества. Нейтральный забуференный солевой раствор или солевой раствор в смеси с конспецифичным сывороточным альбумином представляют собой примеры подходящих разбавителей. В соответствии с надлежащими промышленными стандартами можно также добавлять консерванты, такие как бензиловый спирт. Композиция может быть получена в виде лиофилизата с применением подходящих растворов вспомогательных веществ (например, сахарозы) в качестве разбавителей. Подходящие компоненты нетоксичны для реципиентов в применяемых дозировках и концентрациях. Дополнительные примеры компонентов, подходящих для применения в фармацевтических составах, приведены в руководстве: Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed. (1980), 20th Ed. (2000), Mack Publishing Company, Easton, PA.

Предложены наборы для применения практикующими медицинскими специалистами, включающие одно или большее количество антител и/или гибридных Fc-белков согласно настоящему изобретению, и этикетку или другие инструкции для применения при лечении любых из обсуждаемых в настоящем документе состояний. Согласно одному варианту реализации набор включает стерильный состав с одним или большим количеством антител и/или гибридных Fc-белков, который может быть представлен в виде композиции согласно описанию выше и может размещаться в одном или нескольких сосудах.

Дозировки и частота введения могут варьировать в зависимости от таких факторов, как способ введения,

конкретное (ый) применяемое (ый) антитело и/или гибридный Fc-белок, природа и тяжесть подлежащего лечению заболевания, того, является ли состояние острым или хроническим, размеров и общего состояния субъекта. Подходящие дозировки могут быть определены при помощи процедур, известных в соответствующей области техники, например, в ходе клинических испытаний, которые могут включать исследования с эскалацией дозы.

Антитело и/или гибридный Fc-белок согласно настоящему изобретению можно вводить, например, однократно или более чем однократно, например, через регулярные интервалы на протяжении периода времени. Согласно конкретным вариантам реализации антитело и/или гибридный Fc-белок вводят по меньшей мере однократно на протяжении периода продолжительностью один месяц или более, например, на протяжении одного, двух или трех месяцев, или даже в течение неопределенно долгого периода. При лечении хронических состояний обычно наиболее эффективно долгосрочное лечение. Однако при лечении острых состояний введение на протяжении менее продолжительных периодов, например, от одной до шести недель, может быть достаточным. В общих чертах, антитело и/или гибридный Fc-белок вводят до проявления у пациента медицински значимой степени улучшения относительно исходного выбранного показателя или показателей.

Как известно в соответствующей области техники, фармацевтические композиции, содержащие антитело и/или гибридный Fc-белок согласно настоящему изобретению, вводят субъекту способом, подходящим при имеющихся показаниях. Фармацевтические композиции можно вводить с применением любой подходящей техники, в том числе, но не ограничиваясь перечисленным, парентерально, местно или путем ингаляции. При инъектировании фармацевтическую композицию можно вводить, например, внутрисуставно, внутривенно, внутримышечно, внутрь очага поражения, внутрибрюшинно или подкожно, в виде болюсной инъекции или непрерывной инфузии. Предусмотрено локальное введение, например, в участок, пораженный заболеванием или повреждением, а также трансдермальная доставка и замедленное высвобождение из имплантатов. Доставка посредством ингаляции включает, например,

назальную или пероральную ингаляцию, применение небулайзера, ингаляционные антитела и/или гибридный Fc-белок в форме аэрозоля и т.п. Другие альтернативы включают составы для перорального приема, в том числе таблетки, сиропы или пастилки.

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Если в настоящем документе не указано иное, научные и технические термины, используемые в отношении настоящего изобретения, имеют значения, обычно подразумеваемые специалистами в данной области техники. Кроме того, если иное не продиктовано контекстом, термины в единственном числе включают и множественное число, а термины во множественном числе включают и единственное число. Обычно системы номенклатуры, используемые применительно к культивированию клеток и тканей, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетике и химии белков и нуклеиновых кислот и гибридизации, описанных в настоящем документе, и применительно к соответствующим техникам, хорошо известны и являются общеупотребительными в соответствующей области техники. Способы и техники, предложенные в настоящем изобретении, обычно реализуют в соответствии со стандартными способами, хорошо известными в данной области техники и описанными в различных общих и более специализированных источниках, цитируемых и обсуждаемых в различных разделах настоящего описания, если не указано иное. См., например, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates (1992), и Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990), которые включены в настоящий документ посредством ссылки. Ферментативные реакции и техники очищения реализуют в соответствии с инструкциями производителя, как принято в данной области техники или согласно описанию в настоящем документе. Терминология, используемая применительно к аналитической химии, синтетической органической химии, и медицинской и фармацевтической химии, и соответствующие лабораторные процедуры и техники, описанные в настоящем

документе, хорошо известны и являются общеупотребительными в данной области техники. Для химического синтеза, химического анализа, разработки, получения и доставки фармацевтических составов и лечения пациентов можно применять стандартные техники.

Приведенные ниже термины, если не указано иное, подразумевают следующие значения. Термин «выделенная молекула» (где молекула представляет собой, например, полипептид, полинуклеотид или антитело) представляет собой молекулу, которая в силу своего происхождения или источника происхождения (1) не связана с естественным образом ассоциированными с ней компонентами, сопровождающими ее в естественном состоянии, (2) по существу не содержит других молекул, происходящих из того же вида (3) экспрессируется клеткой другого вида или (4) не встречается в природе. Соответственно, молекула, которая была химически синтезирована или экспрессирована в клеточной системе, отличной от клетки, из которой она естественным образом происходит, является «выделенной» в отношении естественным образом ассоциированных с ней компонентов. Молекула также может быть по существу освобождена от естественным образом ассоциированных с ней компонентов путем выделения с применением техник очищения, хорошо известных в данной области техники. Чистота или гомогенность молекулы может быть проанализирована с применением ряда способов, хорошо известных в данной области техники. Например, чистота образца полипептида может быть проанализирована с применением электрофореза в полиакриламидном геле и окрашивания геля для визуализации полипептида с применением техник, хорошо известных в данной области техники. Для определенных целей можно обеспечивать большее разрешение с применением ВЭЖХ или других способов очищения, хорошо известных в данной области техники.

Полинуклеотидные и полипептидные последовательности обозначают с применением стандартных однобуквенных или трехбуквенных аббревиатур. Если не указано иное, аминоконец полипептидных последовательностей находится слева, а карбоксильный конец – справа, и 5'-конец одноцепочечных

последовательностей нуклеиновой кислоты и верхней цепи двуцепочечных последовательностей нуклеиновой кислоты находится слева, а 3'-конец – справа. Конкретная полипептидная или полинуклеотидная последовательность также может быть описана путем описания ее отличий от референсной последовательности.

Термины «пептид», «полипептид» и «белок» относятся к молекуле, содержащей две или большее количество остатков аминокислот, соединенных между собой пептидными связями. Указанные термины охватывают, например, нативные и искусственные белки, фрагменты белков и аналоги полипептидов (такие как мутеины, варианты белков и гибридные белки) белковой последовательности, а также посттрансляционно или иным образом ковалентно или нековалентно модифицированные белки. Пептид, полипептид или белок может быть мономерным или полимерным.

Термин «фрагмент полипептида» в настоящем документе относится к полипептиду с делецией на аминоконце и/или карбоксильном конце по сравнению с соответствующим полноразмерным белком. Длина фрагментов может составлять, например, по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 50, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350 или 400 аминокислот. Длина фрагментов может составлять также, например, максимум 1000, 750, 500, 250, 200, 175, 150, 125, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 14, 13, 12, 11 или 10 аминокислот. Фрагмент может также содержать на одном или на обоих концах одну или большее количество дополнительных аминокислот, например, последовательность аминокислот из другого встречающегося в природе белка или искусственной последовательности аминокислот.

Полипептиды согласно настоящему изобретению включают полипептиды, которые были модифицированы любым способом и с любой целью, например, для: (1) снижения восприимчивости к протеолизу, (2) уменьшения восприимчивости к окислению, (3) изменения сродства к связыванию для образования белковых комплексов, (4) изменения сродства к связыванию и (4) придания или модификации других физико-химических или функциональных свойств. Аналоги включают мутеины полипептида. Например, одна или несколько замен аминокислот (например, консервативных замен

аминокислот) могут быть введены во встречающуюся в природе последовательность (например, в часть полипептида, расположенную вне домена(ов), образующего(их) межмолекулярные контакты). «Консервативная замена аминокислоты» представляет собой замену, по существу не изменяющую структурные характеристики исходной последовательности (например, заменяющая аминокислота не проявляет тенденции к разрушению спирали, возникающей в исходной последовательности, или разрушению других типов вторичной структуры, характерные для исходной последовательности или необходимые для ее функционирования). Примеры известных в данной области техники вторичных и третичных структур полипептидов описаны в источниках: *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); и Thornton et al. *Nature* 354:105 (1991), все из которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

«Вариант» полипептида включает последовательность аминокислот, в которую были встроены, из которой были удалены и/или в которой были заменены один или большее количество остатков аминокислот относительно другой последовательности полипептидов. Варианты согласно настоящему изобретению включают содержащие варианты доменов CH₂ или CH₃. Согласно определенным вариантам реализации вариант включает одну или большее количество мутаций, присутствие которых в молекуле Fc повышает сродство полипептида к одному или большему количеству FcγRs. Такие варианты проявляют повышенную антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность. Примеры обеспечивающих такой эффект вариантов описаны в патенте США № 7317091.

Другие варианты включают уменьшающие способность содержащих CH₃-домен полипептидов к гомодимеризации, наряду с повышением способность к гетеродимеризации. Примеры таких вариантов Fc описаны в патентах США №5731168 и №7183076. Дополнительные примеры описаны в предварительной заявке на патент США 61/019569 того же заявителя, поданной 1/7/08, и 61/120,305, поданной 12/5/08 (обе заявки включены в настоящий документ полностью

посредством ссылки).

«Производное» полипептида представляет собой полипептид (например, антитело), который был химически модифицирован, например, путем сопряжения с другим химическим фрагментом, таким как, например, полиэтиленгликоль, цитотоксический агент, альбумин (например, альбумин сыворотки человека), путем фосфорилирования и гликозилирования. Если не указано иное, термин «антитело» включает, помимо антител, содержащих две полноразмерных тяжелых цепи и две полноразмерных легких цепи, их производные, варианты, фрагменты и мутеины, примеры которых описаны в настоящем документе.

Содержащий СНЗ-домен полипептид может иметь, например, структуру встречающегося в природе иммуноглобулина. «Имуноглобулин» представляет собой тетрамерную молекулу. Во встречающихся в природе иммуноглобулинах каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, при этом каждая пара содержит одну «легкую» (приблизительно 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (приблизительно 50–70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи включает переменную область размером приблизительно 100–110 или более аминокислот, в первую очередь, отвечающую за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константную область, в первую очередь, отвечающую за эффекторную функцию. Легкие цепи человека классифицируют как легкие цепи каппа и лямбда. Тяжелые цепи классифицируют как мю, дельта, гамма, альфа или эпсилон, и они определяют изотип антитела: IgM, IgD, IgG, IgA и IgE, соответственно. Переменные и константные области в составе легких и тяжелых цепей соединены областью «J», имеющей длину приблизительно 12 или более аминокислот, при этом тяжелая цепь также включает область «D» длиной приблизительно 10 или более аминокислот. См. в целом: *Fundamental Immunology* Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (включен в настоящий документ посредством ссылки полностью для любых целей). Переменные области каждой пары легкой/тяжелой цепи образуют участок связывания антитела, так что интактный иммуноглобулин содержит два сайта связывания.

Встречающиеся в природе цепи иммуноглобулинов демонстрируют

одинаковую общую структуру, включающую относительно консервативные каркасные области (FR), соединенные тремя гипервариабельными областями, также называемыми определяющими комплементарность областями, или CDR. В направлении от N-конца к C-концу и легкие, и тяжелые цепи содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Обозначения аминокислот каждого домена соответствуют определениям Kabat et al. из руководства: Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242, 1991. Интактные антитела включают поликлональные, моноклональные, гибридные, гуманизированные или полностью принадлежащие человеку, содержащие полноразмерные тяжелые и легкие цепи.

Антитело может содержать один или большее количество сайтов связывания. При наличии более чем одного сайта связывания указанные сайты связывания могут быть идентичны друг другу, или могут различаться. Например, встречающийся в природе иммуноглобулин человека, как правило, содержит два идентичных сайта связывания, тогда как «биспецифическое», или «бифункциональное» антитело содержит два разных сайта связывания.

Термин «антитело человека» включает все антитела, содержащие одну или большее количество переменных и константных областей, происходящих из последовательностей иммуноглобулина человека. Согласно одному варианту реализации все переменные и константные домены происходят из последовательностей иммуноглобулина человека (полностью принадлежащего человеку антитела). Указанные антитела могут быть получены различными способами, примеры которых описаны ниже, в том числе путем иммунизации представляющим интерес антигеном мыши, генетически модифицированной для экспрессирования антител, происходящих из кодирующих тяжелые и/или легкие цепи человека. Один или большее количество генов, кодирующих тяжелые цепи человека, могут быть изменены таким образом, чтобы включать мутацию Ser362. Когда таких мышей иммунизируют антигеном, у мышей синтезируются антитела человека с мутацией Ser364.

Гуманизированное антитело имеет последовательность, отличающуюся от последовательности антитела, происходящего из не являющегося человеком вида, одной или большим количеством замен, делеций и/или добавлений аминокислот, таким образом, что указанное гуманизированное антитело с меньшей вероятностью индуцирует иммунный ответ, и/или индуцирует менее тяжелый иммунный ответ по сравнению с антителом, происходящим из не являющегося человеком вида при введении субъекту-человеку. Согласно одному варианту реализации определенные аминокислоты в каркасных и константных доменах тяжелой и/или легкой цепей антитела, происходящего из не являющегося человеком вида, мутированы для получения гуманизированного антитела. Согласно другому варианту реализации константный(ые) домен(ы) антитела человека присоединены к вариабельному(ым) домену(ам), происходящему(им) из не являющегося человеком вида. Примеры способов получения гуманизированных антител можно найти в патентах США №№ 6054297, 5886152 и 5877293.

Термин «гибридное антитело» относится к антителу, которое содержит одну или большее количество областей из одного антитела и одну или большее количество областей из одного или нескольких других антител. Согласно одному примеру гибридного антитела часть тяжелой и/или легкой цепи идентична гомологичным или происходящим из антитела конкретного вида или антитела, принадлежащего конкретному классу или подклассу, а оставшаяся часть цепи(ей) идентична, гомологична или происходит из антител(а) другого вида, или принадлежит антителу другого класса или подкласса. Также включены фрагменты таких антител, проявляющие требуемую биологическую активность.

Фрагменты или аналоги антител могут быть легко получены специалистами в данной области техники с применением принципов, изложенных в настоящем описании, и хорошо известных в данной области техник. Предпочтительные amino- и карбоксильные концы фрагментов или аналогов расположены возле границ функциональных доменов. Структурные и функциональные домены могут быть идентифицированы путем сравнения данных о последовательностях аминокислот и/или нуклеотидов с общедоступными или частными

базами данных последовательностей.

Компьютеризированные способы сравнения можно применять для идентификации мотивов последовательностей или белковых доменов с предсказанной конформацией, присутствующих в других белках с известной структурой и/или функцией.

Известны способы идентификации последовательностей белков, подвергающихся укладке в известную трехмерную структуру. См., например, Bowie et al., 1991, Science 253:164.

«Антитело с привитыми CDR» представляет собой антитело, содержащее одну или большее количество областей CDR, происходящих из антитела конкретного вида или изоформа, и каркасную область другого антитела того же или другого вида или изоформа.

«Мультиспецифическое антитело» представляет собой антитело, распознающее более одного эпитопа на одном или нескольких антигенах. Подклассом антител указанного типа являются «биспецифические антитела».

«Процент идентичности» двух полинуклеотидных или двух полипептидных последовательностей определяют путем сравнения указанных последовательностей с применением компьютерной программы GAP (часть пакета GCG Wisconsin Package, версия 10.3 (Accelrys, Сан-Диего, Калифорния)) с применением параметров по умолчанию.

Термины «полинуклеотид», «олигонуклеотид» и «нуклеиновая кислота» используются в различных разделах настоящего описания взаимозаменяемо и включают молекулы ДНК (например, кДНК или геномную ДНК), молекулы РНК (например, мРНК), аналоги ДНК или РНК, полученные с применением аналогов нуклеотидов (например, пептидные нуклеиновые кислоты и не встречающиеся в природе аналоги нуклеотидов) и их гибриды. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двуцепочечной. Согласно одному варианту реализации молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению содержат непрерывную открытую рамку считывания, кодирующую антитело или Fc-гибрид, и его производное, мутант или вариант.

Два одноцепочечных полинуклеотида «полностью

комплементарны» друг другу, если их последовательности могут быть выровнены в антипараллельной ориентации таким образом, что каждый нуклеотид в одном полинуклеотиде располагается напротив комплементарного нуклеотида в другом полинуклеотиде без введения пропусков и без неспаренных нуклеотидов на 5'-конце или 3'-конце какой-либо из последовательностей. Полинуклеотид «комплементарен» другому полинуклеотиду, если указанные два полинуклеотида способны гибридизоваться друг с другом в умеренно жестких условиях. Соответственно, полинуклеотид может быть комплементарен другому полинуклеотиду, не являясь полностью комплементарным ему.

«Вектор» представляет собой нуклеиновую кислоту, которую можно применять для введения другой нуклеиновой кислоты, связанной с ней, в клетку. Один тип векторов представлен «плазмидой», которая представляет собой линейную или кольцевую молекулу двуцепочечной ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты нуклеиновой кислоты. Другой тип вектора представлен вирусным вектором (например, дефектные по репликации ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), отличающимся тем, что дополнительные сегменты ДНК можно вводить в вирусный геном. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую их вводят (например, бактериальные векторы, содержащие бактериальную точку начала репликации и эписомальные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) встраиваются в геном клетки-хозяина при введении в указанную клетку-хозяина, и таким образом реплицируются вместе с геномом хозяина. «Экспрессионный вектор» представляет собой тип вектора, способный направлять экспрессию выбранного полинуклеотида.

Последовательность нуклеотидов «функционально связана» с регуляторной последовательностью, если указанная регуляторная последовательность влияет на экспрессию (например, уровень, временные характеристики или локализацию экспрессии) указанной последовательности нуклеотидов. «Регуляторная последовательность» представляет собой нуклеиновую кислоту, которая влияет на экспрессию (например, уровень, временные

характеристики или локализацию экспрессии) нуклеиновой кислоты, с которой она функционально связана. Регуляторная последовательность может, например, оказывать эффекты непосредственно на регулируемую нуклеиновую кислоту, или действовать через одну или большее количество других молекул (например, полипептидов, которые связываются с регуляторной последовательностью и/или нуклеиновой кислотой). Примеры регуляторных последовательностей включают промоторы, энхансеры и другие элементы контроля экспрессии (например, сигналы полиаденилирования). Дополнительные примеры регуляторных последовательностей описаны, например, Goeddel, 1990, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA; и Baron et al, 1995, *Nucleic Acids Res.* 23:3605-06.

«Клетка-хозяин» представляет собой клетку, которая может быть использована для экспрессии нуклеиновой кислоты, например, нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению. Клетка-хозяин может представлять собой прокариота, например, *E. coli*, или может представлять собой эукариота, например, одноклеточного эукариота (например, дрожжи или другой гриб), растительную клетку (например, растительную клетку табака или томата), клетку животного (например, клетку человека, клетку обезьяны, клетку хомяка, клетку крысы, клетку мыши или клетку насекомого) или гибридому. Примеры клеток-хозяев включают линии клеток яичника китайского хомячка (CHO) или их производные, в том числе линию CHO DXB-11, дефицитную по ДГФР (см. Urlaub et al, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-20), линии клеток CHO, растущие на бессывороточной среде (см. Rasmussen et al., 1998, *Cytotechnology* 28:31), клетки CS-9, клетки, производные от CHO DXB-11 и клетки AM-1/D (описанные в патенте США № 6210924). Другие линии клеток CHO включают CHO-K1 (ATCC# CCL-61), EM9 (ATCC# CRL-1861) и UV20 (ATCC# CRL-1862). Примеры других клеток-хозяев включают линию COS-7 клеток почки обезьяны (ATCC CRL 1651) (см. Gluzman et al., 1981, *Cell* 23:175), клетки L, клетки C 127, клетки 3T3 (ATCC CCL 163), клетки HeLa, линии клеток ВНК (ATCC CRL 10), линию клеток CV1/EBNA, происходящую из линии

клеток почки африканской зеленой мартышки CV1 (ATCC CCL 70) (см. McMahan et al., 1991, EMBO J. 10:2821), эмбриональные клетки почки человека, такие как 293, 293 EBNA или MSR 293, эпидермальные клетки человека A431, клетки человека Colo205, другие линии трансформированных клеток приматов, нормальные диплоидные клетки, линии клеток, происходящие из *in vitro* культуры первичной ткани, первичные эксплантаты, клетки HL-60, U937, HaK или Jurkat. Как правило, клетка-хозяин представляет собой культивируемую клетку, которая может быть трансформирована или трансфицирована кодирующей полипептид нуклеиновой кислотой, которая затем может экспрессироваться в клетке-хозяине.

Выражение «рекомбинантная клетка-хозяин» может быть применено для обозначения клетки-хозяина, которая была трансформирована или трансфицирована нуклеиновой кислотой, которую необходимо экспрессировать. Клетка-хозяин также может представлять собой клетку, которая содержит нуклеиновую кислоту, но не экспрессирует ее на требуемом уровне, если в указанную клетку-хозяина не введена регуляторная последовательность таким образом, чтобы обеспечить ее функциональную связь с нуклеиновой кислотой. Следует понимать, что термин клетка-хозяин относится не только к конкретной клетке-субъекту, но и к потомству или потенциальному потомству такой клетки. Поскольку в последующих поколениях могут происходить определенные модификации в результате, например, мутации или воздействия окружающей среды, такое потомство фактически может не быть идентичным исходной клетке, но, тем не менее, входить в объем термина согласно настоящему документу.

ПРИМЕРЫ

Следующие примеры, в том числе проведенные эксперименты и полученные результаты, представлены исключительно в иллюстративных целях и не должны быть истолкованы как ограничивающие настоящее изобретение.

ПРИМЕР 1

Получение конструкций с цистеиновым зажимом

Гибридные пептиды, содержащие последовательности Fc с парами заряженных остатков с цистеиновым зажимом (шарнирная

область удалена), стабильно экспрессировали в адаптированной к росту в суспензии в бессывороточной среде линии клеток CHO-K1. Fc-гибридные молекулы клонировали в стабильный экспрессионный вектор, содержащий ген устойчивости к пурамицину, а цепи Fc клонировали в гигромицин-содержащий экспрессионный вектор (Selexis, Inc.). Плазмиды трансфицировали в пропорции 1:1 с применением липофектамина LTX; клетки отбирали через 2 дня после трансфекции на ростовой среде, содержащей 10 мкг/мл пурамицина и 600 мкг/мл гигромицина. В ходе отбора среду заменяли 2 раза в неделю. Когда жизнеспособность клеток достигала приблизительно 90%, клетки размножали для масштабного производства в подпитываемой культуре. Клетки высевали с плотностью 1×10^6 /мл в продукционную среду и подпитывали на 3, 6 и 8 день. Кондиционированную среду (CM), продуцированную клетками, собирали на 10 день и осветляли. Конечные показатели жизнеспособности, как правило, составляли более 90%.

Fc-гибриды осветляли, кондиционированную среду (CM) очищали с применением двухэтапной хроматографической процедуры. Приблизительно 5 л CM вводили прямо в колонку GE MabSelect SuRe, заранее уравновешенную забуференным фосфатом солевым раствором (ФСБ) Дульбекко. Связанный белок проводили через три этапа отмывки: сначала в 3-х объемах колонки (CV) ФСБ; затем в 1 CV 20 мМ Tris, 100 мМ хлорида натрия, pH 7,4; и наконец, в 3 CV 500 мМ L-аргинина, pH 7,5. Указанные этапы отмывки устраняли несвязанные или слабосвязанные компоненты среды и загрязняющие примеси из клеток-хозяев. Затем колонку повторно уравновешивали 5 CV 20 мМ Tris, 100 мМ хлорида натрия при pH 7,4 что возвращает УФ-поглощение к базовому уровню. Нужный белок элюировали 100 мМ уксусной кислотой при pH 3,6 и собирали в массе. Объединенный белок быстро титровали до значений pH в диапазоне от 5,0 до 5,5, используя 1M Tris-HCl, pH 9,2.

Затем объединенный белок со скорректированным pH загружали на колонку с сульфопропил-сефарозой GE SP Sepharose HP, предварительно уравновешенную 20 мМ MES при pH 6,0. Затем связанный белок промывали 5 CV уравновешивающего буфера, и наконец элюировали 20 CV, в 0-50% линейном градиенте

концентраций от 0 до 400 мМ хлорида натрия в 20 мМ MES при pH 6,0. При элюировании собирали фракции и анализировали посредством аналитической эксклюзионной хроматографии (Superdex 200) для определения подходящих фракций для объединения с получением гомогенного продукта. Высокоэффективная хроматография с сульфопропил-сефарозой (SP) устраняет связанные с продуктом загрязняющие примеси, такие как свободный Fc, усеченные молекулы и мультимеры Fc и GDF15.

Затем в полученных высокоэффективной SP-хроматографией объединенных фракциях буфер заменяли на рецептурный буфер путем диализа, концентрировали приблизительно до 15 мг/мл с применением центрифуги с отсечением по молекулярной массе 10 кДа Sartorius Vivaspin 20 и, в заключение, стерилизовали фильтрацией. Полученный раствор, содержащий очищенные Fc-гибридные молекулы, помещали на хранение при 5° С. Идентичность и чистоту полученных продуктов оценивали с применением масс-спектрального анализа, электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия и эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии.

ПРИМЕР 2

Анализ конструкций с цистеиновым зажимом

Образование дисульфидной связи

Гибридные Fc-белки без шарнирной области, содержащие мутацию L351C, экспрессировали и очищали согласно описанию выше.

Образцы анализировали с применением ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле. Конструкции с разной молекулярной массой обладают разной подвижностью в ДСН-ПААГ. Это облегчает идентификацию связанных цепей. На фиг. 3 последняя дорожка соответствует восстанавливающим условиям, при которых дисульфидные связи распадаются, а другие дорожки соответствуют невосстанавливающим условиям для различных фракций в процессе очищения. Дисульфиды остаются интактными в невосстанавливающих условиях. Выше расположенная полоса, наблюдаемая в невосстанавливающих условиях, демонстрирует, что введенная ковалентная связь за счет дисульфидных связей между двумя цепями Fc на СН3-домене действительно формируется. Последняя дорожка на

фиг. 3 демонстрирует, что в восстанавливающих условиях сконструированные дисульфиды распадаются, как и ожидалось, обуславливая возникновение двойных полос.

Анализ фармакокинетики

Проводили сравнение шести гибридных конструкций Fc-белков, не содержащих шарнирной области (A-F).

A. Fc-гибрид без шарнира и без линкера между терапевтическим пептидом и Fc.

B. То же, что и A, за исключением вариации в терапевтическом пептиде.

C. То же, что и B, за исключением того, что Fc соединен с терапевтическим пептидом негликозилированным линкером.

D. То же, что и C за исключением другого линкера.

E. То же, что и A, за исключением того, что одна цепь Fc включает замену Y349C, а другая включает замену S354C.

F. То же, что и B, за исключением того, что одна цепь Fc включает замену Y349C, а другая включает замену S354C.

Экспериментальные вещества вводили внутривенно через хвостовую вену самцам мышей с индуцированным диетой ожирением CD-1 (n=3 на каждое экспериментальное вещество) в дозе 1 мг/кг. Собирали серийные образцы крови (50 мкл на каждый момент времени) каждого животного в следующие моменты времени: 1, 4, 8, 24, 72, 168, 240 и 336 часов после дозирования. Концентрации экспериментального вещества в образцах сыворотки количественно определяли с применением сэндвич-анализа ELISA, где используются антитела против экспериментальных веществ для захвата и детекции. Нижний предел количественного определения для анализа составлял 313 мкг/л. Строили графики для профилей концентрация-время и выполняли анализ без компарментализации для вычисления показателей ФК с применением ПО Watson.

Как видно на фиг. 4, из 6 протестированных вариантов варианты с цистеиновым зажимом, E и F, имели минимальный общий системный клиренс и, соответственно, максимальную экспозицию (выражаемую как площадь под кривой концентрация-время, AUC). E продемонстрировал более чем 3-кратное увеличение AUC по сравнению с вариантом без цистеинового зажима A, а F

продемонстрировал в 1,6-кратное улучшение AUC по сравнению с В. Соответственно, фармакокинетика гибридных Fc-белков, в которых отсутствует шарнирная область, значительно улучшается при введении дисульфидной связи в контактную поверхность СНЗ.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ЭМДЖИН ИНК.

<120> СТАБИЛИЗАЦИЯ FC-СОДЕРЖАЩИХ ПОЛИПЕПТИДОВ

<130> A-1852-WO-RCT

<140>

<141>

<150> 61/860800

<151> 2013-07-31

<160> 58

<170> PatentIn, версия 3.5

<210> 1

<211> 330

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 2

<211> 326

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
100 105 110

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

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 3

<211> 377

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
195 200 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
210 215 220

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
245 250 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 4

<211> 327

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 5

<211> 353

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ala Ser Pro Thr Ser Pro Lys Val Phe Pro Leu Ser Leu Cys Ser Thr
1 5 10 15

Gln Pro Asp Gly Asn Val Val Ile Ala Cys Leu Val Gln Gly Phe Phe
20 25 30

Pro Gln Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp Ser Glu Ser Gly Gln Gly Val
35 40 45

Thr Ala Arg Asn Phe Pro Pro Ser Gln Asp Ala Ser Gly Asp Leu Tyr
50 55 60

Thr Thr Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gln Cys Leu Ala Gly
65 70 75 80

Lys Ser Val Thr Cys His Val Lys His Tyr Thr Asn Pro Ser Gln Asp
85 90 95

Val Thr Val Pro Cys Pro Val Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro
100 105 110

Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Cys Cys His Pro Arg Leu Ser
115 120 125

Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu Leu Leu Gly Ser Glu Ala Asn
130 135 140

Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg Asp Ala Ser Gly Val Thr Phe
145 150 155 160

Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser Ala Val Gln Gly Pro Pro Glu
165 170 175

Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val Ser Ser Val Leu Pro Gly Cys
180 185 190

Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr Phe Thr Cys Thr Ala Ala Tyr
195 200 205

Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala Thr Leu Ser Lys Ser Gly Asn
210 215 220

Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser Glu Glu Leu
225 230 235 240

Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg Gly Phe Ser
245 250 255

Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln Glu Leu Pro
260 265 270

Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg Gln Glu Pro Ser Gln Gly
275 280 285

Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala Ala Glu Asp
290 295 300

Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His Glu Ala Leu
305 310 315 320

Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Leu Ala Gly Lys Pro
325 330 335

Thr His Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp Gly Thr Cys
340 345 350

Tyr

<210> 6

<211> 384

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Pro Thr Lys Ala Pro Asp Val Phe Pro Ile Ile Ser Gly Cys Arg
1 5 10 15

His Pro Lys Asp Asn Ser Pro Val Val Leu Ala Cys Leu Ile Thr Gly
20 25 30

Tyr His Pro Thr Ser Val Thr Val Thr Trp Tyr Met Gly Thr Gln Ser
35 40 45

Gln Pro Gln Arg Thr Phe Pro Glu Ile Gln Arg Arg Asp Ser Tyr Tyr
50 55 60

Met Thr Ser Ser Gln Leu Ser Thr Pro Leu Gln Gln Trp Arg Gln Gly
65 70 75 80

Glu Tyr Lys Cys Val Val Gln His Thr Ala Ser Lys Ser Lys Lys Glu
 85 90 95

Ile Phe Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro
 100 105 110

Thr Ala Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala
 115 120 125

Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys
 130 135 140

Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu
 145 150 155 160

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

Val Gln Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe Val
 180 185 190

Val Gly Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala Gly
 195 200 205

Lys Val Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His Ser
 210 215 220

Asn Gly Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu
 225 230 235 240

Trp Asn Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu
 245 250 255

Pro Pro Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro
 260 265 270

Val Lys Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala
 275 280 285

Ala Ser Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile
 290 295 300

Leu Leu Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe
 305 310 315 320

Ala Pro Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala
 325 330 335

Trp Ser Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr
 340 345 350

Tyr Thr Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala
 355 360 365

Ser Arg Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His Gly Pro Met Lys
 370 375 380

<210> 7
 <211> 428
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Ala Ser Thr Gln Ser Pro Ser Val Phe Pro Leu Thr Arg Cys Cys Lys
 1 5 10 15

Asn Ile Pro Ser Asn Ala Thr Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Ala Thr
 20 25 30

Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Met Val Thr Trp Asp Thr Gly Ser Leu
 35 40 45

Asn Gly Thr Thr Met Thr Leu Pro Ala Thr Thr Leu Thr Leu Ser Gly
 50 55 60

His Tyr Ala Thr Ile Ser Leu Leu Thr Val Ser Gly Ala Trp Ala Lys
 65 70 75 80

Gln Met Phe Thr Cys Arg Val Ala His Thr Pro Ser Ser Thr Asp Trp
 85 90 95

Val Asp Asn Lys Thr Phe Ser Val Cys Ser Arg Asp Phe Thr Pro Pro
 100 105 110

Thr Val Lys Ile Leu Gln Ser Ser Cys Asp Gly Gly Gly His Phe Pro
 115 120 125

Pro Thr Ile Gln Leu Leu Cys Leu Val Ser Gly Tyr Thr Pro Gly Thr
 130 135 140

Ile Asn Ile Thr Trp Leu Glu Asp Gly Gln Val Met Asp Val Asp Leu
 145 150 155 160

Ser Thr Ala Ser Thr Thr Gln Glu Gly Glu Leu Ala Ser Thr Gln Ser
 165 170 175

Glu Leu Thr Leu Ser Gln Lys His Trp Leu Ser Asp Arg Thr Tyr Thr
 180 185 190

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

Cys Ala Asp Ser Asn Pro Arg Gly Val Ser Ala Tyr Leu Ser Arg Pro
210 215 220

Ser Pro Phe Asp Leu Phe Ile Arg Lys Ser Pro Thr Ile Thr Cys Leu
225 230 235 240

Val Val Asp Leu Ala Pro Ser Lys Gly Thr Val Asn Leu Thr Trp Ser
245 250 255

Arg Ala Ser Gly Lys Pro Val Asn His Ser Thr Arg Lys Glu Glu Lys
260 265 270

Gln Arg Asn Gly Thr Leu Thr Val Thr Ser Thr Leu Pro Val Gly Thr
275 280 285

Arg Asp Trp Ile Glu Gly Glu Thr Tyr Gln Cys Arg Val Thr His Pro
290 295 300

His Leu Pro Arg Ala Leu Met Arg Ser Thr Thr Lys Thr Ser Gly Pro
305 310 315 320

Arg Ala Ala Pro Glu Val Tyr Ala Phe Ala Thr Pro Glu Trp Pro Gly
325 330 335

Ser Arg Asp Lys Arg Thr Leu Ala Cys Leu Ile Gln Asn Phe Met Pro
340 345 350

Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu His Asn Glu Val Gln Leu Pro Asp
355 360 365

Ala Arg His Ser Thr Thr Gln Pro Arg Lys Thr Lys Gly Ser Gly Phe
370 375 380

Phe Val Phe Ser Arg Leu Glu Val Thr Arg Ala Glu Trp Glu Gln Lys
385 390 395 400

Asp Glu Phe Ile Cys Arg Ala Val His Glu Ala Ala Ser Pro Ser Gln
405 410 415

Thr Val Gln Arg Ala Val Ser Val Asn Pro Gly Lys
420 425

<210> 8

<211> 452

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 8

Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn
1 5 10 15

Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp
20 25 30

Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Leu Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser
35 40 45

Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys
50 55 60

Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln
65 70 75 80

Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn
85 90 95

Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys
100 105 110

Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg
115 120 125

Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile
130 135 140

Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr
145 150 155 160

Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr
165 170 175

Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Gly Gln
180 185 190

Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln
195 200 205

Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val
210 215 220

Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr
225 230 235 240

Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr
245 250 255

Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn
260 265 270

Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala
275 280 285

Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr
290 295 300

Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg
305 310 315 320

Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro
325 330 335

Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu
340 345 350

Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg
355 360 365

Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro
370 375 380

Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val
385 390 395 400

Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Ala His
405 410 415

Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr
420 425 430

Gly Lys Pro Thr Leu Tyr Asn Val Ser Leu Val Met Ser Asp Thr Ala
435 440 445

Gly Thr Cys Tyr
450

<210> 9

<211> 227

<212> BEJOK

<213> Homo sapiens

<400> 9

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 10

<211> 17

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 10

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly

<210> 11

<211> 231

<212> BEJIOK

<213> Homo sapiens

<400> 11

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
1 5 10 15

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
35 40 45

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
50 55 60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
65 70 75 80

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
85 90 95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
100 105 110

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
115 120 125

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
130 135 140

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
145 150 155 160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
165 170 175

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

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
195 200 205

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
210 215 220

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 12
<211> 227
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 12
Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 13
<211> 233
<212> BEJOK
<213> Homo sapiens

<400> 13
Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro
1 5 10 15

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
20 25 30

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
35 40 45

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
50 55 60

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
65 70 75 80

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
85 90 95

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
100 105 110

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
115 120 125

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
130 135 140

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
145 150 155 160

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
165 170 175

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
180 185 190

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
195 200 205

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
210 215 220

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 14
<211> 228
<212> BEJOK
<213> Homo sapiens

<400> 14
Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Leu Gly Lys
225

<210> 15

<211> 227

<212> BEJOK

<213> Mus sp.

<400> 15

Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu
1 5 10 15

Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr
20 25 30

Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys
35 40 45

Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val
50 55 60

His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe
65 70 75 80

Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser
130 135 140

Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu
145 150 155 160

Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro
165 170 175

Ile Met Asn Thr Asn Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val
180 185 190

Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu
195 200 205

His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 16
<211> 237
<212> BEJOK
<213> Mus sp.

<400> 16
Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro
1 5 10 15

Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile
20 25 30

Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile
35 40 45

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln
50 55 60

Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln
65 70 75 80

Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu
85 90 95

Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys
100 105 110

Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys
115 120 125

Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro
130 135 140

Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr
145 150 155 160

Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys
 165 170 175

Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 180 185 190

Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val
 195 200 205

Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn
 210 215 220

His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 225 230 235

<210> 17
 <211> 239
 <212> BEJOK
 <213> Mus sp.

<400> 17
 Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Pro Cys Pro Pro Cys Lys
 1 5 10 15

Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val
 20 25 30

Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Thr
 35 40 45

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

Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln
 65 70 75 80

Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser
 85 90 95

Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys
 100 105 110

Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile
 115 120 125

Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 130 135 140

Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser Leu Thr Cys Leu
 145 150 155 160

Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp Thr Ser Asn
165 170 175

Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala Pro Val Leu Asp Ser
180 185 190

Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Met Lys Thr Ser Lys
195 200 205

Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg His Glu Gly Leu
210 215 220

Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
225 230 235

<210> 18

<211> 238

<212> БЕЛОК

<213> Mus sp.

<400> 18

Glu Pro Arg Val Pro Ile Thr Gln Asn Pro Cys Pro Pro Leu Lys Glu
1 5 10 15

Cys Pro Pro Cys Ala Ala Pro Asp Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
20 25 30

Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro
35 40 45

Met Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val
50 55 60

Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
65 70 75 80

Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala
85 90 95

Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys
100 105 110

Lys Val Asn Asn Arg Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
115 120 125

Lys Pro Arg Gly Pro Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro
130 135 140

Pro Ala Glu Glu Met Thr Lys Lys Glu Phe Ser Leu Thr Cys Met Ile
 145 150 155 160

Thr Gly Phe Leu Pro Ala Glu Ile Ala Val Asp Trp Thr Ser Asn Gly
 165 170 175

Arg Thr Glu Gln Asn Tyr Lys Asn Thr Ala Thr Val Leu Asp Ser Asp
 180 185 190

Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Gln Lys Ser Thr Trp
 195 200 205

Glu Arg Gly Ser Leu Phe Ala Cys Ser Val Val His Glu Val Leu His
 210 215 220

Asn His Leu Thr Thr Lys Thr Ile Ser Arg Ser Leu Gly Lys
 225 230 235

<210> 19
 <211> 233
 <212> BEJOK
 <213> Mus sp.

<400> 19
 Glu Pro Arg Ile Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Cys Pro
 1 5 10 15

Pro Gly Asn Ile Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
 20 25 30

Pro Lys Asp Ala Leu Met Ile Ser Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val
 35 40 45

Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val His Val Ser Trp Phe
 50 55 60

Val Asp Asn Lys Glu Val His Thr Ala Trp Thr Gln Pro Arg Glu Ala
 65 70 75 80

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His
 85 90 95

Gln Asp Trp Met Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys
 100 105 110

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Arg
 115 120 125

Ala Gln Thr Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Arg Glu Gln Met
 130 135 140

Ser Lys Lys Lys Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Thr Asn Phe Phe Ser
145 150 155 160

Glu Ala Ile Ser Val Glu Trp Glu Arg Asn Gly Glu Leu Glu Gln Asp
165 170 175

Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Ile Leu Asp Ser Asp Gly Thr Tyr Phe Leu
180 185 190

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Thr Asp Ser Trp Leu Gln Gly Glu Ile
195 200 205

Phe Thr Cys Ser Val Val His Glu Ala Leu His Asn His His Thr Gln
210 215 220

Lys Asn Leu Ser Arg Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 20

<211> 233

<212> БЕЖОК

<213> Ovis aries

<400> 20

Glu Pro Gly Cys Pro Asp Pro Cys Lys His Cys Arg Cys Pro Pro Pro
1 5 10 15

Glu Leu Pro Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

Asp Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
35 40 45

Asp Val Gly Gln Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp
50 55 60

Asn Val Glu Val Arg Thr Ala Arg Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
65 70 75 80

Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp
85 90 95

Trp Thr Gly Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val His Asn Glu Ala Leu
100 105 110

Pro Ala Pro Ile Val Arg Thr Ile Ser Arg Thr Lys Gly Gln Ala Arg
115 120 125

Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Ala Pro Pro Gln Glu Glu Leu Ser Lys
130 135 140

Ser Thr Leu Ser Val Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Tyr Pro Asp Tyr
145 150 155 160

Ile Ala Val Glu Trp Gln Lys Asn Gly Gln Pro Glu Ser Glu Asp Lys
165 170 175

Tyr Gly Thr Thr Thr Ser Gln Leu Asp Ala Asp Gly Ser Tyr Phe Leu
180 185 190

Tyr Ser Arg Leu Arg Val Asp Lys Asn Ser Trp Gln Glu Gly Asp Thr
195 200 205

Tyr Ala Cys Val Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
210 215 220

Lys Ser Ile Ser Lys Pro Pro Gly Lys
225 230

<210> 21

<211> 228

<212> BEJOK

<213> Ovis aries

<400> 21

Gly Ile Ser Ser Asp Tyr Ser Lys Cys Ser Lys Pro Pro Cys Val Ser
1 5 10 15

Arg Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ser Leu Met
20 25 30

Ile Thr Gly Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Gln Gly
35 40 45

Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asn Val Glu Val Arg
50 55 60

Thr Ala Arg Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
65 70 75 80

Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Asp His Trp Thr Gly Gly Lys
85 90 95

Glu Phe Lys Cys Lys Val His Ser Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Val
100 105 110

Arg Thr Ile Ser Arg Ala Lys Gly Gln Ala Arg Glu Pro Gln Val Tyr
115 120 125

Val Leu Ala Pro Pro Gln Glu Glu Leu Ser Lys Ser Thr Leu Ser Val
130 135 140

Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Tyr Pro Asp Tyr Ile Ala Val Glu Trp
145 150 155 160

Gln Arg Ala Arg Gln Pro Glu Ser Glu Asp Lys Tyr Gly Thr Thr Thr
165 170 175

Ser Gln Leu Asp Ala Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Arg
180 185 190

Val Asp Lys Ser Ser Trp Gln Arg Gly Asp Thr Tyr Ala Cys Val Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Lys
210 215 220

Pro Pro Gly Lys
225

<210> 22

<211> 232

<212> BEJOK

<213> Bos taurus

<400> 22

Asp Pro Thr Cys Lys Pro Ser Pro Cys Asp Cys Cys Pro Pro Pro Glu
1 5 10 15

Leu Pro Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
20 25 30

Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
35 40 45

Val Gly His Asp Asp Pro Glu Val Lys Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp
50 55 60

Val Glu Val Asn Thr Ala Thr Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Ala Leu Arg Ile Gln His Gln Asp Trp
85 90 95

Thr Gly Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val His Asn Glu Gly Leu Pro
100 105 110

Ala Pro Ile Val Arg Thr Ile Ser Arg Thr Lys Gly Pro Ala Arg Glu
115 120 125

Pro Gln Val Tyr Val Leu Ala Pro Pro Gln Glu Glu Leu Ser Lys Ser
130 135 140

Thr Val Ser Leu Thr Cys Met Val Thr Ser Phe Tyr Pro Asp Tyr Ile
145 150 155 160

Ala Val Glu Trp Gln Arg Asn Gly Gln Pro Glu Ser Glu Asp Lys Tyr
165 170 175

Gly Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Ala Asp Ser Ser Tyr Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Arg Val Asp Arg Asn Ser Trp Gln Glu Gly Asp Thr Tyr
195 200 205

Thr Cys Val Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
210 215 220

Ser Thr Ser Lys Ser Ala Gly Lys
225 230

<210> 23
<211> 230
<212> БЕЛОК
<213> Bos taurus

<400> 23
Gly Val Ser Ser Asp Cys Ser Lys Pro Asn Asn Gln His Cys Cys Val
1 5 10 15

Arg Glu Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Thr Gly Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asn Val Gly
35 40 45

His Asp Asn Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu
50 55 60

Val His Thr Ala Arg Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Thr Gly
85 90 95

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Ile Lys Gly Leu Ser Ala Ser
100 105 110

Ile Val Arg Ile Ile Ser Arg Ser Lys Gly Pro Ala Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Val Leu Asp Pro Pro Lys Glu Glu Leu Ser Lys Ser Thr Val
130 135 140

Ser Val Thr Cys Met Val Ile Gly Phe Tyr Pro Glu Asp Val Asp Val
145 150 155 160

Glu Trp Gln Arg Asp Arg Gln Thr Glu Ser Glu Asp Lys Tyr Arg Thr
165 170 175

Thr Pro Pro Gln Leu Asp Ala Asp Arg Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys
180 185 190

Leu Arg Val Asp Arg Asn Ser Trp Gln Arg Gly Asp Thr Tyr Thr Cys
195 200 205

Val Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Met Gln Lys Ser Thr
210 215 220

Ser Lys Ser Ala Gly Lys
225 230

<210> 24
<211> 232
<212> BEJOK
<213> Bos taurus

<400> 24
Lys Ser Glu Val Glu Lys Thr Pro Cys Gln Cys Ser Lys Cys Pro Glu
1 5 10 15

Pro Leu Gly Gly Leu Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
20 25 30

Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
35 40 45

Val Gly Gln Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp
50 55 60

Val Glu Val His Thr Ala Arg Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Ala Leu Arg Ile Gln His Gln Asp Trp
85 90 95

Leu Gln Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Gly Leu Pro
 100 105 110

Ala Pro Ile Val Arg Thr Ile Ser Arg Thr Lys Gly Gln Ala Arg Glu
 115 120 125

Pro Gln Val Tyr Val Leu Ala Pro Pro Arg Glu Glu Leu Ser Lys Ser
 130 135 140

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Leu Ile Thr Gly Phe Tyr Pro Glu Glu Ile
 145 150 155 160

Asp Val Glu Trp Gln Arg Asn Gly Gln Pro Glu Ser Glu Asp Lys Tyr
 165 170 175

His Thr Thr Ala Pro Gln Leu Asp Ala Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr
 180 185 190

Ser Lys Leu Arg Val Asn Lys Ser Ser Trp Gln Glu Gly Asp His Tyr
 195 200 205

Thr Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu Arg Asn His Tyr Lys Glu Lys
 210 215 220

Ser Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys
 225 230

<210> 25
 <211> 229
 <212> BEJOK
 <213> Rattus sp.

<400> 25
 Val Pro Arg Asn Cys Gly Gly Asp Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Gly
 1 5 10 15

Ser Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val
 20 25 30

Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile
 35 40 45

Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val His Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val
 50 55 60

Glu Val His Thr Ala Gln Thr Arg Pro Pro Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 65 70 75 80

Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Leu His Gln Asp Trp Leu
 85 90 95

Asn Gly Arg Thr Phe Arg Cys Lys Val Thr Ser Ala Ala Phe Pro Ser
100 105 110

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Pro Glu Gly Arg Thr Gln Val Pro
115 120 125

His Val Tyr Thr Met Ser Pro Thr Lys Glu Glu Met Thr Gln Asn Glu
130 135 140

Val Ser Ile Thr Cys Met Val Lys Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr
145 150 155 160

Val Glu Trp Gln Met Asn Gly Gln Pro Gln Glu Asn Tyr Lys Asn Thr
165 170 175

Pro Pro Thr Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
180 185 190

Asn Val Lys Lys Glu Lys Trp Gln Gln Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser
195 200 205

Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser
210 215 220

His Ser Pro Gly Lys
225

<210> 26
<211> 225
<212> BEJOK
<213> Rattus sp.

<400> 26
Val Pro Arg Glu Cys Asn Pro Cys Gly Cys Thr Gly Ser Glu Val Ser
1 5 10 15

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Thr Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr
20 25 30

Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Gln Asn Asp
35 40 45

Pro Glu Val Arg Phe Ser Trp Phe Ile Asp Asp Val Glu Val His Thr
50 55 60

Ala Gln Thr His Ala Pro Glu Lys Gln Ser Asn Ser Thr Leu Arg Ser
65 70 75 80

Val Ser Glu Leu Pro Ile Val His Arg Asp Trp Leu Asn Gly Lys Thr
 85 90 95

Phe Lys Cys Lys Val Asn Ser Gly Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 100 105 110

Ser Ile Ser Lys Pro Glu Gly Thr Pro Arg Gly Pro Gln Val Tyr Thr
 115 120 125

Met Ala Pro Pro Lys Glu Glu Met Thr Gln Ser Gln Val Ser Ile Thr
 130 135 140

Cys Met Val Lys Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Tyr Thr Glu Trp Lys
 145 150 155 160

Met Asn Gly Gln Pro Gln Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Pro Pro Thr Met
 165 170 175

Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Asn Val Lys Lys
 180 185 190

Glu Thr Trp Gln Gln Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu
 195 200 205

Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly
 210 215 220

Lys
 225

<210> 27
 <211> 238
 <212> БЕЖОК
 <213> Rattus sp.

<400> 27
 Glu Arg Arg Asn Gly Gly Ile Gly His Lys Cys Pro Thr Cys Pro Thr
 1 5 10 15

Cys His Lys Cys Pro Val Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 20 25 30

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Ile Leu Leu Ile Ser Gln Asn Ala
 35 40 45

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

Gln Phe Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr
 65 70 75 80

Gln Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Ala
85 90 95

Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys
100 105 110

Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
115 120 125

Lys Pro Lys Gly Leu Val Arg Lys Pro Gln Val Tyr Val Met Gly Pro
130 135 140

Pro Thr Glu Gln Leu Thr Glu Gln Thr Val Ser Leu Thr Cys Leu Thr
145 150 155 160

Ser Gly Phe Leu Pro Asn Asp Ile Gly Val Glu Trp Thr Ser Asn Gly
165 170 175

His Ile Glu Lys Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Met Asp Ser Asp
180 185 190

Gly Ser Phe Phe Met Tyr Ser Lys Leu Asn Val Glu Arg Ser Arg Trp
195 200 205

Asp Ser Arg Ala Pro Phe Val Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His
210 215 220

Asn His His Val Glu Lys Ser Ile Ser Arg Pro Pro Gly Lys
225 230 235

<210> 28

<211> 228

<212> BEJOK

<213> Oryctolagus cuniculus

<400> 28

Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro Thr Cys Pro Pro Pro Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

Glu Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Thr Trp Tyr Ile Asn Asn Glu Gln
50 55 60

Val Arg Thr Ala Arg Pro Pro Leu Arg Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr
 65 70 75 80

Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Ala His Glu Asp Trp Leu Arg
 85 90 95

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val His Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Pro Leu Glu Pro Lys
 115 120 125

Val Tyr Thr Met Gly Pro Pro Arg Glu Glu Leu Ser Ser Arg Ser Val
 130 135 140

Ser Leu Thr Cys Met Ile Asn Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val
 145 150 155 160

Glu Trp Glu Lys Asn Gly Lys Ala Glu Asp Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 165 170 175

Ala Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser
 180 185 190

Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln Arg Gly Asp Val Phe Thr Cys Ser Val
 195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Arg
 210 215 220

Ser Pro Gly Lys
 225

<210> 29
 <211> 239
 <212> БЕЛОК
 <213> Equus caballus

<400> 29
 Glu Pro Ile Pro Asp Asn His Gln Lys Val Cys Asp Met Ser Lys Cys
 1 5 10 15

Pro Lys Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile
 20 25 30

Phe Pro Pro Asn Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Thr Arg Thr Pro Glu
 35 40 45

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asn Pro Asp Val Lys
 50 55 60

Phe Asn Trp Tyr Met Asp Gly Val Glu Val Arg Thr Ala Thr Thr Arg
65 70 75 80

Pro Lys Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
85 90 95

Arg Ile Gln His Gln Asp Trp Leu Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys
100 105 110

Val Asn Asn Gln Ala Leu Pro Gln Pro Ile Glu Arg Thr Ile Thr Lys
115 120 125

Thr Lys Gly Arg Ser Gln Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Ala Pro His
130 135 140

Pro Asp Glu Asp Ser Lys Ser Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Val Lys
145 150 155 160

Asp Phe Tyr Pro Pro Glu Ile Asn Ile Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln
165 170 175

Pro Glu Leu Glu Thr Lys Tyr Ser Thr Thr Gln Ala Gln Gln Asp Ser
180 185 190

Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val Asp Arg Asn Arg
195 200 205

Trp Gln Gln Gly Thr Thr Phe Thr Cys Gly Val Met His Glu Ala Leu
210 215 220

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Asn Val Ser Lys Asn Pro Gly Lys
225 230 235

<210> 30

<211> 232

<212> БЕЛОК

<213> Equus caballus

<400> 30

Ala Arg Val Thr Pro Val Cys Ser Leu Cys Arg Gly Arg Tyr Pro His
1 5 10 15

Pro Ile Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Pro Lys Asp
20 25 30

Ala Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Val Val Thr Cys Val Val Val Asn
35 40 45

Leu Ser Asp Gln Tyr Pro Asp Val Gln Phe Ser Trp Tyr Val Asp Asn
50 55 60

Thr Glu Val His Ser Ala Ile Thr Lys Gln Arg Glu Ala Gln Phe Asn
65 70 75 80

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp
85 90 95

Leu Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Ser Val Thr Asn Val Gly Val Pro
100 105 110

Gln Pro Ile Ser Arg Ala Ile Ser Arg Gly Lys Gly Pro Ser Arg Val
115 120 125

Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro His Pro Asp Glu Leu Ala Lys Ser
130 135 140

Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Val Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp Ile
145 150 155 160

Ser Val Glu Trp Gln Ser Asn Arg Trp Pro Glu Leu Glu Gly Lys Tyr
165 170 175

Ser Thr Thr Pro Ala Gln Leu Asp Gly Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr
180 185 190

Ser Lys Leu Ser Leu Glu Thr Ser Arg Trp Gln Gln Val Glu Ser Phe
195 200 205

Thr Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Phe Thr Lys Thr
210 215 220

Asp Ile Ser Glu Ser Leu Gly Lys
225 230

<210> 31

<211> 256

<212> БЕЛОК

<213> Equus caballus

<400> 31

Glu Pro Val Leu Pro Lys Pro Thr Thr Pro Ala Pro Thr Val Pro Leu
1 5 10 15

Thr Thr Thr Val Pro Val Glu Thr Thr Thr Pro Pro Cys Pro Cys Glu
20 25 30

Cys Pro Lys Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
35 40 45

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Met Ile Thr Arg Thr Pro
50 55 60

Glu Val Thr Cys Leu Val Val Asp Val Ser His Asp Ser Ser Asp Val
65 70 75 80

Leu Phe Thr Trp Tyr Val Asp Gly Thr Glu Val Lys Thr Ala Lys Thr
85 90 95

Met Pro Asn Glu Glu Gln Asn Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
100 105 110

Leu Arg Ile Gln His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Lys Phe Lys Cys
115 120 125

Lys Val Asn Asn Gln Ala Leu Pro Ala Pro Val Glu Arg Thr Ile Ser
130 135 140

Lys Ala Thr Gly Gln Thr Arg Val Pro Gln Val Tyr Val Leu Ala Pro
145 150 155 160

His Pro Asp Glu Leu Ser Lys Asn Lys Val Ser Val Thr Cys Leu Val
165 170 175

Lys Asp Phe Leu Pro Thr Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Ser Asn Glu
180 185 190

His Pro Glu Pro Glu Gly Lys Tyr Arg Thr Thr Glu Ala Gln Lys Asp
195 200 205

Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Glu Thr Asp
210 215 220

Arg Trp Gln Gln Gly Thr Thr Phe Thr Cys Val Val Met His Glu Ala
225 230 235 240

Leu His Asn His Val Met Gln Lys Asn Val Ser His Ser Pro Gly Lys
245 250 255

<210> 32

<211> 230

<212> BEJOK

<213> Equus caballus

<400> 32

Val Ile Lys Glu Cys Gly Gly Cys Pro Thr Cys Pro Glu Cys Leu Ser
1 5 10 15

Val Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Thr Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Gly
35 40 45

His Asp Phe Pro Asp Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Thr His Thr Ala Thr Thr Glu Pro Lys Gln Glu Gln Asn Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Ile Leu Ala Ile Gln His Lys Asp Trp Leu Ser
85 90 95

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Gln Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Val Gln Lys Thr Ile Ser Lys Pro Thr Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Val Leu Ala Pro His Arg Ala Glu Leu Ser Lys Asn Lys Val
130 135 140

Ser Val Thr Cys Leu Val Lys Asp Phe Tyr Pro Thr Asp Ile Asp Ile
145 150 155 160

Glu Trp Lys Ser Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu Thr Lys Tyr Ser Thr
165 170 175

Thr Pro Ala Gln Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys
180 185 190

Leu Thr Val Glu Thr Asn Arg Trp Gln Gln Gly Thr Thr Phe Thr Cys
195 200 205

Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Glu Lys Ser Val
210 215 220

Ser Lys Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 33

<211> 230

<212> БЕЖОК

<213> Equus caballus

<400> 33

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

Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu
20 25 30

Lys Ile Ser Arg Lys Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Leu Gly
35 40 45

His Asp Asp Pro Asp Val Gln Phe Thr Trp Phe Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Thr His Thr Ala Thr Thr Glu Pro Lys Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Leu Ser
85 90 95

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Ser Val Thr Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Val Glu Arg Thr Thr Ser Lys Ala Lys Gly Gln Leu Arg Val Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Val Leu Ala Pro His Pro Asp Glu Leu Ala Lys Asn Thr Val
130 135 140

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

Glu Trp Gln Ser Asn Glu His Pro Glu Pro Glu Gly Lys Tyr Ser Thr
165 170 175

Thr Pro Ala Gln Leu Asn Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys
180 185 190

Leu Ser Val Glu Thr Ser Arg Trp Lys Gln Gly Glu Ser Phe Thr Cys
195 200 205

Gly Val Met His Glu Ala Val Glu Asn His Tyr Thr Gln Lys Asn Val
210 215 220

Ser His Ser Pro Gly Lys
225 230

<210> 34

<211> 231

<212> БЕЛОК

<213> Equus caballus

<400> 34

Val Ile Lys Glu Pro Cys Cys Cys Pro Lys Cys Pro Asp Ser Lys Phe
 1 5 10 15
 Leu Gly Arg Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Pro Lys Asp Thr
 20 25 30
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 35 40 45
 Ser Gln Glu Asn Pro Asp Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 50 55 60
 Glu Ala His Thr Ala Thr Thr Lys Ala Lys Glu Lys Gln Asp Asn Ser
 65 70 75 80
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Arg
 85 90 95
 Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Arg Ala Leu Pro Ala
 100 105 110
 Pro Val Glu Arg Thr Ile Thr Lys Ala Lys Gly Glu Leu Gln Asp Pro
 115 120 125
 Lys Val Tyr Ile Leu Ala Pro His Arg Glu Glu Val Thr Lys Asn Thr
 130 135 140
 Val Ser Val Thr Cys Leu Val Lys Asp Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asn
 145 150 155 160
 Val Glu Trp Gln Ser Asn Glu Glu Pro Glu Pro Glu Val Lys Tyr Ser
 165 170 175
 Thr Thr Pro Ala Gln Leu Asp Gly Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser
 180 185 190
 Lys Leu Thr Val Glu Thr Asp Arg Trp Glu Gln Gly Glu Ser Phe Thr
 195 200 205
 Cys Val Val Met His Glu Ala Ile Arg His Thr Tyr Arg Gln Lys Ser
 210 215 220
 Ile Thr Asn Phe Pro Gly Lys
 225 230

<210> 35

<211> 235

<212> БЕЛОК

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 35

Glu Ile Lys Thr Cys Gly Gly Gly Ser Lys Pro Pro Thr Cys Pro Pro
1 5 10 15

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
20 25 30

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
35 40 45

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Asp Val Lys Phe Asn
50 55 60

Trp Tyr Val Asn Gly Ala Glu Val His His Ala Gln Thr Lys Pro Arg
65 70 75 80

Glu Thr Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
85 90 95

Thr His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Thr Cys Lys Val Ser
100 105 110

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Gln Lys Thr Ile Ser Lys Asp Lys
115 120 125

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
130 135 140

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Ser Asp Ile Val Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu
165 170 175

Asn Thr Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr
180 185 190

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Arg Gln Gly
195 200 205

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
210 215 220

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230 235

<210> 36

<211> 235

<212> BEJOK

<213> Macaca mulatta

<400> 36

Glu Ile Lys Thr Cys Gly Gly Gly Ser Lys Pro Pro Thr Cys Pro Pro
1 5 10 15

Cys Thr Ser Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
20 25 30

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
35 40 45

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Asp Val Lys Phe Asn
50 55 60

Trp Tyr Val Asn Gly Ala Glu Val His His Ala Gln Thr Lys Pro Arg
65 70 75 80

Glu Thr Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
85 90 95

Thr His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Thr Cys Lys Val Ser
100 105 110

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Gln Lys Thr Ile Ser Lys Asp Lys
115 120 125

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
130 135 140

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
145 150 155 160

Tyr Pro Ser Asp Ile Val Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu
165 170 175

Asn Thr Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr
180 185 190

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
195 200 205

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
210 215 220

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230 235

<210> 37
<211> 228
<212> БЕЖОК
<213> Macaca mulatta

<400> 37

Gly Leu Pro Cys Arg Ser Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Glu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

Gln Glu Glu Pro Asp Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Asn Ala Gln Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Thr His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Thr Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Lys Gln Lys Thr Val Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Pro Arg Lys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Val Val
145 150 155 160

Glu Trp Ala Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Thr Tyr Lys Thr Thr Pro
165 170 175

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Thr Phe Ser Cys Ser Val
195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Pro Gly Lys
225

<210> 38
<211> 232
<212> BEJOK
<213> Macaca mulatta

<400> 38

Glu Phe Thr Pro Pro Cys Gly Asp Thr Thr Pro Pro Cys Pro Pro Cys
1 5 10 15

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
20 25 30

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
35 40 45

Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp
50 55 60

Tyr Val Asp Gly Ala Glu Val His His Ala Gln Thr Lys Pro Arg Glu
65 70 75 80

Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Thr
85 90 95

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Thr Cys Lys Val Ser Asn
100 105 110

Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
115 120 125

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Ile Leu Pro Pro Pro Gln Glu Glu
130 135 140

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
165 170 175

Thr Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe
180 185 190

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
195 200 205

Thr Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
210 215 220

Gln Lys Ser Leu Ser Val Ser Pro
225 230

<210> 39

<211> 230

<212> BEJOK

<213> Sus scrofa

<400> 39

Gly Ile His Gln Pro Gln Thr Cys Pro Ile Cys Pro Gly Cys Glu Val
1 5 10 15

Ala Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Gln Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

Lys Glu His Ala Glu Val Gln Phe Ser Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Thr Ala Glu Thr Arg Pro Lys Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Leu Lys
85 90 95

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Val Asp Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Thr Arg Thr Ile Ser Lys Ala Ile Gly Gln Ser Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Pro Ala Glu Glu Leu Ser Arg Ser Lys Val
130 135 140

Thr Leu Thr Cys Leu Val Ile Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile His Val
145 150 155 160

Glu Trp Lys Ser Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu Asn Thr Tyr Arg Thr
165 170 175

Thr Pro Pro Gln Gln Asp Val Asp Gly Thr Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
180 185 190

Leu Ala Val Asp Lys Ala Arg Trp Asp His Gly Asp Lys Phe Glu Cys
195 200 205

Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile
210 215 220

Ser Lys Thr Gln Gly Lys
225 230

<210> 40

<211> 230

<212> BEJOK

<213> Sus scrofa

<400> 40

Gly Thr Lys Thr Lys Pro Pro Cys Pro Ile Cys Pro Ala Cys Glu Ser
1 5 10 15

Pro Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Gln Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

Gln Glu Asn Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Thr Ala Gln Thr Arg Pro Lys Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Thr Arg Ile Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Thr Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro His Ala Glu Glu Leu Ser Arg Ser Lys Val
130 135 140

Ser Ile Thr Cys Leu Val Ile Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val
145 150 155 160

Glu Trp Gln Arg Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Thr
165 170 175

Thr Pro Pro Gln Gln Asp Val Asp Gly Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys
180 185 190

Phe Ser Val Asp Lys Ala Ser Trp Gln Gly Gly Gly Ile Phe Gln Cys
195 200 205

Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile
210 215 220

Ser Lys Thr Pro Gly Lys
225 230

<210> 41
<211> 230
<212> BEJOK
<213> Sus scrofa

<400> 41
Gly Thr Lys Thr Lys Pro Pro Cys Pro Ile Cys Pro Ala Cys Glu Ser
1 5 10 15

Pro Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Gln Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

Gln Glu Asn Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Thr Ala Gln Thr Arg Pro Lys Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Leu Asn
85 90 95

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Thr Arg Ile Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Thr Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro His Ala Glu Glu Leu Ser Arg Ser Lys Val
130 135 140

Ser Ile Thr Cys Leu Val Ile Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val
145 150 155 160

Glu Trp Gln Arg Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Thr
165 170 175

Thr Pro Pro Gln Gln Asp Val Asp Gly Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys
180 185 190

Phe Ser Val Asp Lys Ala Ser Trp Gln Gly Gly Gly Ile Phe Gln Cys
195 200 205

Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile
210 215 220

Ser Lys Thr Pro Gly Lys
225 230

<210> 42
<211> 230
<212> БЕЛОК
<213> Sus scrofa

<400> 42
Gly Thr Lys Thr Lys Pro Pro Cys Pro Ile Cys Pro Gly Cys Glu Val
1 5 10 15

Ala Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
20 25 30

Met Ile Ser Gln Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
35 40 45

Lys Glu His Ala Glu Val Gln Phe Ser Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
50 55 60

Val His Thr Ala Glu Thr Arg Pro Lys Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Leu Lys
85 90 95

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Val Asp Leu Pro Ala Pro
100 105 110

Ile Thr Arg Thr Ile Ser Lys Ala Ile Gly Gln Ser Arg Glu Pro Gln
115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Pro Ala Glu Glu Leu Ser Arg Ser Lys Val
130 135 140

Thr Val Thr Cys Leu Val Ile Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile His Val
145 150 155 160

Glu Trp Lys Ser Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Thr
165 170 175

Thr Pro Pro Gln Gln Asp Val Asp Gly Thr Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
180 185 190

Leu Ala Val Asp Lys Ala Arg Trp Asp His Gly Glu Thr Phe Glu Cys
 195 200 205

Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile
 210 215 220

Ser Lys Thr Gln Gly Lys
 225 230

<210> 43
 <211> 230
 <212> BEJOK
 <213> Sus scrofa

<400> 43
 Gly Thr Lys Thr Lys Pro Pro Cys Pro Ile Cys Pro Ala Cys Glu Gly
 1 5 10 15

Pro Gly Pro Ser Ala Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 35 40 45

Gln Glu Asn Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 50 55 60

Val His Thr Ala Gln Thr Arg Pro Lys Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
 65 70 75 80

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Leu Asn
 85 90 95

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro
 100 105 110

Ile Thr Arg Ile Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Thr Arg Glu Pro Gln
 115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Pro Thr Glu Glu Leu Ser Arg Ser Lys Val
 130 135 140

Thr Leu Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val
 145 150 155 160

Glu Trp Gln Arg Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Thr
 165 170 175

Thr Pro Pro Gln Gln Asp Val Asp Gly Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys
 180 185 190

Leu Ala Val Asp Lys Ala Ser Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe Gln Cys
195 200 205

Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile
210 215 220

Phe Lys Thr Pro Gly Lys
225 230

<210> 44
<211> 226
<212> BEJOK
<213> Sus scrofa

<400> 44
Gly Arg Pro Cys Pro Ile Cys Pro Ala Cys Glu Gly Pro Gly Pro Ser
1 5 10 15

Ala Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Phe Met Ile Ser Arg
20 25 30

Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asn Pro
35 40 45

Glu Val Gln Phe Ser Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Thr Ala
50 55 60

Gln Thr Arg Pro Lys Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
65 70 75 80

Ser Val Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe
85 90 95

Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Thr Arg Ile
100 105 110

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Thr Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
115 120 125

Pro Pro Pro Thr Glu Glu Leu Ser Arg Ser Lys Leu Ser Val Thr Cys
130 135 140

Leu Ile Thr Gly Phe Tyr Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Gln Arg
145 150 155 160

Asn Gly Gln Pro Glu Pro Glu Gly Asn Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln
165 170 175

Gln Asp Val Asp Gly Thr Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ala Val Asp
180 185 190

Lys Ala Ser Trp Gln Arg Gly Asp Pro Phe Gln Cys Ala Val Met His
195 200 205

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Phe Lys Thr Pro
210 215 220

Gly Asn
225

<210> 45

<211> 5

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 45

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 46

<211> 5

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 46

Gly Gly Asn Gly Thr
1 5

<210> 47

<211> 5

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид

<400> 47

Tyr Gly Asn Gly Thr
1 5

<210> 48

<211> 216

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 48

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Cys Pro Pro Ser Arg Lys Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215

<210> 49

<211> 217

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 49

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Cys Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Asp Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 50

<211> 332

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 50

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Cys Pro Pro Ser Arg Lys Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Arg Asn Gly
210 215 220

Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val
225 230 235 240

Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro
245 250 255

Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe
260 265 270

Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu
275 280 285

Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn
290 295 300

Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr
305 310 315 320

Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
325 330

<210> 51

<211> 351

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 51

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
20 25 30

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
35 40 45

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
50 55 60

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
65 70 75 80

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
85 90 95

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
100 105 110

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
115 120 125

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Cys Pro Pro Ser Arg
130 135 140

Lys Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
165 170 175

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser
180 185 190

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
195 200 205

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
210 215 220

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ala
225 230 235 240

Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu
245 250 255

His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val
260 265 270

Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro
275 280 285

Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu
290 295 300

His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala
305 310 315 320

Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser
325 330 335

Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
340 345 350

<210> 52

<211> 236

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 52

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
20 25 30

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
35 40 45

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
50 55 60

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
65 70 75 80

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
85 90 95

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
100 105 110

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
115 120 125

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Cys Pro Pro Ser Arg
130 135 140

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
165 170 175

Glu Asn Asn Tyr Asp Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
180 185 190

Phe Phe Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
195 200 205

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
210 215 220

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230 235

<210> 53

<211> 216

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 53

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Lys Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215

<210> 54

<211> 217

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 54

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Asp Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 55

<211> 332

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 55

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

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Lys Glu Met
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala Arg Asn Gly
210 215 220

Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu His Thr Val
225 230 235 240

Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro
245 250 255

Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro Ser Gln Phe
260 265 270

Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu His Arg Leu
275 280 285

Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala Ser Tyr Asn
290 295 300

Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser Leu Gln Thr
305 310 315 320

Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
325 330

<210> 56

<211> 351

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 56

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
20 25 30

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
35 40 45

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
50 55 60

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 65 70 75 80

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 85 90 95

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 100 105 110

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 115 120 125

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg
 130 135 140

Lys Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 145 150 155 160

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 165 170 175

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Lys Ser Asp Gly Ser
 180 185 190

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 195 200 205

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 210 215 220

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ala
 225 230 235 240

Arg Asn Gly Asp His Cys Pro Leu Gly Pro Gly Arg Cys Cys Arg Leu
 245 250 255

His Thr Val Arg Ala Ser Leu Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val
 260 265 270

Leu Ser Pro Arg Glu Val Gln Val Thr Met Cys Ile Gly Ala Cys Pro
 275 280 285

Ser Gln Phe Arg Ala Ala Asn Met His Ala Gln Ile Lys Thr Ser Leu
 290 295 300

His Arg Leu Lys Pro Asp Thr Val Pro Ala Pro Cys Cys Val Pro Ala
 305 310 315 320

Ser Tyr Asn Pro Met Val Leu Ile Gln Lys Thr Asp Thr Gly Val Ser
325 330 335

Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys Asp Cys His Cys Ile
340 345 350

<210> 57

<211> 236

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 57

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
20 25 30

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
35 40 45

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
50 55 60

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
65 70 75 80

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
85 90 95

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
100 105 110

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
115 120 125

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg
130 135 140

Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
145 150 155 160

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
165 170 175

Glu Asn Asn Tyr Asp Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
180 185 190

Phe Phe Leu Tyr Ser Asp Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
195 200 205

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
210 215 220

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
225 230 235

<210> 58

<211> 6

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетическая
метка 6xHis

<400> 58

His His His His His His
1 5

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, содержащий Fc-область антитела, указанная Fc-область включает делецию или замену одного или более остатков цистеина в шарнирной области и замену одной или более аминокислот контактной поверхности СН3 на содержащий сульфгидрильную группу остаток.

2. Полипептид по п. 1, отличающийся тем, что в указанная Fc-области отсутствует содержащая цистеин часть шарнирной области.

3. Полипептид по п. 2, отличающийся тем, что в указанной Fc-области отсутствует шарнирная область.

4. Полипептид по п. 1, отличающийся тем, что все цистеины в шарнирной области заменены на другую аминокислоту.

5. Полипептид по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что аминокислота контактной поверхности СН3, замененная на содержащий сульфгидрильную группу остаток, представляет собой Y349, L351, S354, T394 или Y407.

6. Полипептид по п. 5, отличающийся тем, что Y349 заменена на цистеин (Y349C).

7. Полипептид по п. 5, отличающийся тем, что L351 заменена на цистеин (L351C).

8. Полипептид по п. 5, отличающийся тем, что S354 заменена на цистеин (S354C).

9. Полипептид по п. 5, отличающийся тем, что T394 заменена на цистеин (T394C).

10. Полипептид по п. 5, отличающийся тем, что Y407 заменена на цистеин (Y407C).

11. Полипептид по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что указанная Fc-область содержит область СН2, включающую одну или более замен аминокислот.

12. Полипептид по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что указанная область СН3 дополнительно включает одну или более дополнительных замен аминокислот.

13. Полипептид по любому из пп. 1-12, отличающийся тем, что одна или более аминокислот на С-конце указанной Fc-области удалены.

14. Полипептид по п. 13, отличающийся тем, что удалено три, две или одна аминокислота на С-конце указанной Fc-области.

15. Полипептид по п. 14, отличающийся тем, что удалена концевая аминокислота на С-конце указанной Fc-области.

16. Полипептид по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит тяжелую цепь антитела.

17. Полипептид по любому из пп. 1-15, отличающийся тем, что указанный полипептид содержит гибридный Fc-белок.

18. Нуклеиновая кислота, кодирующая полипептид по любому из пп. 1-17.

19. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 18, функционально связанную с промотором.

20. Клетка-хозяин, содержащая экспрессионный вектор по п. 19.

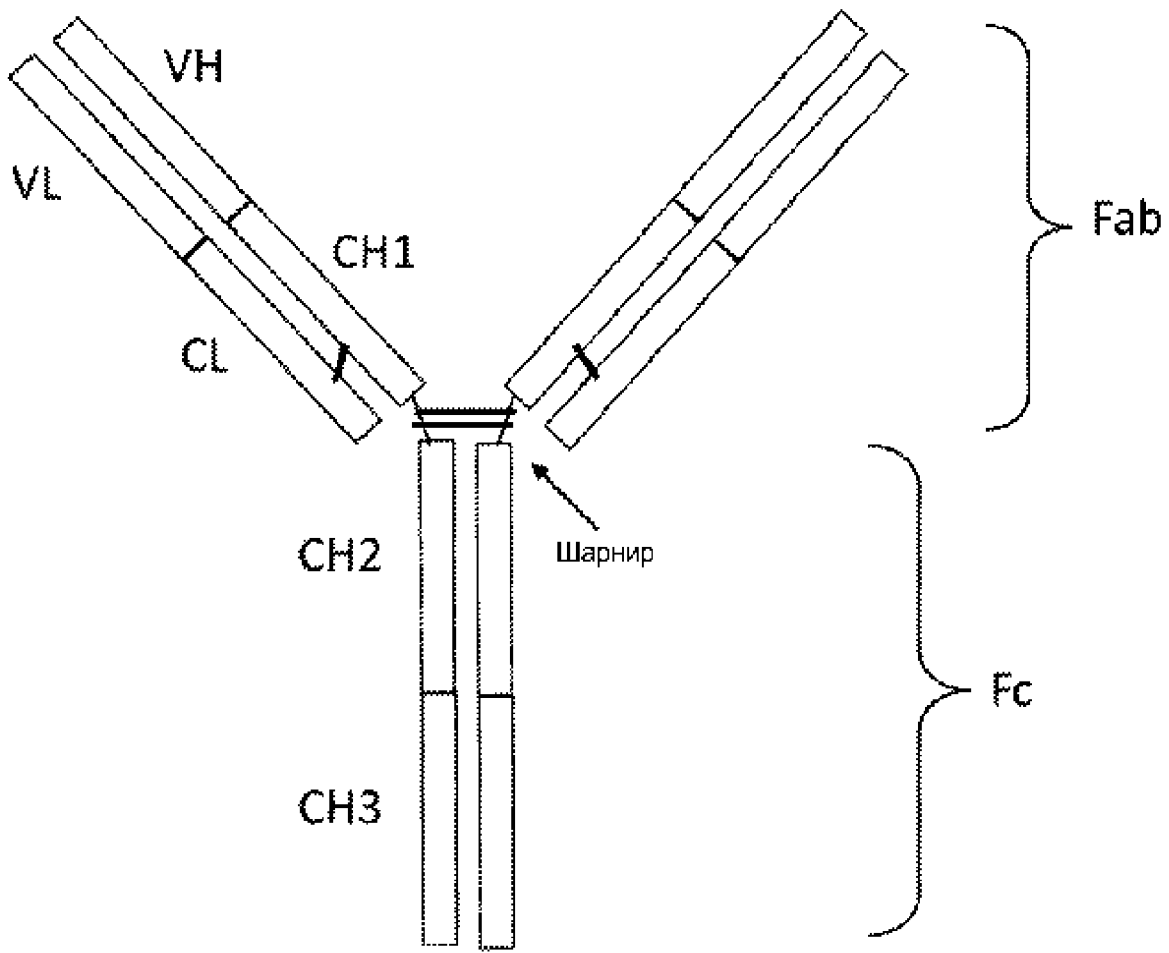
21. Способ получения полипептида, включающий

а) культивирование клетки-хозяина по п. 20 в условиях, при которых указанный промотор активен в указанной клетке-хозяине; и

б) выделение указанного полипептида из культуры.

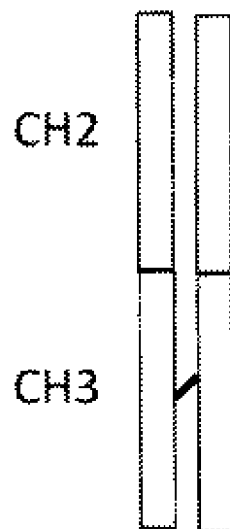
22. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид по любому из пп. 1-17.

По доверенности

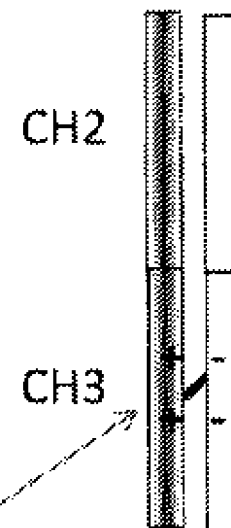


Фиг. 1

(a)

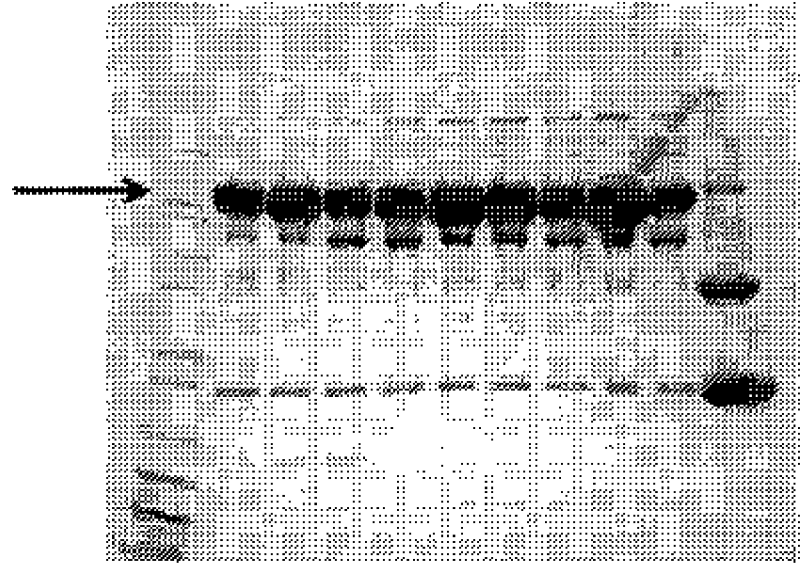


(b)

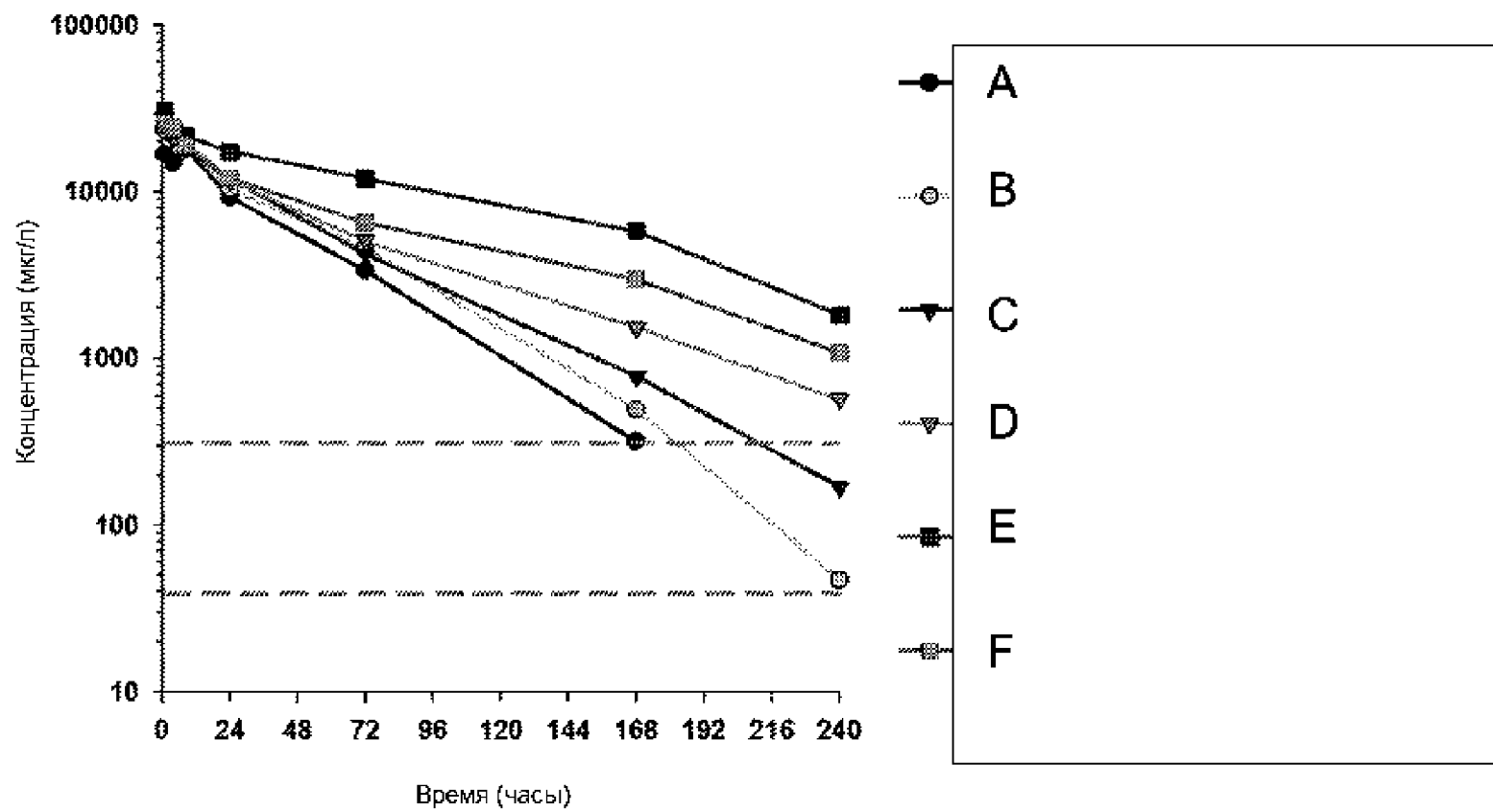


Введенная дисульфидная
связь на контактной
поверхности CH₃

Фиг. 2



ФИГ. 3



Фиг. 4