

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201791773** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2018.02.28

(51) Int. Cl. *C12N 9/54* (2006.01)
A61K 38/48 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2016.02.12

(54) ЦИСТЕИНОВАЯ ПРОТЕАЗА

(31) 1502306.2

(32) 2015.02.12

(33) GB

(86) PCT/EP2016/053052

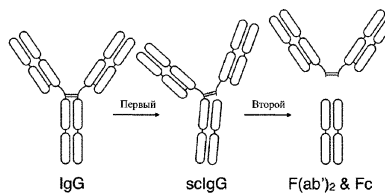
(87) WO 2016/128558 2016.08.18

(71) Заявитель:
ХАНСА МЕДИКАЛ АБ (SE)

(72) Изобретатель:
Челльман Кристиан, Ярнум София,
Нордаль Эмма (SE)

(74) Представитель:
Осипов К.В., Ильмер Е.Г., Пантелеев
А.С., Хмара М.В., Дошечкина В.В.,
Новоселова С.В., Липатова И.И. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к новому полипептиду, который проявляет активность цистеиновой протеазы в отношении IgG, и к его применению и его Применение полипептида включает способы профилактики или лечения заболеваний и состояний, опосредуемых IgG, и способы анализа IgG.



201791773

A1

A1

201791773

ЦИСТЕИНОВАЯ ПРОТЕАЗА

Область техники

Настоящее изобретение относится к новому полипептиду, который обладает активностью цистеиновой протеазы по отношению к IgG, и к его применению *in vivo* и *ex vivo*. Применение этого полипептида включает способы профилактики или лечения заболеваний и состояний, опосредуемых IgG, и способы анализа IgG.

Предшествующий уровень техники

IdeS (от англ. Immunoglobulin G-degrading enzyme of *S. pyogenes*, рус.: фермент *S. pyogenes*, разрушающий иммуноглобулин G) представляет собой внеклеточную цистеиновую протеазу, вырабатываемую человеческим патогенным микроорганизмом *S. pyogenes*. Первоначально IdeS была выделена из штамма группы A *Streptococcus* серотипа M1, но к настоящему моменту ген *ides* был идентифицирован во всех проанализированных штаммах группы A *Streptococcus*. IdeS имеет чрезвычайно высокую степень субстратной специфичности, поскольку единственным ее идентифицированным субстратом является IgG. IdeS катализирует единственное протеолитическое расщепление в нижней шарнирной области тяжелых цепей всех подклассов человеческого IgG. IdeS также катализирует эквивалентное расщепление тяжелых цепей некоторых подклассов IgG различных животных. IdeS эффективно расщепляет IgG до фрагментов Fc и F(ab')₂ в соответствии с двухстадийным механизмом. На первой стадии происходит расщепление одной (первой) тяжелой цепи IgG с образованием одной расщепленной молекулы IgG (sclgG) и нековалентно связанной молекулы Fc. Молекула sclgG по существу представляет собой промежуточный продукт, который сохраняет оставшуюся (вторую) тяжелую цепь первоначальной молекулы IgG. На второй стадии процесса вторая тяжелая цепь расщепляется под действием IdeS, высвобождая фрагмент F(ab')₂ и гомодимерный фрагмент Fc. Они представляют собой продукты, обычно обнаруживаемые при протекании процессов в физиологических условиях. В восстановительной среде фрагмент F(ab')₂ может диссоциировать на два фрагмента Fab, и гомодимерный Fc может диссоциировать на составляющие мономеры.

Сущность изобретения

Было показано, что способность IdeS расщеплять IgG имеет применение *ex vivo*, например, в способах получения фрагментов Fab и Fc, которые могут быть применены для анализа IgG. См., например, WO2003051914 и WO2009033670.

5 Также было показано, что IdeS может быть применена *in vivo* в качестве терапевтического средства, поскольку она способна расщеплять *in vivo* молекулы IgG, которые являются медиаторами заболевания, или их присутствие нежелательно по другим причинам. См., например, WO2003051914, WO2006131347 и WO2013110946. IdeS может быть применена при лечении любого заболевания или

10 состояния, которое полностью или частично опосредуется IgG. IgG полностью или частично является медиатором при множестве аутоиммунных заболеваний, например, при остром отторжении органов донора.

Тем не менее, IdeS представляет собой иммуногенный белок. Таким образом, если IdeS применяют в качестве терапевтического средства, то иммунная

15 система субъекта, получающего IdeS, часто отвечает на его воздействие. Реакция иммунной системы на IdeS обычно включает выработку антител, специфических для IdeS. В настоящем описании эти антитела могут быть названы “антителами к лекарственному препарату” (сокращенно “ADA” от англ. “anti-drug antibody” -

20 противовещательные антитела), специфическими для IdeS или “IdeS-специфическими ADA”. Ответная реакция иммунной системы на IdeS в общем и выработка IdeS-специфических ADA в частности могут приводить к проблемам двух родственных типов. Во-первых, может быть снижена эффективность действия IdeS, например, из-за связывания ADA, что может приводить к необходимости введения

25 более высоких или повторных дозировок для достижения того же эффекта. ADA, оказывающее такое действие, может быть названо “нейтрализующим ADA”. Во-вторых, могут возникнуть нежелательные или даже опасные осложнения, такие как гипервоспалительная реакция, вызываемая иммунными комплексами ADA и IdeS. Чем выше количество ADA, специфических для IdeS конкретного субъекта, тем выше вероятность возникновения таких проблем. Присутствие и количество IdeS-

30 специфических молекул ADA в организме пациента может быть определено любым подходящим способом, таким как специфический для конкретного средства флуоресцентный иммуноферментный анализ CAP FEIA (ImmunoCAP) или анализ с определением титров, проведенный на образце сыворотки крови пациента. Если количество IdeS-специфических молекул ADA в организме пациента превышает

35 пороговое значение, определяемое лечащим врачом, то введение IdeS может стать

нецелесообразным или это может указывать на необходимость введения более высокой дозировки IdeS. Такое повышение дозировки может, в свою очередь, привести к повышению количества IdeS-специфических молекул ADA в организме пациента, что делает дальнейшее введение IdeS нецелесообразным.

5 IdeS представляет собой фактор вирулентности *S. pyogenes*, который является возбудителем таких обычных инфекций, как тонзиллит и стрептококковое воспаление горла. Соответственно, большинство людей-пациентов уже сталкивались с IdeS в этом качестве, и, вероятно, в кровяном русле таких субъектов уже имеются антитела к IdeS. Обнаружение IdeS-специфических ADA в образцах
10 сыворотки крови выбранных случайным образом людей (имеющих их в результате перенесенных ранее стрептококковых инфекций) является обычным явлением, также как и их обнаружение в препаратах IVIg (от англ. Intravenous Immunoglobulin, что означает “внутривенный иммуноглобулин”), которые являются препаратами IgG, извлеченными из объединенной сыворотки крови тысяч доноров. Даже если субъект
15 не имеет IdeS-специфических ADA до первоначального введения IdeS, имеется вероятность того, что такие молекулы будут вырабатываться впоследствии. Таким образом, у любого конкретного субъекта проблемы, связанные с иммуногенностью IdeS с большой вероятностью будут препятствовать терапевтическому применению IdeS. Эти проблемы могут приводить к повышению дозы IdeS и/или полностью
20 препятствовать лечению IdeS, в особенности, если требуется многократное введение. Имеющиеся способы устранения этих проблем включают, например, модификацию лекарственного средства полиэтиленгликолем (ПЭГ) для снижения иммуногенности или введение терапевтического средства совместно с иммуннодепрессантом.

25 Авторы настоящего изобретения разработали совершенно новый подход. Авторы изобретения идентифицировали специфические положения в последовательности IdeS, при модификации которых согласно настоящему изобретению образуются новые полипептиды, в которых снижены проблемы, связанные с иммуногенностью, по сравнению с IdeS. Некоторые модификации могут
30 иметь повышенную эффективность расщепления IgG полипептидом согласно изобретению по сравнению с IdeS, что косвенным образом снижает иммуногенность за счет использования более низкой дозировки или концентрации для достижения того же эффекта. В альтернативном варианте или кроме того, другие модификации могут непосредственно снижать иммуногенность по сравнению с IdeS за счет

снижения способности IdeS-специфических антител распознавать полипептид согласно изобретению.

Полная последовательность IdeS имеется в открытом доступе в виде эталонной последовательности NCBI Reference Sequence No. WP_010922160.1 и в
 5 настоящем описании обозначена как SEQ ID NO: 1. Эта последовательность включает N-терминальный метионин, за которым следует сигнальная последовательность секреции из 28 аминокислот. N-терминальный метионин и сигнальную последовательность (всего 29 аминокислот на N-конце) обычно удаляют для образования зрелого белка IdeS, последовательность которого имеется в
 10 открытом доступе в Genbank, номер доступа ADF13949.1, и в настоящем описании обозначена как SEQ ID NO: 2.

Если не указано иное, то все упоминания нумерации положений аминокислот в полипептидах, рассматриваемых в настоящем описании, указаны на основании нумерации соответствующих положений в SEQ ID NO: 1, начиная с N-конца. Таким
 15 образом, поскольку SEQ ID NO: 2 не имеет N-терминального метионина и сигнальной последовательности из 28 аминокислот, имеющих в SEQ ID NO: 1, остаток аспарагиновой кислоты (D) на N-конце SEQ ID NO: 2 обозначен как положение 30, поскольку это положение соответствует положению в SEQ ID NO: 1. Согласно такой схеме нумерации, наиболее критичным для эффективности
 20 воздействия цистеиновой протеазы на IgG (далее называемой “активностью IgG-цистеиновой протеазы”) остатком в IdeS является цистеин (C) в положении 94 (65-ый остаток от N-конца SEQ ID NO: 2). Другими остатками, которые по всей вероятности будут важны для активности IgG-цистеиновой протеазы, являются лизин (K) в положении 84, гистидин (H) в положении 262 и аспарагиновая кислота
 25 (D) в каждом из положений 284 и 286. Эти остатки занимают 55-ое, 233-е, 255ое и 257-ое положения от N-конца в SEQ ID NO: 2, соответственно.

Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением, предложен полипептид, обладающий активностью цистеиновой протеазы в отношении IgG и включающий вариант последовательности SEQ ID NO:2, причем этот вариант:

30 (a) по меньшей мере на 50% идентичен SEQ ID NO: 2;

(b) имеет цистеин (C) в том положении указанного варианта последовательности, которое соответствует положению 94 в SEQ ID NO: 1; и необязательно

(с) имеет в тех положениях указанного варианта последовательности, которые соответствуют положениям 84, 262, 284 и 286 в SEQ ID NO: 1, лизин (K), гистидин (H), аспарагиновую кислоту (D) и аспарагиновую кислоту (D), соответственно;

- 5 и при этом указанный полипептид более эффективно расщепляет IgG, чем IdeS, и/или обладает меньшей иммуногенностью, чем IdeS. Полипептид согласно изобретению может более эффективно расщеплять IgG1, чем IgG2.

Предпочтительно указанный вариант SEQ ID NO: 2:

- 10 (1) имеет положительно заряженную аминокислоту в том положении варианта, которое соответствует положению 130 в SEQ ID NO: 1, и положительно заряженная аминокислота необязательно представляет собой аргинин (R) или лизин (K); и/или

- 15 (2) имеет положительно заряженную аминокислоту в том положении варианта, которое соответствует положению 131 в SEQ ID NO: 1, и положительно заряженная аминокислота необязательно представляет собой аргинин (R) или лизин (K); и/или

(3) не включает непрерывной последовательности NQTN; и/или

(4) не включает непрерывной последовательности DSFSANQEIR YSEVTPYHVT.

- 20 Изобретение также относится к полинуклеотиду, экспрессионному вектору или клетке-хозяину, кодирующим или экспрессирующим полипептид согласно изобретению.

- 25 Изобретение также относится к способу лечения или профилактики у субъекта заболевания или состояния, медиаторами которого являются антитела к IgG, где способ включает введение субъекту терапевтически или профилактически эффективного количества полипептида согласно изобретению. Обычно способ может включать многократное введение полипептида субъекту.

- 30 Изобретение также относится к способу обработки ex vivo крови, взятой у пациента, причем пациент имеет заболевание или состояние, медиаторами которого являются IgG антитела, где способ включает контакт крови с полипептидом согласно изобретению.

Изобретение также относится к способу усиления у субъекта полезного эффекта от терапии или терапевтического средства, где способ включает (а) введение субъекту полипептида согласно изобретению; и (b) последующее проведение соответствующей терапии или введение субъекту соответствующего терапевтического средства, и при этом:

- терапия представляет собой трансплантацию органа, или терапевтическое средство представляет собой антитело, генную терапию, такую как вирусный вектор, замещение дефектного эндогенного фактора, такого как фермент, фактор роста или фактор свертывания крови, или клеточную терапию;

- вводимое количество полипептида достаточно для расщепления по существу всех молекул IgG, присутствующих в плазме крови субъекта; и

- этапы (a) и (b) разделены промежутком времени, который достаточен для расщепления по существу всех молекул IgG, присутствующих в плазме крови субъекта.

Изобретение также относится к способу генерации таких фрагментов IgG, как Fc, Fab или F(ab')₂, который включает контакт IgG с полипептидом согласно изобретению, предпочтительно *ex vivo*.

Изобретение также относится к наборам для осуществления способов согласно изобретению.

Краткое описание графических материалов

На Фиг. 1 представлены результаты репрезентативного анализа определения активности (эффективности расщепления ими IgG) полипептидов согласно изобретению по сравнению с контрольными веществами.

На Фиг. 2 представлены результаты репрезентативного SDS-PAGE анализа в геле, который применяли для визуализации продуктов расщепления, получаемых при инкубации IgG1 с полипептидами согласно изобретению или с контрольными веществами.

На Фиг. 3 представлены результаты репрезентативного SDS-PAGE анализа в геле, который применяли для визуализации продуктов расщепления, получаемых

при инкубации IgG1 с дополнительными полипептидами согласно изобретению или с контрольными веществами.

На Фиг. 4 представлены результаты репрезентативного SDS-PAGE анализа в геле, который применяли для визуализации продуктов расщепления, получаемых при инкубации IgG2 с полипептидами согласно изобретению или с контрольными веществами.

На Фиг. 5 и Фиг. 6 представлены результаты репрезентативных конкурентных анализов, применяемых для определения уровня распознавания полипептидов согласно изобретению IdeS-специфическими антителами в сравнении с контрольными веществами.

На Фиг. 7 представлены репрезентативные кривые титрования при расщеплении IgG1 различными полипептидами IgG-цистеиновой протеазы.

На Фиг. 8 представлены репрезентативные кривые титрования при расщеплении IgG2 различными полипептидами IgG-цистеиновой протеазы.

На Фиг. 9 представлены результаты репрезентативного анализа SDS-PAGE, который применяли для визуализации продуктов расщепления, получаемых при инкубации IgG с полипептидами согласно изобретению или с контрольными веществами.

На Фиг. 10 представлены результаты репрезентативного анализа SDS-PAGE, который применяли для визуализации продуктов расщепления, получаемых при инкубации IgG с полипептидами согласно изобретению или с контрольными веществами.

На Фиг. 11 представлены результаты репрезентативного анализа SDS-PAGE, который применяли для визуализации продуктов расщепления, получаемых при инкубации IVIg с полипептидами согласно изобретению или с контрольными веществами.

На Фиг. 12 представлены результаты репрезентативного анализа SDS-PAGE, который применяли для визуализации продуктов расщепления, получаемых при инкубации IVIg с полипептидами согласно изобретению или с контрольными веществами.

На Фиг. 13 схематично представлено расщепление иммуноглобулинов полипептидами согласно изобретению.

На Фиг. 14 представлены результаты репрезентативного анализа % конкуренции за центры связывания ADA между полипептидами согласно изобретению и контрольными веществами.

На Фиг. 15 представлены результаты другого репрезентативного анализа % конкуренции за центры связывания ADA между полипептидами согласно изобретению и контрольными веществами.

На Фиг. 16 представлены репрезентативные результаты анализа эффективности ELISA, применяемого для определения эффективности расщепления IgG человека под действием полипептидов согласно изобретению *in vivo*.

На Фиг. 17 представлены результаты репрезентативного анализа SDS-PAGE, который применяли для визуализации продуктов расщепления IgG, получаемых *in vivo* под действием полипептидов согласно изобретению.

Краткое описание последовательностей

SEQ ID NO: 1 представляет собой полную последовательность IdeS, включающую N-терминальный метионин и сигнальную последовательность. Она представлена в виде эталонной последовательности NCBI Reference Sequence No. WP_010922160.1.

SEQ ID NO: 2 представляет собой зрелую последовательность IdeS, в которой отсутствуют N-терминальный метионин и сигнальная последовательность. Она также представлена в Genbank, номер доступа ADF13949.1.

SEQ ID NO: 3-16 представляют собой последовательности примеров полипептидов согласно изобретению.

SEQ ID NO: 17 представляет собой последовательность полипептида IdeS, применяемую согласно настоящему изобретению в качестве контрольной. Включает последовательность SEQ ID NO: 2, содержащую дополнительный N-терминальный метионин и гистидиновую метку (внутренняя ссылка pCART124).

SEQ ID NO: 18 представляет собой непрерывную последовательность NQTN, которая соответствует положениям 336-339 SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 19 представляет собой непрерывную последовательность DSFSANQEIR YSEVTPYHVT, которая соответствует положениям 30-49 SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 20-34 представляют собой нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептиды, рассматриваем в настоящем описании.

SEQ ID NO: 35 представляет собой последовательность SFSANQEIRY SEVTPYHVT, которая соответствует положениям 31-49 SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 36 представляет собой последовательность DYQRNATEAY AKEVPHQIT, которая соответствует положениям 36-54 полипептида IdeZ в Эталонной Последовательности NCBI No. WP_014622780.1.

SEQ ID NO: 37 представляет собой последовательность DDYQRNATEA YAKEVPHQIT, которая может присутствовать на N-конце полипептида согласно изобретению.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Следует понимать, что различные применения рассмотренных продуктов и способов могут быть адаптированы к конкретным нуждам, имеющимся в данной области техники. Также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем описании, предназначена только для раскрытия конкретных примеров осуществления изобретения и не является ограничивающей.

Кроме того, упоминаемые в настоящем описании и прилагаемых пунктах формулы изобретения формы единственного числа включают множественное число, если из контекста не следует иное. Таким образом, например, термин “полипептид” включает “полипептиды”, и это верно также и для других терминов.

Употребляемый в настоящем описании термин “полипептид” имеет самое широкое из присущих ему значений и означает соединение, состоящее из двух или более составляющих аминокислот, аналогов аминокислот или других пептидомиметиков. Таким образом, термин “полипептид” включает короткие пептидные последовательности, а также полипептиды и белки большей длины.

Употребляемый в настоящем описании термин “аминокислота” относится к встречающимся в природе и/или не встречающимся в природе или синтетическим аминокислотам, включающим оптические изомеры D или L, к аналогам аминокислот и к пептидомиметикам.

- 5 Термины “пациент” и “субъект” используются взаимозаменяемо и обычно относятся к человеку. Упоминание IgG, если не указано иное, обычно относится к IgG человека.

- 10 Все публикации, патенты и патентные заявки, цитируемые в настоящем описании выше или далее, полностью включены в настоящее описание посредством ссылок.

Функциональные признаки полипептида

- Настоящее изобретение относится к новому полипептиду, обладающему активностью цистеиновой протеазы в отношении IgG (т.е. активностью IgG-цистеиновой протеазы), и при этом указанный полипептид более эффективно
- 15 расщепляет IgG, чем IdeS, и/или обладает меньшей иммуногенностью, чем IdeS. При рассмотрении контроля или сравнения с полипептидом согласно изобретению, “IdeS” означает полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. В альтернативном варианте или дополнительно “IdeS”, если его применяют в качестве вещества для контроля или сравнения, может означать
- 20 полипептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, содержащую дополнительный остаток метионина (M) на N-конце и/или метку на C-конце, которые способствуют экспрессии в стандартных бактериальных экспрессирующих системах и выделению из таких систем. Подходящие метки включают гистидиновую метку, которая может быть непосредственно присоединена
- 25 к C-концу полипептида или присоединена опосредованно через любую подходящую линкерную последовательность, такую как 3, 4 или 5 остатков глицина. Гистидиновая метка обычно состоит из шести гистидиновых остатков, хотя ее длина может быть больше, обычно до 7, 8, 9, 10 или 20 аминокислот, или меньше, например, составлять 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислоту. Последовательность примера
- 30 IdeS полипептида, применяемого согласно изобретению в качестве контрольного, приведена под обозначением SEQ ID NO: 14. Этот полипептид включает последовательность SEQ ID NO: 2, а также дополнительный N-терминальный метионин и гистидиновую метку, и в настоящем описании может быть обозначен как pCART124.

Активность IgG-цистеиновой протеазы может быть оценена с помощью любого подходящего способа, например, инкубацией полипептида с образцом, содержащим IgG, и определением наличия продуктов расщепления IgG. Эффективность может быть оценена в присутствии или отсутствии ингибитора, такого как нейтрализующее антитело. Однако, согласно настоящему изобретению, если не указано иное, эффективность обычно означает эффективность, определяемую в отсутствии такого ингибитора. Подходящие способы рассмотрены в Примерах. В настоящем описании эффективность расщепления IgG полипептидом может быть названа "активностью" полипептида. Активность полипептида согласно изобретению обычно по меньшей мере в 1,5 раза, 2,0 раза, 2,5 раза, 3,0 раза, 4,0 раза, 4,5 раза, 5,0 раз, 6,0 раз, 7,0 раз или 7,5 раз превышает активность IdeS, определяемую с помощью того же анализа. Активность полипептида согласно изобретению предпочтительно по меньшей мере в 4,5 раза, более предпочтительно по меньшей мере в 6,0 раз и наиболее предпочтительно по меньшей мере в 7,5 раз превышает активность IdeS, определяемую с помощью того же анализа. Повышенная активность по сравнению с IdeS представляет собой желательное улучшение независимо от проблем, связанных с иммуногенностью IdeS. Однако, такая повышенная активность обычно также позволяет применять пониженные дозировки полипептида согласно изобретению для достижения того же терапевтического эффекта, который достигается при использовании более высоких доз IdeS. Пониженная дозировка также может сделать доступным введение полипептида согласно изобретению большее количество раз, чем IdeS. Это происходит из-за того, что применение пониженной дозировки нивелирует проблемы, связанные с иммуногенностью терапевтического средства, поскольку снижается вероятность возникновения ответной реакции иммунной системы или снижается интенсивность этой реакции на средство, присутствующее в меньшей концентрации. Таким образом, полипептид согласно изобретению может обладать той же или даже большей иммуногенностью, что и IdeS в эквивалентной дозировке, но проблемы, связанные с его иммуногенностью, уменьшены или устранены, поскольку для достижения того же самого терапевтического эффекта требуется пониженная дозировка. В альтернативном примере осуществления полипептид согласно изобретению может обладать активностью, эквивалентной активности IdeS, при условии, что он имеет меньшую иммуногенность, чем IdeS, при нахождении в эквивалентной дозировке.

- Анализы для определения эффективности полипептида в процессе расщепления IgG, то есть анализы для определения активности полипептида, хорошо известны в данной области техники, и для этой цели может быть применен любой подходящий анализ. Подходящие анализы включают анализ на основе
- 5 ELISA, например, анализ, рассмотренный в Примерах. В таком анализе на лунки аналитического планшета обычно наносят мишень для антитела, такую как альбумин бычьей сыворотки (англ. bovine serum albumin, сокращенно BSA). Затем в лунки добавляют образцы испытуемого полипептида, и затем – образцы мишень-специфического антитела, которое в этом примере специфично для BSA.
- 10 Полипептид и антитело оставляют взаимодействовать в условиях, подходящих для воздействия цистеиновой протеазы на IgG. Спустя подходящий промежуток времени, аналитический планшет промывают и добавляют идентифицирующее антитело, которое специфично связывается с мишень-специфическим антителом в условиях, подходящих для связывания с мишень-специфическим антителом.
- 15 Идентифицирующее антитело будет связываться с любым интактным мишень-специфическим антителом, которое лунке связано с мишенью в каждой. После промывки количество идентифицирующих антител, находящихся в лунке, будет пропорционально количеству мишень-специфических антител, закрепленных в этой лунке. Идентифицирующее антитело может быть непосредственно или
- 20 опосредованно сопряжено с маркером (англ. label) или другой репортерной системой (такой как фермент), таким образом, что может быть определено количество идентифицирующих антител, остающихся в каждой лунке. Чем выше активность испытуемого полипептида, находящегося в лунке, тем меньше остается интактных мишень-специфических антител и, следовательно, меньше остается
- 25 идентифицирующих антител. Обычно в по меньшей мере одну лунку данного аналитического планшета вместо испытуемого полипептида добавляют IdeS для непосредственного сравнения активности испытуемых полипептидов с активностью IdeS. Полипептид согласно изобретению может более эффективно расщеплять IgG1, чем IgG2.
- 30 Активность испытуемого полипептида может быть определена с помощью других анализов непосредственной визуализацией и/или количественным определением фрагментов IgG, образующихся при расщеплении IgG под действием испытуемого полипептида. Анализ такого типа также рассмотрен в Примерах. Анализ обычно включает инкубацию образца IgG с испытуемым полипептидом (или
- 35 с IdeS в качестве контрольного образца) в различных концентрациях и серийное

титрование. Затем продукты, получаемые при инкубации при каждой концентрации, разделяют гель-электрофорезом, например, способом SDS-PAGE. Целые молекулы IgG и фрагменты, получаемые при расщеплении IgG, затем могут быть идентифицированы по размеру и количественно оценены по интенсивности окрашивания подходящим красителем. Чем больше количество полученных при расщеплении фрагментов, тем выше активность испытуемого полипептида в заданной концентрации. Воздействие полипептида согласно изобретению в более низких концентрациях, чем IdeS (при более низких значениях в серии титрования), обычно приводит к образованию обнаруживаемого количества фрагментов, получаемых при расщеплении. Этот анализ также позволяет идентифицировать испытуемые полипептиды, более эффективно расщепляющие первую или вторую тяжелую цепь молекулы IgG, поскольку также можно определить количества различных фрагментов, получаемых при каждом расщеплении. Этот анализ также может быть адаптирован для определения степени снижения активности полипептида согласно изобретению в присутствии IdeS-специфических ADA. При проведении адаптированного анализа, при инкубации образца IgG с испытуемым полипептидом (или с IdeS в качестве контрольного образца), в сыворотку крови или препарат IVlg, содержащий IdeS-специфические ADA, включают реакционную среду. Предпочтительно, на активность полипептида согласно изобретению не влияет присутствие ADA, или в присутствии ADA его активность снижается в меньшей степени, чем активность IdeS в том же анализе. Другими словами, предпочтительно нейтрализующее влияние IdeS-специфических ADA на полипептид согласно изобретению меньше или эквивалентно нейтрализующему влиянию IdeS-специфических ADA на IdeS в том же анализе.

Как было указано выше, полипептид согласно изобретению может обладать той же или даже более высокой иммуногенностью, что и IdeS в эквивалентной дозировке, поскольку проблемы, связанные с иммуногенностью снижены или устранены за счет понижения дозировки полипептида согласно изобретению, требуемой для достижения эквивалентного терапевтического эффекта. Однако обычно полипептид согласно изобретению обладает не большей иммуногенностью, чем IdeS, и предпочтительно обладает меньшей иммуногенностью, чем IdeS. Таким образом, полипептид согласно изобретению, находясь в эквивалентной дозировке или концентрации, может вызывать такую же ответную иммунную реакцию, как и IdeS, или предпочтительно еще более низкую ответную иммунную реакцию, которую определяют с помощью одного и того же анализа. Иммуногенность полипептида

согласно изобретению обычно составляет не более 90%, не более 85%, не более 80%, не более 70%, не более 60%, или не более 50% от иммуногенности IdeS, определяемой с помощью того же анализа. Предпочтительно иммуногенность полипептида согласно изобретению составляет не более 85% от иммуногенности IdeS, определяемой с помощью того же анализа. Более предпочтительно иммуногенность полипептида согласно изобретению составляет не более 70% от иммуногенности IdeS, определяемой с помощью того же анализа.

Анализы для определения иммуногенности полипептида известны в данной области техники, и может быть применен любой подходящий анализ. Предпочтительные анализы для определения иммуногенности полипептида в сравнении с иммуногенностью IdeS включают определение степени связывания ADA, специфических для IdeS, с полипептидом согласно изобретению. Анализы такого типа рассмотрены в Примерах.

Один из таких анализов включает исследование конкуренции между IdeS и испытуемым полипептидом за связывание с IdeS-специфическими ADA. Обычно в лунки аналитического планшета наносят IdeS и затем вводят предварительно инкубированную смесь раствора, содержащего IdeS-специфические ADA, например, препарат IVIg, и испытуемый полипептид (или IdeS в качестве контрольного образца). Предварительную инкубацию проводят в присутствии ингибитора активности IgG-цистеиновой протеазы, например, йодуксусной кислоты (IHAc), и при высокой концентрации соли, что позволяет достичь высокого сродства к связыванию между белком и ADA. Предварительно инкубированную смесь оставляют взаимодействовать в лунках с покрытием из IdeS. Любое IdeS-специфическое ADA, не связанное с испытуемым полипептидом, будет связываться с находящимся в лунках IdeS. Спустя подходящий период времени, аналитический планшет промывают и добавляют идентифицирующее антитело, которое специфично связывается с IgG в условиях, подходящих для связывания. Идентифицирующее антитело связывается с любым ADA, которое связано с находящимся в каждой лунке IdeS. После промывки, количество находящегося в лунке идентифицирующего антитела будет обратно пропорционально количеству ADA, которое было связано с испытуемым полипептидом. Идентифицирующее антитело может быть непосредственно или опосредованно сопряжено с маркером или другой репортерной системой (такой как фермент), что позволяет определять количество идентифицирующего антитела, остающегося в каждой лунке. Обычно в по меньшей мере одну лунку данного аналитического планшета вместо испытуемого

полипептида добавляют предварительно инкубированную смесь IVIg и IdeS для проведения непосредственного сравнения между связыванием ADA с испытуемыми полипептидами и связыванием с IdeS.

Другой подходящий анализ включает определение степени связывания серии титрования различных концентраций IdeS-специфических ADA, например, препарата IVIg, с испытуемым полипептидом в сравнении с IdeS. Предпочтительно для того, чтобы связывание полипептида согласно изобретению было обнаруживаемым, требуется более высокая концентрация ADA, чем концентрация ADA, при которой обнаруживаемым является связывание с IdeS. Такой анализ рассмотрен в Примерах. Этот анализ обычно включает нанесение на лунки аналитического планшета испытуемого полипептида или IdeS и последующую инкубацию каждой лунки с различными концентрациями IdeS-специфических ADA из серии титрования. Инкубацию проводят в присутствии ингибитора активности IgG-цистеиновой протеазы, например, йодуксусной кислоты (IHAc), и при высокой концентрации соли, что позволяет достичь высокого сродства к связыванию между белком и ADA. Спустя подходящий период времени, аналитический планшет промывают и добавляют идентифицирующее антитело, которое специфично связывается с IgG F(ab')₂ в условиях, подходящих для связывания. Идентифицирующее антитело связывается с любым ADA, которое связано с находящимся в каждой лунке испытуемым полипептидом или IdeS. После промывки количество находящегося в лунке идентифицирующего антитела будет прямо пропорционально количеству ADA, которое было связано с испытуемым полипептидом или IdeS. Идентифицирующее антитело может быть непосредственно или опосредованно сопряжено с маркером или другой репортерной системой (такой как фермент), что позволяет определять количество идентифицирующего антитела, остающегося в каждой лунке. По меньшей мере одну лунку данного аналитического планшета инкубируют с буфером, не содержащим ADA, то есть проводят холостой опыт для оценки порогового значения для определения связывания аналитических лунках.

30 Структурные признаки полипептида

В настоящем разделе представлены структурные признаки полипептида согласно изобретению, которыми он обладает дополнительно к функциональным признакам, рассмотренным в предыдущем разделе.

Длина полипептида согласно изобретению обычно составляет по меньшей мере 100, 150, 200, 250, 260, 270, 280, 290 или 300 аминокислот. Полипептид согласно изобретению обычно содержит не более 400, 350, 340, 330, 320 или 310 аминокислот. Следует понимать, что для получения длины полипептида согласно изобретению любой из указанных выше нижних пределов может быть скомбинирован с любым из указанных выше верхних пределов. Например, длина полипептида может составлять от 100 до 400 аминокислот или от 250 до 350 аминокислот. Длина полипептида предпочтительно составляет от 290 до 320 аминокислот, наиболее предпочтительно от 300 до 310 аминокислот.

Первичная структура (последовательность аминокислот) полипептида согласно изобретению основана на первичной структуре IdeS, а именно, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2. Последовательность полипептида согласно изобретению включает вариант последовательности аминокислот SEQ ID NO: 2, которая по меньшей мере на 50% идентична последовательности аминокислот SEQ ID NO: 2. Вариант последовательности может быть по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен последовательности SEQ ID NO: 2. Вариант может быть идентичен последовательности SEQ ID NO: 2 за исключением того, что он включает одну или более специфических модификаций, указанных в настоящем описании. Идентичность последовательности SEQ ID NO: 2 может быть определена в области, составленной из по меньшей мере 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 200, по меньшей мере 300 или более непрерывно расположенных аминокислот последовательности, представленной SEQ ID NO: 2, или более предпочтительно по всей длине SEQ ID NO: 2.

Идентичность аминокислот может быть вычислена с помощью любого подходящего алгоритма. Например, алгоритмы PILEUP и BLAST могут быть применены для вычисления идентичности или сопоставления последовательностей (например, идентификации эквивалентных или соответствующих последовательностей (обычно с использованием параметров по умолчанию), например, как описано в публикации Altschul S. F. (1993) J. Mol. Evol. 36:290-300; Altschul, S. F. *с соавт.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10). Программное обеспечение для проведения анализов BLAST (от англ. Basic local alignment search tool, т.е. "средство поиска основного локального выравнивания") имеется в свободном

доступе на сайте National Center for Biotechnology Information (Национального
 Центра Биотехнологической Информации) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Этот
 алгоритм включает сначала идентификацию пары последовательностей с высоким
 показателем сходства (англ. high scoring sequence pair, сокращенно HSP)
 5 посредством идентификации коротких слов длины W исследуемой
 последовательности, которые либо соответствуют, либо удовлетворяют некоторому
 положительно оцениваемому пороговому значению показателя T при сопоставлении
 со словом той же длины в последовательности, имеющейся в базе данных. T
 означает пороговое значение показателя соседнего слова (Altschul с соавт., выше).
 10 Начальные совпадения соседнего слова действуют как сигнал для начала поиска
 HSP, содержащих их. Совпадения слов распространяют в обоих направлениях
 вдоль каждой последовательности до тех пор, повышается суммарная оценка
 выравнивания. Рост совпадения слов в каждом направлении останавливают тогда,
 когда: суммарная оценка выравнивания уменьшается на величину X по сравнению с
 15 достигнутым ею максимальным значением; суммарный показатель стремится к
 нулю или менее из-за накопления одного или более остатков выравнивания,
 имеющих отрицательную оценку; или достигнут конец любой последовательности.
 Чувствительность и скорость сопоставления определяются параметрами W , T и X
 алгоритма BLAST. По умолчанию в программе BLAST используют длину (W) слова,
 20 составляющую 11, матрицы весов выравнивания BLOSUM62 (см. Henikoff and
 Henikoff (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915-10919) (B) 50, ожидание (E) 10,
 $M=5$, $N=4$, и сравнение обеих цепочек.

Алгоритм BLAST выполняет статистический анализ сходства двух
 последовательностей; см., например, Karlin и Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci.*
 25 *USA* 90: 5873-5787. Одним параметром сходства, определяемым алгоритмом
 BLAST, является наименьшая суммарная вероятность ($P(N)$), которая указывает
 вероятность случайного совпадения между двумя полинуклеотидными или
 аминокислотными последовательностями. Например, последовательность
 считается одинаковой другой последовательности, если наименьшая суммарная
 30 вероятность при сравнении первой последовательности со второй
 последовательностью составляет менее приблизительно 1, предпочтительно менее
 приблизительно 0,1, более предпочтительно менее приблизительно 0,01, и
 наиболее предпочтительно менее приблизительно 0,001. В альтернативном
 варианте в пакете программного обеспечения UWGCG имеется программа
 35 BESTFIT, которая может быть применена для вычисления идентичности (например,

с параметрами по умолчанию) (Devereux с соавт. (1984) *Nucleic Acids Research* 12, 387-395).

Последовательность полипептида согласно изобретению включает вариант последовательности аминокислот SEQ ID NO: 2, в которую внесены изменения, такие как добавление, изъятие или замена аминокислот по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 2. Если не указано иное, изменения предпочтительно представляют собой консервативные аминокислотные замены. При консервативных заменах аминокислоты заменяют другими аминокислотами, имеющими схожую химическую структуру, сходные химические свойства или сходный объем боковой цепи. Введенные аминокислоты могут иметь такую же полярность, гидрофильность, гидрофобность, основность, кислотность, нейтральность или заряд, как и аминокислоты, которые они заменяют. В альтернативном варианте при консервативной замене может быть введена другая аминокислота, например, ароматическая или алифатическая, вместо имевшейся ранее ароматической или алифатической аминокислоты. Консервативные замены аминокислот хорошо известны в данной области техники и могут быть выбраны в соответствии со свойствами 20 основных аминокислот, указанных ниже в Таблице A1. Если аминокислоты имеют сходную полярность, то это может быть определено по шкале гидрофобности для боковых цепей аминокислот, приведенной в Таблице A2.

Таблица A1

Химические свойства аминокислот

Ala (A)	алифатическая, гидрофобная, нейтральная	Met (M)	гидрофобная, нейтральная
Cys (C)	полярная, гидрофобная, нейтральная	Asn (N)	полярная, гидрофильная, нейтральная
Asp (D)	полярная, гидрофильная, заряд (-)	Pro (P)	гидрофобная, нейтральная
Glu (E)	полярная, гидрофильная, заряд (-)	Gln (Q)	полярная, гидрофильная, нейтральная
Phe (F)	ароматическая, гидрофобная, нейтральная	Arg (R)	полярная, гидрофильная, заряд (+)
Gly (G)	алифатическая, нейтральная	Ser (S)	полярная, гидрофильная, нейтральная

His (H)	ароматическая, полярная, гидрофильная, заряд (+)	Thr (T)	полярная, гидрофильная, нейтральная
Ile (I)	алифатическая, гидрофобная, нейтральная	Val (V)	алифатическая, гидрофобная, нейтральная
Lys (K)	полярная, гидрофильная, заряд(+)	Trp (W)	ароматическая, гидрофобная, нейтральная
Leu (L)	алифатическая, гидрофобная, нейтральная	Tyr (Y)	ароматическая, полярная, гидрофобная

Таблица A2

Шкала гидрофобности

Боковая цепь	Гидрофобность
Ile	4,5
Val	4,2
Leu	3,8
Phe	2,8
Cys	2,5
Met	1,9
Ala	1,8
Gly	-0,4
Thr	-0,7
Ser	-0,8
Trp	-0,9
Tyr	-1,3
Pro	-1,6
His	-3,2
Glu	-3,5
Gln	-3,5
Asp	-3,5
Asn	-3,5
Lys	-3,9
Arg	-4,5

- 5 Аминокислотная последовательность полипептида согласно изобретению включает вариант последовательности аминокислот SEQ ID NO: 2. Однако, определенные остатки аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2 предпочтительно остаются в таком варианте последовательности. Например, в таком варианте последовательности обычно остаются определенные остатки,
- 10 которые, как известно, необходимы для обеспечения активности IgG-цистеиновой протеазы. Таким образом, в аминокислотной последовательности полипептида

согласно изобретению должен оставаться цистеин в положении 94 SEQ ID NO: 1 (65-ый остаток SEQ ID NO: 2). Необязательно также остаются лизин в положении 84, гистидин в положении 262 и аспарагиновая кислота в положениях 284 и 286 SEQ ID NO: 1. Они представляют собой 55-ый, 233-ий, 255-ый и 257-ый остатки SEQ ID NO: 2, соответственно. Таким образом, полипептид согласно изобретению обычно включает вариант последовательности аминокислот SEQ ID NO: 2, который имеет цистеин (C) в том положении указанного варианта последовательности, которое соответствует положению 94 в SEQ ID NO: 1; и необязательно имеет в тех положениях указанного варианта последовательности, которые соответствуют положениям 84, 262, 284 и 286 в SEQ ID NO: 1, лизин (K), гистидин (H), аспарагиновую кислоту (D) и аспарагиновую кислоту (D), соответственно.

Исходя из приведенных выше структурных ограничений, авторами изобретения при рассмотрении трехмерной модели IdeS были идентифицированы специфические положения, которые могут быть модифицированы для регулирования функциональных свойств IdeS. Авторами изобретения было обнаружено следующее:

(1) Замена аспарагина (N) в положении 130 SEQ ID NO: 1 положительно заряженной аминокислотой усиливает активность полипептида, в который внесено это изменение. Таким образом, полипептид согласно изобретению может включать вариант последовательности аминокислот SEQ ID NO: 2, который имеет положительно заряженную аминокислоту в том положении варианта, которое соответствует положению 130 в SEQ ID NO: 1. Обычные положительно заряженные аминокислоты перечислены выше в Таблице A1. Положительно заряженная аминокислота предпочтительно представляет собой аргинин (R) или лизин (K). Соответственно, согласно настоящему изобретению, эта конкретная модификация может быть обозначена как "N130R/K".

(2) Замена глицина (G) в положении 131 SEQ ID NO: 1 положительно заряженной аминокислотой усиливает активность полипептида, в который внесено это изменение. Таким образом, полипептид согласно изобретению может включать вариант последовательности аминокислот SEQ ID NO: 2, который имеет положительно заряженную аминокислоту в том положении варианта, которое соответствует положению 131 в SEQ ID NO: 1. Обычные положительно заряженные аминокислоты перечислены выше в Таблице A1. Положительно заряженная аминокислота предпочтительно представляет собой аргинин (R) или лизин (K).

Соответственно, согласно настоящему изобретению, эта конкретная модификация может быть обозначена как "G131R/K".

(3) Удаление последних четырех остатков на С-конце SEQ ID NO: 2 усиливает активность полипептида, в который внесено это изменение. Последние
 5 четыре остатка на С-конце SEQ ID NO: 2 составляют непрерывную последовательность NQTN. Таким образом, полипептид согласно изобретению может включать вариант последовательности аминокислот SEQ ID NO: 2, который не включает непрерывной последовательности NQTN. Таким образом, последние
 10 четыре остатка на С-конце SEQ ID NO: 2 в указанном варианте SEQ ID NO: 2 могут отсутствовать. Последние четыре остатка SEQ ID NO: 2 соответствуют положениям 336-339 SEQ ID NO: 1. Соответственно, согласно настоящему изобретению, эта конкретная модификация может быть обозначена как "N336_N339del".

(4) Удаление или изменение последовательности из первых двадцати остатков на N-конце SEQ ID NO: 2 может повышать активность полипептида, в
 15 который внесено это изменение, и/или может снижать иммуногенность, не оказывая негативного влияния на активность.

Первые двадцать остатков на N-конце SEQ ID NO: 2 составляют непрерывную последовательность DSFSANQEIRYSEVTPYHVT (SEQ ID NO: 19). Таким образом, полипептид согласно изобретению может включать вариант
 20 последовательности аминокислот SEQ ID NO: 2, который не включает непрерывной последовательности DSFSANQEIRYSEVTPYHVT.

Например, указанная непрерывная последовательность SEQ ID NO: 19 может быть полностью удалена. Таким образом, в указанном варианте SEQ ID NO: 2 могут отсутствовать первые двадцать остатков на N-конце SEQ ID NO: 2. Первые
 25 двадцать остатков SEQ ID NO: 2 соответствуют положениям 30-49 SEQ ID NO: 1. Соответственно, согласно настоящему изобретению, удаление этой непрерывной последовательности может быть обозначено как "D30_T49del".

В альтернативном варианте полипептид согласно изобретению может включать вариант последовательности аминокислот SEQ ID NO: 2, в котором
 30 последовательность из первых двадцати остатков на N-конце SEQ ID NO: 2 изменена замещением одной или более аминокислот в первых двадцати остатках. Измененная последовательность предпочтительно обладает пониженной иммуногенностью по сравнению с первыми двадцатью аминокислотами в SEQ ID

NO: 2. Например, аминокислоты в положениях с 2 по 20 в SEQ ID NO: 2 (что соответствует положениям 31-49 в SEQ ID NO: 1) необязательно могут быть заменены непрерывной последовательностью DYQRNATEAY AKEVPHQIT (SEQ ID NO: 36). Другими словами, первые двадцать аминокислот полипептида согласно изобретению могут составлять последовательности DDYQRNATEA YAKEVPHQIT (SEQ ID NO: 37) вместо последовательности SEQ ID NO: 19. Введенная последовательность SEQ ID NO: 36 взята из N-терминальной области IdeZ и соответствует положениям 36-54 Эталонной последовательности IdeZ NCBI No. WP_014622780.1. В организме человека антитела к IdeZ обычно не экспрессируются, и, таким образом, полипептид, включающий эту последовательность, в меньшей степени подвержен действию ADA. Согласно настоящему изобретению, замена SEQ ID NO: 35 последовательностью SEQ ID NO: 37 может быть обозначена "S31_T49repIZ".

Таким образом, в целом, полипептид согласно изобретению включает вариант последовательности SEQ ID NO: 2, и этот вариант:

(a) по меньшей мере на 50% идентичен SEQ ID NO: 2;

(b) имеет цистеин (C) в том положении указанного варианта последовательности, которое соответствует положению 94 в SEQ ID NO: 1; и необязательно

(c) имеет в тех положениях указанного варианта последовательности, которые соответствуют положениям 84, 262, 284 и 286 в SEQ ID NO: 1, лизин (K), гистидин (H), аспарагиновую кислоту (D) и аспарагиновую кислоту (D), соответственно.

Предпочтительно указанный вариант SEQ ID NO: 2:

(1) имеет положительно заряженную аминокислоту в том положении варианта, которое соответствует положению 130 в SEQ ID NO: 1, и положительно заряженная аминокислота необязательно представляет собой аргинин (R) или лизин (K); и/или

(2) имеет положительно заряженную аминокислоту в том положении варианта, которое соответствует положению 131 в SEQ ID NO: 1, и положительно заряженная аминокислота необязательно представляет собой аргинин (R) или лизин (K); и/или

(3) не включает непрерывной последовательности NQTN; и/или

(4) не включает непрерывной последовательности DSFSANQEIR YSEVTPYHVT.

Вариант SEQ ID NO: 2 может включать одну, две, три или все четыре модификации (1)-(4), представленные выше. Этот вариант может включать любую комбинацию из двух или трех модификаций (1)-(4), представленных выше. Предпочтительный вариант включает модификацию (3) и по меньшей мере одну из модификаций (1) и (2). Другой предпочтительный вариант включает модификации (3) и (4) и по меньшей мере одну из модификаций (1) и (2).

Авторами изобретения также было обнаружено, что некоторые другие модификации последовательности SEQ ID NO: 2, которые могут быть применены в альтернативном варианте или дополнительно к любой из комбинаций модификаций (1)-(4), рассмотренных выше, могут повышать активность полипептида согласно изобретению и/или могут ухудшать распознавание полипептида согласно изобретению IdeS-специфическими ADA. Таким образом, полипептид согласно изобретению может включать вариант последовательности SEQ ID NO: 2, в котором произведено замещение в одном или более положений, соответствующих положениям 115, 119, 139, 142, 198, 216, 226, 241, 245, 302, 316 и 333 в SEQ ID NO: 1. Этот вариант может включать замещение во всех указанных положениях, но обычно он включает замещения в двух, трех, четырех, пяти, шести или семи таких положениях. Замещения в этих положениях обычно представляют собой замену имеющейся аминокислоты другой аминокислотой, имеющей отличающиеся свойства. Например, аминокислота, не имеющая заряда, может быть замещена аминокислотой, имеющей заряд, и наоборот. Предпочтительные замещения в перечисленных положениях представлены ниже в Таблице В с помощью однобуквенного кода.

Таблица В

Имеющаяся в SEQ ID NO: 2 аминокислота	Положение в SEQ ID NO: 1	Предпочтительная замена
K	115	E
E	119	R
E	139	K
D	142	R

E	198	K
D	216	N
D	226	N
K	241	E
E	245	K
S	302	K
D	316	K
D	333	K

Каждое из замещений, указанных в Таблице В, может быть обозначено согласно настоящему изобретению обозначением, полученным комбинацией содержимого ячеек в первой, второй и третьей колонке в каждом ряду слева направо. Например, согласно настоящему изобретению, замещение в первом ряду может быть обозначено “K115E”, замещение во втором ряду может быть обозначено “E119R” и т.д. Конкретная модификация “D226N” предназначена для разрушения известного мотива клеточной адгезии в последовательности IdeS, т.е. непрерывной RGD последовательности в положениях 224-226 SEQ ID NO: 1.

- 10 Ниже в Таблице С представлены модификации, используемые для получения аминокислотных последовательностей некоторых примером полипептидов согласно изобретению.

Таблица С

Внутренняя ссылка	Модификации по сравнению с IdeS (положения соответствуют SEQ ID NO: 1)	SEQ ID NO полной последовательности
pCART152	N130R	3
pCART183	N130K, E198R, D216N	4
pCART184	N130R, E198K, D216N, S302K	5
pCART185	E119R, D216N, T244D	6
pCART186	E119K, D142R, D216N, T244E, S302K	7
pCART187	K115E, D216N, K241E, E245K, D316K, D333K	8
pCART188	E119K, N130R, D142R, D216N, K241S, T244E, E245N, S302K	9

pCART189	E119K, N130R, D142R, E198K, D216N, T244E	10
pCART190	K115E, N130R, E198K, D216N, K241E, E245K, D333K	11
pCART209	N336_N339del (удаление NQTN)	12
pCART125	D30_T49del (удаление DSFSANQEIR YSEVTPYHVT)	13
pCART213	D30_T49del (удаление DSFSANQEIR YSEVTPYHVT), N130K, D216N	14
pCART214	D30_T49del (удаление DSFSANQEIR YSEVTPYHVT), K115E, N130K, E139K, D216N, K241E, E245K, D333K	15
pCART228	S31_T49replZ (replace SEQ ID NO: 35 с SEQ ID NO: 36), K115E, N130K, E139K, D216N, K241E, E245K, D333K	16

Ниже полностью представлены аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1 и 2, а также аминокислотные последовательности каждого из примеров полипептидов согласно изобретению, указанных в Таблице С.

5 SEQ ID NO:1

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSAHQEIHYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPA
NFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNGKDDLLCGAAMETKNMLHWWFDQNKDQIKRY
LEEHPKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHDVID
MFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLI
10 KKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDNSGNLKAIVTDSDSNASIGMKKYFVG
VNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO: 2

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNG
15 KDDLLCGAATAGNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNH
QLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHDVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGG
IFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWG
ADFDNSGNLKAIVTDSDSNASIGMKKYFVG VNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLS
TGQDSWNQTN

20 SEQ ID NO: 3 (pCART152)

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNG
 KDDLCCGAAMETKNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFRGEQMFDVKEAIDTKN
 HQLDSKLFHEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRG
 GIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLW
 5 GADFDNSGNLKAIVTDSDSNASIGMKKYFVGVSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTL
 STGQDSWNQTN

SEQ ID NO: 4 (pCART183)

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNG
 KDDLCCGAAMETKNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFRGEQMFDVKEAIDTKNH
 10 QLDSKLFHEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKRGSKDPRGG
 IFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWG
 ADFDNSGNLKAIVTDSDSNASIGMKKYFVGVSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLS
 TGQDSWNQTN

SEQ ID NO: 5 (pCART184)

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNG
 KDDLCCGAAMETKNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFRGEQMFDVKEAIDTKN
 HQLDSKLFHEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKKGSKDPRG
 GIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLW
 GADFDNSGNLKAIVTDSDSNASIGMKKYFVGVSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTL
 20 STGQDSWNQTN

SEQ ID NO: 6 (pCART185)

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNG
 KDDLCCGAAMETKNMLHWWFDQNKDQIKRYLREHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKN
 HQLDSKLFHEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRG
 25 GIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELDEGKALGLSHTYANVRINHVINLW
 GADFDNSGNLKAIVTDSDSNASIGMKKYFVGVSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTL
 STGQDSWNQTN

SEQ ID NO: 7 (pCART186)

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNG
 30 KDDLCCGAAMETKNMLHWWFDQNKDQIKRYLKEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIRTKN
 HQLDSKLFHEYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRG
 GIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELEEGKALGLSHTYANVRINHVINLW
 GADFDNSGNLKAIVTDSDSNASIGMKKYFVGVSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTL
 STGQDSWNQTN

SEQ ID NO: 8 (pCART187)

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNG
 KDDLCCGAAMETKNMLHWWFDQNKDQIERYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKN
 HQLDSKLF EYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRG
 5 GIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKEELTKGKALGLSHTYANVRINHVINLW
 GADFD SNGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVG VNSAGKVAISAKEIKEKNIGAQVLGLFTL
 STGQKSWNQTN

SEQ ID NO: 9 (pCART188)

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNG
 10 KDDLCCGAAMETKNMLHWWFDQNKDQIKRYLKEHPEKQKINFRGEQMFDVKEAIRTKN
 HQLDSKLF EYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRG
 GIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKSELENGKALGLSHTYANVRINHVINLW
 GADFD SNGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVG VNKAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTL
 STGQDSWNQTN

15 SEQ ID NO: 10 (pCART189)

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNG
 KDDLCCGAAMETKNMLHWWFDQNKDQIKRYLKEHPEKQKINFRGEQMFDVKEAIRTKN
 HQLDSKLF EYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKKGSKDPRG
 GIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELEEGKALGLSHTYANVRINHVINLW
 20 GADFD SNGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVG VNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTL
 STGQDSWNQTN

SEQ ID NO: 11 (pCART190)

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNG
 KDDLCCGAAMETKNMLHWWFDQNKDQIERYLEEHPEKQKINFRGEQMFDVKEAIDTKN
 25 HQLDSKLF EYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKKGSKDPRG
 GIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKEELTKGKALGLSHTYANVRINHVINLW
 GADFD SNGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVG VNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTL
 STGQKSWNQTN

SEQ ID NO: 12 (pCART209)

30 DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNG
 KDDLCCGAAMETKNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKN
 HQLDSKLF EYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRG
 GIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLW

GADFDSNGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTL
STGQDSW

SEQ ID NO: 13 (pCART125)

5 SVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNGKDDLLCGAAMETKNMLHW
WFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFYFKEKAFPYLS
TKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRH
DFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSNGNLKAIYVTDSDS
NASIGMKKYFVGVSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

10 SEQ ID NO: 14 (pCART213)

SVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNGKDDLLCGAAMETKNMLHW
WFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFYFKEKAFPYLS
TKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRH
DFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSNGNLKAIYVTDSDS
15 NASIGMKKYFVGVSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO: 15 (pCART214)

SVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNGKDDLLCGAAMETKNMLHW
WFDQNKDQIERYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKAIDTKNHQLDSKLFYFKEKAFPYLS
20 TKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRH
DFKEKNLKEISDLIKEELTKGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSNGNLKAIYVTDSDS
NASIGMKKYFVGVSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQKSWNQTN

SEQ ID NO: 16 (pCART228)

25 DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFN
GKDDLLCGAAMETKNMLHWWFDQNKDQIERYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKAIDTK
NHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPR
GGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKEELTKGKALGLSHTYANVRINHVINL
WGADFDSNGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLF
30 TLSTGQKSWNQTNNGGGHHHHHH

Полипептид согласно изобретению может включать, по существу состоять
или состоять из последовательности, имеющейся в любой из последовательностей
SEQ ID NO: с 3 по 16. Каждая из последовательностей SEQ ID NO: 3-16
35 необязательно может включать дополнительный метионин на N-конце и/или

гистидиновую метку на С-конце. Гистидиновая метка предпочтительно состоит из шести гистидиновых остатков. Гистидиновая метка предпочтительно связана с С-концом линкером, состоящим из 3-х глициновых или 5-и глицин остатков. В последовательности SEQ ID NO: 13 гистидиновая метка предпочтительно связана с С-концом линкером, состоящим из 5-и глициновых остатков.

Получение полипептидов

Полипептид, рассматриваемый в настоящем описании, может быть получен любыми подходящими средствами. Например, полипептид может быть синтезирован непосредственным образом с помощью стандартных методик, известных в данной области техники, таких как твердофазный синтез с использованием Fmoc (от англ. 9-fluorenylmethoxycarbonyl, т.е. 9-флуоренилметоксикарбонил), твердофазный синтез с использованием Boc (от англ. N-tert-butoxycarbonyl (t-BOC), т.е. N-трет-бутоксикарбонил) или синтезом пептидов в растворе. В альтернативном варианте полипептид может быть получен трансформацией клетки, обычно бактериальной клетки, под действием молекулы нуклеиновой кислоты или вектора, который кодирует этот полипептид. Получение полипептидов экспрессией в бактериальных клетках-хозяевах рассмотрено ниже и раскрыто в Примерах. Изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты и векторам, которые кодируют полипептид согласно изобретению. Изобретение также относится к клетке-хозяину, включающей такую нуклеиновую кислоту или вектор. Примеры полинуклеотидных молекул, кодирующих полипептиды, рассматриваемые в настоящем описании, приведены в виде последовательностей SEQ ID NO: 20-34. Каждая из этих последовательностей включает на конце 3' кодон для N-терминального метионина (ATG) и перед терминирующим кодоном (стоп-кодоном) (TAA) на конце 5' кодоны для 3х gly линкера и 6х his гистидиновой метки, которые необязательно могут быть исключены.

Согласно настоящему изобретению, термины “молекула нуклеиновой кислоты” и “полинуклеотид” используются взаимозаменяемо и относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, как к дезоксирибонуклеотидам, так и к рибонуклеотидам или их аналогам. Неограничивающие примеры полинуклеотидов включают ген, фрагмент гена, информационную (матричную) РНК (мРНК), кДНК (комплементарную ДНК), рекомбинантные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенную ДНК любой последовательности, выделенную РНК любой последовательности, зонды для нуклеиновых кислот и праймеры. Полинуклеотид

согласно изобретению может быть предоставлен в выделенной или по существу выделенной форме. “По существу выделенная форма” означает практически полное, но не полное выделение полипептида из любой окружающей среды. Полинуклеотиды могут быть смешаны с носителями или разбавителями, которые не влияют на предполагаемое применение полинуклеотида, но при этом он считается по существу выделенным. Последовательность нуклеиновых кислот, которая “кодирует” выбранный полипептид, представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая *in vivo* транскрибируется (в случае ДНК) и транслируется (в случае мРНК) в полипептид под управлением подходящих регуляторных последовательностей, например, экспрессионного вектора. Границы кодирующей последовательности определяются иницирующим кодоном на 5' концевом участке (амино) и кодоном, терминирующим трансляцию, на 3' (карбоксильном) концевом участке. Для целей настоящего изобретения такие последовательности нуклеиновых кислот могут включать, без ограничений, кДНК, полученную на основе вирусной, прокариотической или эукариотической мРНК, геномные последовательности из вирусной или прокариотической ДНК или РНК и даже синтетические последовательности ДНК. Последовательность окончания транскрипции может находиться в положении 3' к кодирующей последовательности.

Полинуклеотиды могут быть синтезированы способами, хорошо известными в данной области техники, рассмотренными, например, в публикации Sambrook *с соавт.* (1989, *Molecular Cloning - a laboratory manual*; Cold Spring Harbor Press). Молекулы нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению могут быть предоставлены в виде экспрессионной кассеты, которая включает контрольные последовательности, функционально связанные с введенной последовательностью, что позволяет экспрессировать полипептид согласно изобретению *in vivo*. Такие экспрессионные кассеты, в свою очередь, обычно получают в векторах (например, плазидах или рекомбинантных вирусных векторах). Экспрессионная кассета может быть введена непосредственно субъекту-хозяину. В альтернативном варианте субъекту-хозяину может быть введен вектор, включающий полинуклеотид согласно изобретению. Предпочтительно полинуклеотид получают и/или вводят с помощью генетического вектора. Подходящим вектором может быть любой вектор, который может нести достаточную генетическую информацию и обеспечивать экспрессию полипептида согласно изобретению.

Таким образом, настоящее изобретение включает экспрессионные векторы, которые включают такие полинуклеотидные последовательности. Конструирование

таких экспрессионных векторов является обычной практикой в области молекулярной биологии и может, например, включать применение плазмидной ДНК и подходящих инициаторов, промоторов, энхансеров и других элементов, таких как, например, сигналов полиаденилирования, которые могут быть необходимыми и которые располагают в нужной ориентации для экспрессирования пептида согласно изобретению. Другие подходящие векторы должны быть известны специалистам в данной области техники. Дополнительные примеры подобных методик могут быть найдены в публикации Sambrook *с соавт.*

Изобретение также включает клетки, которые были модифицированы с целью экспрессирования полипептида согласно изобретению. Такие клетки обычно включают прокариотические клетки, такие как бактериальные клетки, например, *E. coli*. Для получения полипептида согласно изобретению может быть произведено культивирование таких клеток обычными способами.

Для улучшения получения, выделения или очистки полипептида, он может быть модифицирован или из него могут быть получены производные. Например, если полипептид согласно изобретению получают рекомбинантной экспрессией в бактериальной клетке-хозяине, то для улучшения экспрессии последовательность полипептида может включать дополнительный остаток метионина (M) на N-конце. В другом примере полипептид согласно изобретению может быть модифицирован или из него могут быть получены производные присоединением лиганда, который может связываться непосредственно и специфично со средствами разделения. В альтернативном варианте полипептид может быть модифицирован или из него могут быть получены производные присоединением одного члена связывающей пары, и средства разделения включают реагент, который модифицирован или из него получены производные присоединением другого члена связывающей пары. Для указанной цели может быть применена любая подходящая связывающая пара. В одном из предпочтительных примеров осуществления, в котором полипептид, применяемый согласно изобретению, модифицирован или из него получены производные присоединением одного члена связывающей пары, полипептид предпочтительно представляет собой полипептид, меченый гистидином или биотином. Обычно аминокислотную кодирующую последовательность гистидиновой или биотиновой метки включают на генном уровне, и полипептид рекомбинантно экспрессируется микроорганизмами *E. coli*. Гистидиновая или биотиновая метка может находиться на любом конце полипептида, предпочтительно на С-концевом участке. Она может быть непосредственно присоединена к полипептиду или

присоединена опосредованно через любую подходящую линкерную последовательность, такую как 3, 4 или 5 остатков глицина. Гистидиновая метка обычно состоит из шести гистидиновых остатков, но может иметь и большую длину, обычно составляющую до 7, 8, 9, 10 или 20 аминокислот или менее, например, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислоту.

Аминокислотная последовательность полипептида может быть модифицирована включением не встречающихся в природе аминокислот, например, для повышения стабильности. При получении полипептидов средствами синтеза, такие аминокислоты могут быть введены во время синтеза. Полипептиды также могут быть модифицированы после синтеза или рекомбинантного получения. Полипептиды также могут быть получены из D-аминокислот. В таких случаях аминокислоты будут соединены в обратной последовательности в ориентации от С до N. Такие методики традиционно применяют в данной области техники для получения полипептидов.

В данной области техники известно множество модификаций боковой цепи, и они могут быть применены к боковым цепям полипептидов для придания полипептидам дополнительной требуемой активности или характеристик, которые могут быть необходимы согласно настоящему изобретению. Также следует понимать, что полипептиды могут быть химически модифицированы, например, модифицированы после завершения трансляции. Например, они могут быть подвергнуты гликозилированию, фосфорилированию, или они могут включать модифицированные аминокислотные остатки.

Полипептид может быть ПЭГилированным (модифицированным полиэтиленгликолем). Полипептид согласно изобретению может находиться в по существу выделенном виде. Он может быть смешан с носителями или разбавителями (как рассмотрено ниже), которые не влияют на его предполагаемое применение, но при этом он считается по существу выделенным. Он также может находиться в по существу очищенном виде, и в этом случае он обычно составляет по меньшей мере 90%, например, по меньшей мере 95%, 98% или 99% от содержания белка в препарате.

Композиции и препараты, включающие полипептиды

Другой аспект настоящего изобретения относится к композициям, включающим полипептид согласно изобретению. Например, изобретение относится

к композиции, включающей один или более полипептидов согласно изобретению и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. Носитель (носители) должен быть "приемлемым" в том смысле, что он должен быть совместим с другими ингредиентами композиции и не оказывать вредного влияния на субъект, которому вводят композицию. Обычно носители и готовые композиции стерильны и не содержат пирогенов.

Подходящая композиция может быть получена при помощи стандартных химических методик и способов получения фармацевтических препаратов, которые знакомы обычному специалисту в этой области техники. Например, агент (средство) может быть скомбинировано с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными средствами или носителями. Вспомогательное средство или носитель могут включать вспомогательные вещества, такие как смачивающие или эмульгирующие средства, буферные вещества, регулирующие pH, восстановители и подобные средства. Подходящие восстановители включают цистеин, тиоглицерин, тиоредуктин, глутатион и подобные вещества. Вспомогательные средства, носители и вспомогательные вещества обычно представляют собой фармацевтические средства, не вызывающие ответную иммунную реакцию у индивидуума, получающего композицию, которые могут быть введены, не создавая ненужной токсичности. Фармацевтически приемлемые вспомогательные средства включают, без ограничений, жидкости, такие как вода, раствор поваренной соли, полиэтиленгликоль, гиалауроновую кислоту, глицерин, тиоглицерин и этанол. В композицию также могут быть включены фармацевтически приемлемые соли, например, соли минеральных кислот, такие как гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты, сульфаты и подобные соли; и соли органических кислот, такие как ацетаты, пропионаты, малонаты, бензоаты и подобные соли. Подробное рассмотрение фармацевтически приемлемых вспомогательных средств, носителей и вспомогательных веществ имеется в публикации Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991).

Такие композиции могут быть приготовлены, упакованы или проданы в виде формы, подходящей для струйного (болюсного) введения или для длительного введения. Инъекционные композиции могут быть приготовлены, упакованы или проданы в виде стандартной лекарственной формы, например, в виде ампул или контейнеров для многократного введения, содержащих консервант. Композиции включают, без ограничений, суспензии, растворы, эмульсии в масляных или водных носителях, пасты и имплантируемые препараты с пролонгированным

- высвобождением или биоразлагаемые препараты. Такие композиции дополнительно могут включать один или более дополнительных ингредиентов, включающих, без ограничений, суспендирующие, стабилизирующие или диспергирующие агенты. В одном из примеров осуществления композиции для парентерального введения активный ингредиент предоставлен в сухом виде (например, в виде порошка или гранул) для восстановления путем добавления подходящего носителя (например, стерильной воды, не содержащей пирогенов) перед парентеральным введением восстановленной композиции. Композиции могут быть приготовлены, упакованы или проданы в виде стерильной водной или масляной суспензии или раствора для инъекций. Эта суспензия или раствор могут быть приготовлены способами, известными в данной области техники, и кроме активного ингредиента могут включать дополнительные ингредиенты, такие как диспергирующие агенты, смачивающие агенты или суспендирующие агенты, рассмотренные в настоящем описании. Стерильные препараты для инъекций могут быть получены с использованием нетоксичного, приемлемого для парентерального введения разбавителя или растворителя, такого как, например, вода или 1,3-бутандиол. Другие приемлемые разбавители и растворители включают, без ограничений, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия и нелетучие масла, такие как синтетические моно- или диглицериды.
- Другие подходящие для парентерального введения композиции включают композиции, содержащие активный ингредиент в микрокристаллической форме, в виде липосомного препарата или в виде компонента биоразлагаемых полимерных систем. Композиции или имплантаты с пролонгированным высвобождением могут включать фармацевтически приемлемые полимерные или гидрофобные материалы, такие как эмульсия, ионообменная смола, плохо растворимый полимер или плохо растворимую соль. Композиции могут быть подходящими для введения любым подходящим способом, включающим, например, внутрикожное, подкожное, чрескожное, внутримышечное, внутриартериальное, интраперитонеальное, внутрисуставное, внутрикостное (эндостальное) или другое подходящее введение. Предпочтительно композиции подходят для введения посредством внутривенного вливания.

Способы применения полипептидов

Изобретение относится к применению полипептидов согласно изобретению в различных способах. Например, полипептиды согласно изобретению могут служить

полезными инструментами для целей биотехнологии. Полипептиды могут быть применены для специфического *ex vivo* расщепления IgG, в частности, человеческого IgG. В таком способе полипептид может быть инкубирован с образцом, содержащим IgG, в условиях, которые позволяют проявиться специфической активности цистеиновой протеазы. Специфическое расщепление может быть подтверждено, и продукты расщепления выделены любым подходящим способом, например, способом, рассмотренным в документах WO2003051914 и WO2009033670. Таким образом, способ может быть применен, в частности, для образования фрагментов Fc и F(ab')₂. Затем при восстановлении (например, в 2-меркаптоэтаноламине или цистеамине) фрагментов F(ab')₂, которые образуются при расщеплении IgG под действием полипептида согласно изобретению, могут быть получены фрагменты Fab.

Способ также может быть применен для обнаружения или анализа IgG в образце или для удаления IgG из образца. Способ обнаружения IgG в образце обычно включает инкубацию полипептида с образцом в условиях, подходящих для специфического связывания и расщепления IgG. Присутствие IgG может быть подтверждено обнаружением специфических продуктов расщепления IgG, которые затем могут быть проанализированы.

Полипептиды согласно настоящему изобретению также могут быть применены для лечения или профилактики. При терапевтическом применении полипептиды или композиции вводят субъекту, уже страдающему расстройством или находящемуся в определенном состоянии, в количестве, достаточном для лечения, облегчения или частичной приостановки развития состояния или одного или более его симптомов. Терапевтическое лечение может привести к снижению тяжести симптомов заболевания или увеличению частоты или продолжительности бессимптомных периодов. Количество, достаточное для достижения этого эффекта, называется "терапевтически эффективным количеством". При профилактическом применении полипептиды или композиции вводят субъекту, у которого пока еще не проявляются симптомы расстройства или состояния, в степени, достаточной для предотвращения или остановки развития симптомов. Такое количество называют "профилактически эффективным количеством". Определение риска развития у субъекта заболевания или состояния может быть произведено любыми подходящими средствами. Таким образом, изобретение также относится к полипептиду согласно изобретению, применяемому для лечения человека или животного. Согласно настоящему изобретению также предложен способ

профилактики или лечения заболевания или состояния субъекта, где способ включает введение субъекту полипептида согласно изобретению в профилактически или терапевтически эффективном количестве. Полипептид может быть введен совместно с иммунодепрессантом. Полипептид предпочтительно вводят посредством внутривенного вливания, но он может быть введен любым подходящим способом, включающим, например, внутрикожное, подкожное, чрескожное, внутримышечное, внутриартериальное, интраперитонеальное, внутрисуставное, внутрикостное или другое подходящее введение. Нижний предел вводимого количества полипептида может составлять приблизительно 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10, 0,11, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,20, 0,21, 0,22, 0,23, 0,24, 0,25 мг/кг МТ (массы тела). Верхний предел вводимого количества полипептида может составлять приблизительно 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0 мг/кг МТ. Следует понимать, что для получения диапазона вводимой дозировки любой из приведенных выше верхних пределов может быть скомбинирован с любым из приведенных выше нижних пределов. Например, вводимое количество полипептида может составлять приблизительно от 0,01 мг/кг МТ до 2 мг/кг МТ, от 0,10 до 1 мг/кг МТ и предпочтительно от 0,25 мг/кг МТ до 0,5 мг/кг МТ. Полипептид может быть введен одному и тому же субъекту множество раз, при условии, что количество ADA в сыворотке крови субъекта, которые способны связываться с полипептидом, не превышает порогового значения, определяемого лечащим врачом. Количество ADA в сыворотке крови субъекта, которые способны связываться с полипептидом, может быть определено любым подходящим способом, таким как агент-специфическое испытание CAP FEIA (ImmunoCAP) или анализ с определением титров.

Полипептиды согласно изобретению могут быть особенно полезны при лечении или профилактике заболевания или состояния, опосредуемого патогенными IgG антителами. Соответственно, изобретение относится к полипептиду согласно изобретению, применяемому при лечении или профилактике заболевания или состояния, опосредуемого патогенными IgG антителами. Изобретение также относится к способу лечения или профилактики заболевания или состояния, опосредуемого патогенными IgG антителами, который включает введение индивидууму полипептида согласно изобретению. Способ может включать многократное (повторное) введение полипептида. Изобретение также относится к полипептиду согласно изобретению, применяемому для получения медикамента

для лечения или профилактики заболевания или состояния, опосредуемого патогенными IgG антителами.

Обычно патогенные антитела специфичны для антигена, который является мишенью при аутоиммунном заболевании или другом состоянии, полностью или частично опосредуемом антителами. В Таблице D представлены примеры таких заболеваний и связанных с ними антигенов. Полипептид согласно изобретению может быть применен для лечения любого из названных заболеваний или состояний. Полипептид особенно эффективен при лечении или профилактике аутоиммунного заболевания, полностью или частично опосредуемого патогенными IgG антителами.

Таблица D

ЗАБОЛЕВАНИЕ	АУТОАНТИГЕНЫ
Болезнь Аддисона	Стероид-21-гидроксилаза, 17-альфа-гидроксилаза (17ОН) и фермент, расщепляющий боковую цепь (P450 _{scs}), тиреопероксидаза, тиреоглобулин и H ⁺ /K ⁺ -
Анти-GMB гломерулонефрит (синдром Гудпасчера)	Антитела к клубочковой базальной мембране (анти-GMB): неколлагеноподобные (NC1) домены альфа-3, альфа-4, альфа-5 (IV) коллагена
Васкулиты, связанные с антителами к цитоплазме нейтрофилов (ANCA-связанный васкулит) (гранулематоз Вегенера, синдром Черджа-Стросс, микроскопический полиангиит)	Миелопероксидаза, протеиназа 3
Анти-NMDAR энцефалит	N-метил-D-аспартат рецептор (англ. N-methyl-D-aspartate receptor, сокращенно NMDAR)
Антифосфолипидный синдром (англ. Anti-Phospholipid Syndrome, сокращенно APS) и катастрофический APS	Отрицательно заряженные фосфолипиды, образующие комплекс с белками плазмы крови, связывающими фосфолипиды (например, бета-2-GPI), кардиолипин, бета-2-гликопротеин I и (бета-2-GPI)
Аутоиммунные буллезные заболевания кожи (пузырчатка).	IgG к кератиноцитам. Специфичной мишенью является десмоглеин (Dsg) 1

Пузырчатка листовидная (англ. pemphigus foliaceus, сокращенно PF), fogo selvagem (FS) (эндемическая форма), пузырчатка обыкновенная (англ. pemphigus vulgaris, сокращенно PV)	(десмосомальные кадгерины)
Аутоиммунная гемолитическая анемия (англ. autoimmune hemolytic anemia, сокращенно AIHA)	Собственные антигены на красных кровяных клетках
Аутоиммунный гепатит (англ. Autoimmune hepatitis, сокращенно AIH)	Актин, антинуклеарное антитело (англ. antinuclear antibody, сокр. ANA), гладкомышечное антитело (англ. smooth muscle antibody сокр. SMA), антитело к микросомам печени и почек (англ. liver/kidney microsomal antibody, сокр. LKM-1), антитела к растворимым печеночным антигенам (англ. anti-soluble liver antigen, сокр. SLA/LP) и антимитохондриальное антитело (англ. anti-mitochondrial antibody, сокр. AMA), CYP2D6, CYP2C9-тиениловая кислота, UGT1A, CYP1A2, CYP2A6, CYP3A, CYP2E1, CYP11A1, CYP17 и CYP21
Аутоиммунная нейтропения (англ. Autoimmune neutropenia, сокращенно AIN)	FcγRIIIb
Буллезный пемфигоид (англ. bullous pemphigoid, сокращенно BP)	Полудесмосомальные белки BP230 и BP180 (коллаген типа XVII), ламинин 5, альфа-6 субъединица интегрин альфа-6 бета-4 и p200
Глютеновая болезнь	трансглутаминаза 2 (TG2), трансглутаминаза 3, актин, ганглиозид, коллаген, кальретикулин и зонулин, антигены щитовидной железы, эндокринной ткани поджелудочной железы, антитела против желудка и печени, анти-нуклеарные составляющие,

	антиретикулиновые антитела, актин, антигены гладких мышц, кальретикулин, десмин, коллагены, антигены костной ткани, антигены ткани мозга, ганглиозид, нейронные антигены, антигены кровеносных сосудов
Хроническая крапивница	Альфа-субъединица высокоаффинного IgE рецептора, IgE
Полная врожденная блокада сердца (англ. complete congenital heart block, сокращенно CCHB)	Ro (антиген A при синдроме Шёгрена (англ. Sjögens syndrome, сокращенно SSA)), La (антиген B при синдроме Шёгрена)
Диабет типа 1A (T1DM)	Аутоантитела островковых клеток (англ. islet cell autoantibodies, сокр. ICA), антитела к инсулину (IAA), декарбоксилаза глутаминовой кислоты (GAA или GAD), протеинтирозинфосфатаза (IA2 или ICA512), связанный с инсулином пептид-2. Полагают, что для наилучших прогнозов, касающихся проявления диабета, большее значение играет количество антител, а не одно индивидуальное антитело
Приобретенный буллезный эпидермолиз (англ. epidermolysis bullosa acquisita, сокращенно EBA)	145-kDa неколлагеновый аминотерминальный (NC-1) домен коллагена VII
Первичная криоглобулинемия смешанного типа	Антигены первичной криоглобулинемии смешанного типа
Синдром Гудпасчера (также называемый болезнью Гудпасчера и геморрагическая интерстициальная пневмония с нефритом)	альфа3(IV) коллаген (или антиген Гудпасчера)
Болезнь Грейвса (Базедова болезнь), включает зоб и гипертиреоз, инфильтратный экзофтальм и инфильтратную дерматопатию.	Тиреотропиновый рецептор (TSHR) тиреоидная пероксидаза (ТПО)

Синдром Гийена-Барре (англ. Guillain-Barré syndrome, сокр. GBS). Острая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия (англ. acute inflammatory demyelinating polyneuropathy, сокр. AIDP), острая моторная аксональная нейропатия (англ. acute motor axonal neuropathy, сокр. AMAN)	Ганглиозиды GM1, GM1b, GD1a и GalNAc-GD1a, гликофинголипид, миелиновые белки PMP22 и P0
Гемофилия – приобретенный дефицит FVIII	Фактор VIII
Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (англ. idiopathic thrombocytopenic purpura, сокр. ITP)	Гликопротеин тромбоцитов (англ. platelet glycoprotein, сокр. GP) IIb-IIIa и/или GPIb-IX
Миастенический синдром Итона-Ламберта (англ. Lambert-Eaton myasthenic syndrome, сокр. LEMS)	Потенциалозависимые кальциевые каналы
Смешанное заболевание соединительной ткани (англ. mixed connective tissue disease, сокр. MCTD)	IgG, направленный против сплайсингосомы, U1-snRNP
Множественная миелома	Антигены множественной миеломы
Тяжелая миастения, миастенический криз	Ацетилхолиновые рецепторы (AChR), мышечно-специфичная киназа (MuSK)
Миокардит, дилатационная кардиомиопатия (англ. dilated cardiomyopathy, сокр. DCM) (конгестивная кардиомиопатия)	Сердечно-реактивные аутоантитела к множеству антигенов, например, сердечный миозин
Оптиконевромиелит (англ. neuromyelitis optica, сокр. NMO)	Аквапорин 4 (AQP4)
Первичный билиарный цирроз печени (англ. primary biliary cirrhosis, сокр. PBC)	Комплекс (PDC)-E2 пируватдегидрогеназы и другие члены семейства оксалоуксусных дегидрогеназ, гликопротеин-210, p62, sp100

Первичный прогрессирующий рассеянный склероз (англ. primary progressive multiple sclerosis, сокр. PPMS)	Миелиновый олигодендроцитарный гликопротеин (англ. myelin oligodendrocyte glycoprotein, сокр. MOG), миелиновый протеолипидный белок (англ. myelin proteolipid protein, сокр. PLP), транскетолаза (англ. transketolase, сокр. ТК), фосфодиэстераза циклических нуклеотидов типа I (cyclic nucleotide phosphodiesterase type I, сокр. CNPase I), белок-медиатор 2 ответной реакции коллапсина, тубулин бета-4, нейрофасцин
Ревматическое поражение сердца (англ. rheumatic heart disease, сокр. RHD), (ревматическая атака)	Сердечный миозин
Ревматоидный артрит (англ. rheumatoid arthritis, сокр. RA)	Коллаген типа II, цитруллинированные белки (например, (фибриноген, виментин, филагрин, енолаза коллагена типа II,)), G6PI, RFs (анти-Fc/IgG), виментин и цитокератин
Сывороточная реакция, иммунокомплексная гиперчувствительность (тип III)	Различные антигены
Синдром Шёгрена (англ. Sjögren Syndrome, сокр. SS)	Ro (антиген А при синдроме Шёгрена (SS-A)), La (антиген В при синдроме Шёгрена (SS-B)), р80 коилин, антинуклеарные антитела, анти-тиреоидные, анти-центромерные антитела (феномен Рейно), анти-карбоангидраза II (дистальный почечный канальцевый ацидоз), анти-митохондриальные антитела (патология печени), криоглобулины (развитие до неходжкинской лимфомы), альфа- и бета-фодрин, аутоантиген островковых клеток, полимераза поли(ADP)рибозы (англ. poly(ADP)ribose polymerase, англ. PARP), NuMA, голгины (англ. golgins), NOR-90, M3-мускариновый рецептор

Системная красная волчанка (англ. systemic lupus erythematosus, сокр. SLE), включающая волчаночный нефрит	Аутоантитела к нуклеарным составляющим (например, к двухнитевой ДНК и нуклеосомам), двухнитевая ДНК, PARP, Sm, PCDA, рбосомные Р белки рРНК, C1q
Синдром скованного человека (англ. stiff-person syndrome, сокр. SPS)	Декарбоксилаза глутаминовой кислоты (англ. glutamic acid decarboxylase, сокр. GAD), амфифизин (англ. amphiphysin)
Системный склероз (склеродерма)	ДНК-топоизомераза I (Sci-70), U3 snRNP, U2 snRNP, 7-2 RNP, NOR-90, белки, связанные с центромерами, и нуклеолярные антигены, анти-Th/To, анти-РНК полимераза I/III, анти-ТГФ (тромбоцитарный фактор роста) рецептор, анти-фибриллин-1, М3-мускариновый рецептор
Отторжение трансплантата	Антигены отторжения трансплантата
Тромбоцитопенический акроангиотромбоз (англ. thrombotic thrombocytopenic purpura, сокр. TTP)	ADAMTS13

В другом примере осуществления полипептид согласно изобретению может быть применен в способе повышения оказываемого субъекту полезного эффекта от терапии или терапевтического средства. Способ включает два этапа, которые, согласно настоящему изобретению, названы этапами (a) и (b).

Этап (a) включает введение субъекту полипептида согласно изобретению. Вводимое количество полипептида предпочтительно достаточно для расщепления по существу всех молекул IgG, присутствующих в плазме крови субъекта. Этап (b) включает последующее проведение указанной терапии у субъекта или введение субъекту терапевтического средства. Этапы (a) и (b) разделены промежутком времени, который предпочтительно достаточен для расщепления по существу всех молекул IgG, присутствующих в плазме крови субъекта. Обычно этот промежуток может составлять по меньшей мере 30 минут и максимально 21 сутки.

Терапевтическое средство, полезный эффект которого повышают, обычно представляет собой антитело, которое вводят для лечения рака или другого заболевания. Терапевтическое средство может представлять собой IVIg. В

контексте этого примера осуществления изобретение, в альтернативном варианте, может рассматриваться как предоставление способа лечения рака или другого заболевания у субъекта, где способ включает (а) введение субъекту полипептида согласно изобретению; и (b) последующее введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела, которое представляет собой терапию при раке или другом заболевании, и при этом:

- вводимое количество полипептида достаточно для расщепления по существу всех молекул IgG, присутствующих в плазме крови субъекта; и

- этапы (а) и (b) разделены промежутком времени, составляющим по меньшей мере 2 часа и не более 21 суток.

Другими словами, изобретение также относится к полипептиду, предназначенному для применения в таком способе лечения рака или другого заболевания. Изобретение также относится к применению агента при получении медикамента для лечения рака или другого заболевания таким способом. Раковое заболевание может представлять собой острую лимфобластическую лейкемию, острую миелоидную лейкемию, аденокарциному, связанные со СПИД раковые заболевания, связанную со СПИД лимфому, рак анального канала, рак аппендикса, астроцитому, детскую церебеллярную или церебральную базальноклеточную карциному, рак желчевыводящих путей, экстрагепатический рак, рак мочевого пузыря, рак костной ткани, остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому, глиому ствола головного мозга, рак головного мозга, опухоль головного мозга церебеллярную астроцитому, опухоль головного мозга церебральную астроцитому/злокачественную глиому, опухоль головного мозга эпендимому, опухоль головного мозга медуллобластому, опухоль головного мозга - супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, опухоль головного мозга глиому зрительных путей и глиому гипоталамуса, рак груди, аденомы/карциноиды бронхов, лимфому Беркитта, карциноидную опухоль, карциноидную опухоль желудочно-кишечную, карциному неизвестной этиологии, лимфому центральной нервной системы, церебеллярную астроцитому, церебральную астроцитому/злокачественную глиому, рак шейки матки, хроническую лимфоцитарную лейкемию, хроническую миелогенную лейкемию, хронические миелопролиферативные нарушения, рак толстой кишки, Т-клеточную лимфому кожи, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, рак эндометрия, эпендимому, рак пищевода, саркому Юинга семейства опухолей Юинга,

экстракраниальную эмбрионально-клеточную опухоль, детскую, экстрагонадную эмбрионально-клеточную опухоль, рак внепеченочного желчного протока, рак глаз, внутриглазную меланому, рак глаз, ретинобластому, рак желчного пузыря, желудочный рак (рак желудка), желудочно-кишечную карциноидную опухоль,

5 желудочно-кишечную стромальную опухоль (стромальную опухоль ЖКТ), эмбрионально-клеточную опухоль: экстракраниальную, экстрагонадную или яичников, гестационную трофобластическую опухоль, глиому ствола головного мозга, глиому, детскую церебральную астроцитому, глиому детскую зрительных путей и гипоталамуса, желудочный карциноид, волосатоклеточный лейкоз, рак

10 головы и шеи, рак сердца, печеночно-клеточный рак (рак печени), лимфому Ходжкина, гипофарингиальный рак, глиому гипоталамуса и зрительных путей, внутриглазную меланому, карциному островковых клеток (эндокринной ткани поджелудочной железы), саркому Капоши, рак почки (рак почечных клеток), рак гортани, лейкемии, лейкемию острую лимфобластическую (также называемую

15 острой лимфоцитарной лейкемией), лейкемию острую миелоидную (также называемую острой миелогенной лейкемией), лейкемию хроническую лимфоцитарную (также называемую хронической лимфоцитарной лейкемией), лейкемию хроническую миелогенную (также называемую хронической миелоидной лейкемией), лейкоз ворсистых клеток, рак губ и ротовой полости, липосаркому, рак

20 печени (первичный), рак легких, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, лимфомы, лимфому, связанную со СПИД, лимфому Беркитта, лимфому кожи Т-клеточную, лимфому Ходжкина, лимфомы, неходжкинские (по старой классификации – все лимфомы, за исключением лимфомы Ходжкина), лимфому первичную центральной нервной системы, макроглобулинемию Вальденстрема,

25 злокачественную фиброзную гистиоцитому костной ткани/остеосаркому, медуллобластому, меланому, меланому внутриглазную (глаза), карциному из клеток Меркеля, мезотелиому взрослых злокачественную, мезотелиому, метастатический плоскоклеточный рак шеи с бессимптомным возникновением, рак ротовых органов, синдром множественной эндокринной неоплазии, множественную

30 миелому/плазмоклеточную опухоль, фунгоидный микоз, миелодиспластические синдромы, миелодиспластические/миелопролиферативные заболевания, миелогенную лейкемию хроническую, миелоидную лейкемию острую взрослых, миелоидную лейкемию острую детского возраста, миелому, множественную (рак костного мозга), миелопролиферативные нарушения, рак носовой полости и

35 околоносовой пазухи, носоглоточную карциному, нейробластому, неходжкинскую лимфому, немелкоклеточный рак легких, рак ротовой полости, ротоглоточный рак,

остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому костной ткани, рак
 яичников, рак эпителия яичников (поверхностная эпителиально-стромальную
 опухоль), эмбрионально-клеточную опухоль яичников, опухоль яичников с низким
 злокачественным потенциалом, рак поджелудочной железы, рак островковых клеток
 5 поджелудочной железы, рак околоносовой пазухи и носовой полости, рак
 паращитовидных желез, рак полового члена, фарингеальный рак, феохромоцитому,
 астроцитому шишковидного тела, герминому шишковидного тела, пинеобластоме и
 супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, аденоме
 гипофиза, плазмноклеточную опухоль/множественную миелому, плеврорлегочную
 10 бластому, первичную лимфому центральной нервной системы, рак предстательной
 железы, рак прямой кишки, карциному почечных клеток (рак почки), рак почечной
 лоханки и уретры, переходноклеточный рак, ретинобластому, рабдомиосаркому, рак
 слюнной железы, саркому семейства опухолей Юинга, саркому Капоши, саркому
 мягких тканей, саркому матки, синдром Сезари, рак кожи (немеланоцитарный), рак
 15 кожи (меланома), карциному кожи, рак клеток Меркеля, мелкоклеточный рак легких,
 рак тонкого кишечника, саркому мягких тканей, плоскоклеточную карциному,
 плоскоклеточный рак шеи с бессимптомным первичным периодом метастатический,
 рак желудка, супратенториальную примитивную нейроэктодермальную опухоль, Т-
 клеточную лимфому, кожные раковые заболевания – см. фунгоидный микоз и
 20 синдром Сезари, рак яичка, рак горла, тимому, тимому и карциному вилочковой
 железы, рак щитовидной железы, рак щитовидной железы, переходноклеточный рак
 почечной лоханки и уретры, трофобластическую опухоль уретры и почечной
 лоханки, переходноклеточный рак уретры, рак эндометрия матки, саркому матки,
 вагинальный рак, глиому зрительных путей и гипоталамуса, рак вульвы,
 25 макроглобулинемию Вальденстрема и опухоль Вильмса (рак почки).

Предпочтительно рак представляет собой рак предстательной железы, рак
 груди, рак мочевого пузыря, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак
 поджелудочной железы, рак яичников, рак легких, рак шейки матки, рак эндометрия,
 рак почки (почечных клеток), рак пищевода, рак щитовидной железы, рак кожи,
 30 лимфому, меланому или лейкемию.

Антитело, вводимое в этапе (b), предпочтительно представляет собой
 специфический для опухоли антиген, связанный с одним или более перечисленных
 выше типов раковых заболеваний. Целевые мишени антитела, применяемого в
 способе, включают CD2, CD3, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD32, CD33, CD40,
 35 CD52, CD54, CD56, CD64, CD70, CD74, CD79, CD80, CD86, CD105, CD138, CD174,

CD205, CD227, CD326, CD340, MUC16, GPNMB, PSMA, Cripto, ED-B, TMEFF2, EphA2, EphB2, FAP, av интегрин, мезотелин, EGFR, METK-72, GD2, CA1X, 5T4, $\alpha\beta 7$ интегрин, Her2. Другими мишенями являются цитокины, такие как интерлейкины с IL-1 по IL-13, факторы некроза опухоли α и β , интерфероны α , β и γ , фактор роста опухоли бета (англ. tumor growth factor, сокр. TGF- β), фактор, стимулирующий колониобразование (англ. colony-stimulating factor, сокр. CSF) и гранулоцитарно-моноцитарный фактор, стимулирующий колониобразование (англ. granulocyte monocyte colony stimulating factor, сокр. GMCSF). См. публикацию Human Cytokines: Handbook for Basic & Clinical Research (Цитокины человека: Руководство по базовым и клиническим исследованиям) (Aggrawal с соавт.. Изд. Blackwell Scientific, Boston, MA 1991). Другим мишенями являются гормоны, ферменты и внутриклеточные и внеклеточные мессенджеры, такие как, аденилциклаза, гуанилциклаза и фосфолипаза C. Другими целевыми мишенями являются антигены лейкоцитов, такие как CD20 и CD33. Целевыми мишенями также могут являться лекарственные средства. Молекулами-мишенями могут являться молекулы организма человека, млекопитающего или бактерии. Другими мишенями являются антигены, такие как белки, гликопротеины и углеводы микробных патогенов, как вирусных, так и бактериальных, и опухолей. Другие мишени рассмотрены в документе US 4366241.

Антитело может быть присоединено непосредственно или опосредованно к цитотоксичной частице или к подходящему для обнаружения маркеру. Антитело может быть введено с помощью одного или более пути введения с применением одного или более из множества способов, известных в данной области техники. Путь и/или образ введения различается в зависимости от желаемых результатов. Предпочтительные пути введения антител включают внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, интраперитонеальный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, через инъекцию или вливание. Употребляемая в настоящем описании фраза "парентеральное введение" означает образ введения, отличный от энтерального и топического введения, который обычно представляет собой инъекцию. В альтернативном варианте антитело может быть введено непарентеральным образом, таким как топическое, эпидермальное (накожное) или мукозальное (через слизистую оболочку) введение. Также предпочтительным является местное (локальное) введение, включающее перитуморальное, околоопухолевое, внутриопухолевое, внутриочаговое введение, введение вблизи от очага поражения, внутриполостное вливание, внутрипузырное введение и ингаляционное введение.

Подходящая дозировка антитела согласно изобретению может быть определена опытным практикующим врачом. Реальные уровни дозирования антитела могут быть различными, и они могут быть выбраны таким образом, чтобы достичь такого количества активного ингредиента, которое приводит к получению требуемой ответной реакции на терапию у конкретного пациента при использовании конкретной композиции и конкретного образа введения, но при этом дозировка не является токсичной для пациента. Выбранный уровень дозирования зависит от множества фармакокинетических факторов, которые включают активность конкретного применяемого антитела, способ введения, продолжительность введения, скорость экскреции антитела, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, применяемые в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраст, пол, массу тела, состояние, общее состояние здоровья и анамнез пациента, подвергаемого лечению, и подобные факторы, хорошо известные в медицинской практике.

Подходящая дозировка антитела может составлять, например, от приблизительно 0,1 мкг/кг до приблизительно 100 мг/кг массы тела пациента, подвергаемого терапии. Например, подходящая дозировка может составлять от приблизительно 1 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг массы тела в сутки или от приблизительно 10 мкг/кг до приблизительно 5 мг/кг массы тела в сутки.

Схемы введения могут быть отрегулированы для получения оптимальной требуемой ответной реакции (например, ответной реакции на терапию). Например, может быть произведено одно болюсное введение, или этап (b) способа может включать введение нескольких отдельных доз в течение определенного периода времени, или дозировка может быть пропорционально снижена или повышена в соответствии с показаниями терапевтической ситуации, при условии, что требуемый промежуток времени между этапами (a) и (b) не превышен. Особенно предпочтительным для облегчения введения и получения одинаковых дозировок является изготовление парентеральных композиций в виде стандартных лекарственных форм. Согласно настоящему изобретению, стандартная лекарственная форма означает физически дискретные единицы, подходящие для однократного введения дозировки субъектам, получающим терапию; каждая стандартная лекарственная форма содержит заранее заданное количество активного соединения, которое, согласно оценке, должно оказывать желаемое терапевтическое действие, в комбинации с требуемым фармацевтическим носителем.

Антитело этапа (b) может быть введено в комбинации с химиотерапией или лучевой терапией. Способ может дополнительно включать введение дополнительного противоракового антитела или другого терапевтического средства, которое может быть введено вместе с антителом этапа (b) в одной композиции или в различных композициях в виде части комбинированной терапии. Например, антитело этапа (b) может быть введено до, после или совместно с другим агентом.

Антитело может представлять собой Абаговомаб, Абциксимаб, Актосумаб, Адалимумаб, Адекатумумаб, Афелимомаб, Афутузумаб, Алакизумаб пегол, ALD518, Алемтузумаб, Алирокумаб, Алтумомаб пентетат, Аматуксимаб, Анатумомаб мафенатокс, Анрукинзумаб, Аполизумаб, Аркитумомаб, Азелизумаб, Атинумаб, Атлизумаб (или тоцилизумаб), Атородимумаб, Бапинеузумаб, Базиликсимаб, Бавитиксимаб, Бектумомаб, Белимумаб, Бенрализумаб, Бертилимумаб, Безилесомаб, Бевацизумаб, Безлтоксумаб, Бициромаб, Бимагрумаб, Биватузумаб мертанзин, Блинатумомаб, Блосозумаб, Брентиксимаб ведотин, Бриакинумаб, Бродалумаб, Канакинумаб, Кантузумаб мертанзин, Кантузумаб равтанзин, Каплацизумаб, Капромаб пендетид, Карлумаб, Катумаксомаб, CC49, Цеделизумаб, Цертолизумаб пегол, Цетуксимаб, Ch.14.18, Цитатузумаб богатокс, Циксутумумаб, Клазакизумаб, Кленоликсимаб, Кливатузумаб тетракетан, Конатумумаб, Концизумаб, Кренезумаб, CR6261, Дацетузумаб, Даклизумаб, Далотузумаб, Даратумумаб, Демцизумаб, Деносумаб, Детумомаб, Дорлимумаб аритокс, Дроцитумаб, Дулиготумаб, Дупилумаб, Дусигитумаб, Экромексимаб, Экулизумаб, Эдобакомаб, Эдреколомаб, Эфализумаб, Эфунгумаб, Эллотузумаб Элсилимомаб, Энаватузумаб, Энлимумаб пегол, Энокизумаб, Энотикумаб, Энситуксимаб, Эпитумомаб цитуксетан, Эпратузумаб, Эрлизумаб, Эртумаксомаб, Этарацизумаб, Этролизумаб, Эволокумаб, Эксбивирумаб, Фанолесомаб, Фаралимомаб, Фарлетузумаб, Фасимумаб, FBT A05, Фелвизумаб, Фезакинумаб, Фиклатузумаб, Фигитумумаб, Фланвотумаб, Фонтолизумаб, Форалумаб, Форавирумаб, Фрезолимумаб, Фулранумаб, Футуксимаб, Галиксимаб, Ганитумаб, Гантенерумаб, Гавилимомаб, Гемтузумаб озогамидин, Гевокизумаб, Гирентуксимаб, Глембатумумаб ведотин, Голимумаб, Гомиликсимаб, GS6624, Ибализумаб, Ибритумомаб тиуксетан, Икрукумаб, Иговомаб, Имциромаб, Имгатузумаб, Инклакумаб, Индатуксимаб равтанзин, Инфликсимаб, Интетумумаб, Инолимумаб, Инотузумаб озогамидин, Ипилимумаб, Иратумумаб, Итолизумаб, Иксекизумаб, Келиксимаб, Лабетузумаб, Лампализумаб, Лебрикизумаб, Лемалесомаб, Лерделимумаб, Лексатумумаб, Либивирумаб, Лигелизумаб, Линтузумаб, Лирилумаб,

- Лоделцизумаб, Лорвотузумаб мертанзин, Лукатумумаб, Лумиликсимаб, Маратумумаб, Маслимомаб, Маврилимумаб, Матузумаб, Меролизумаб, Метелимумаб, Милатузумаб, Минретумомаб, Митумомаб, Могамулизумаб, Моролимумаб, Мотавизумаб, Моксетумомаб пазудотокс, Муромонаб-CD3,
- 5 Наколомаб тафенатокс, Намилумаб, Наптумомаб эстафенатокс, Нарнатумаб, Натализумаб, Небакумаб, Нецитумумаб, Нерелимомаб, Несвакумаб, Нимотузумаб, Ниволумаб, Нофетумомаб мерпентан, Обинутузумаб, Окаратузумаб, Окрелизумаб, Одулимомаб, Офатумумаб, Оларатумаб, Олокизумаб, Омализумаб, Онартузумаб, Опортузумаб монатокс, Ореговомаб, Ортикумаб, Отеликсизумаб, Окселумаб,
- 10 Озанезумаб, Озорализумаб, Пагибаксимаб, Паливизумаб, Панитумумаб, Панобакумаб, Парсатузумаб, Пасколизумаб, Патеклизумаб, Патритумаб, Пемтумомаб, Перакизумаб, Пертузумаб, Пекселизумаб, Пидилизумаб, Пинатузумаб ведотин, Пинтумомаб, Плакулумаб, Полатузумаб ведотин, Понезумаб, Приликсимаб, Притоксаксимаб, Притумумаб, PRO 140, Квилизумаб, Ракотумомаб,
- 15 Радретумаб, Рафивирумаб, Рамуцирумаб, Ранибизумаб, Раксибакумаб, Регавирумаб, Резлизумаб, Рилотумумаб, Ритуксимаб, Робатумумаб, Роледумаб, Ромосозумаб, Ронтализумаб, Ровелизумаб, Руплизумаб, Самализумаб, Сарилумаб, Сатумомаб пендетид, Секукинумаб, Серибантумаб, Сетоксаксимаб, Севирумаб, Сибротузумаб, Сифалимумаб, Силтуксимаб, Симтузумаб, Сиплизумаб, Сирукумаб,
- 20 Соланезумаб, Солитомаб, Сонепцизумаб, Сонтузумаб, Стамулумаб, Сулесомаб, Сувизумаб, Табалумаб, Такатузумаб тетраксетан, Тадоцизумаб, Тализумаб, Танезумаб, Таплитумомаб паптокс, Тефибазумаб, Телимомаб аритокс, Тенатумомаб, тенеликсимаб, Теплизумаб, Тепротумумаб, TGN1412, Тицилимумаб (или тремелимумаб), Тилдракизумаб, Тигатузумаб, TNX-650, Тоцилизумаб (или
- 25 атлизумаб), Торализумаб, Тозитумомаб, Тралокинумаб, Трастузумаб, TRBS07, Трегализумаб, Тремелимумаб, Тукотузумаб целмолейкин, Тувирумаб, Ублитуксимаб, Урелумаб, Уртоксазумаб, Устекинумаб, Ваталиксимаб, Вателизумаб, Ведолизумаб, Велтузумаб, Вепалимомаб, Весенкумаб, Визилизумаб, Волоциксимаб, Ворсетузумаб мафодотин, Вотумумаб, Залутумумаб, Занолимумаб,
- 30 Затуксимаб, Зиралимумаб или Золимомаб аритокс.

- Предпочтительные антитела включают Натализумаб, Ведолизумаб, Белимумаб, Атацисепт, Алефасепт, Отеликсизумаб, Теплизумаб, Ритуксимаб, Офатумумаб, Окрелизумаб, Эпратузумаб, Алемтузумаб, Абатасепт, Экулизамаб, Омализумаб, Канакинумаб, Меплизумаб, Реслизумаб, Тоцилизумаб, Устекинумаб,
- 35 Бриакинумаб, Этанерсепт, Инлфликсимаб, Адалимумаб, Цертолизумаб пегол,

Голимумаб, Трастузумаб, Гемтузумаб, Озогамицин, Ибритумомаб, Тиуксетан, Тоститумомаб, Цетуксимаб, Бевацизумаб, Панитумумаб, Деносумаб, Ипилимумаб, Брентуксимаб и Ведотин.

Терапия, полезный эффект которой повышается, обычно представляет собой
 5 трансплантацию органа. Орган может быть выбран из почки, печени, сердца, поджелудочной железы, легкого или тонкого кишечника. Субъект, получающий терапию, предпочтительно может быть сенсibilизирован или высоко сенсibilизирован. Термин “сенсibilизированный” означает, что у субъекта
 10 human major histocompatibility, сокращенно MHC) человека (также называемые лейкоцитами антигенов человека (англ. human leukocyte antigen, сокращенно HLA)). Анти-HLA антитела происходят из аллогенно сенсibilизированных В-клеток и обычно присутствуют в организмах пациентов, ранее подвергшихся сенсibilизации в результате переливания крови, предыдущей трансплантации или беременности
 15 (Jordan *с соавт.*, 2003).

Наличие сенсibilизации у потенциального реципиента трансплантата может быть определено любым подходящим способом. Например, для определения того, сенсibilизирован ли реципиент, может быть применено испытание на панель-
 20 реактивные антитела (англ. Panel Reactive Antibody, сокр. PRA). Обычно, если PRA показатель пациента более 30%, то это означает, что пациент имеет “высокий иммунологический риск” или “сенсibilизирован”. В альтернативном варианте может быть выполнен анализ крови на перекрестную совместимость, в котором образец крови потенциального донора трансплантата смешивают с образцом крови предполагаемого реципиента. Положительный анализ на перекрестную
 25 совместимость означает, что реципиент имеет антитела, которые реагируют с образцом донора, что означает, что реципиент сенсibilизирован, и трансплантацию проводить не следует. Анализы на перекрестную совместимость обычно проводят как последнюю проверку непосредственно перед трансплантацией.

30 Присутствие высокого титра антител к MHC антигенам потенциального донора (т.е. донор-специфических антител (англ. donor specific antibodies, сокр. DSA)) является прямым противопоказанием к трансплантации из-за риска острого отторжения, опосредуемого антителами. Коротко говоря, сенсibilизация к антигенам MHC донора затрудняет поиск подходящего донора. Положительный

анализ на перекрестную совместимость является однозначным препятствием для трансплантации. Поскольку приблизительно одна треть пациентов, ожидающих трансплантации почки, сенсibilизированы и 15% из них – высоко сенсibilизированы, это приводит к созданию очереди из пациентов, ожидающих трансплантации. В США среднее время ожидания в списке на трансплантацию почки в 2001–2002 гг. составило 1329 суток для пациентов с показателем в испытании с панель-реактивными антителами (PRA), составляющим 0–9%, 1920 суток для пациентов с показателем PRA 10–79% и 3649 суток для пациентов с показателем PRA 80% или более (база данных OPTN, 2011).

Одной из признанных стратегий преодоления DSA барьера является плазмообмен или иммуноабсорбция, часто в комбинации с, например, внутривенным введением гамма-глобулина (IVIg) или Ритуксимаба для понижения уровней DSA до уровня, при котором может рассматриваться трансплантация (Jordan с соавт., 2004; Montgomery с соавт., 2000; Vo с соавт., 2008a; Vo с соавт., 2008b). Однако, недостатками плазмообмена, иммуноабсорбции и терапии IVIg являются низкая эффективность и соблюдение жесткого плана, поскольку они включают повторную (многократную) терапию в течение длительного периода времени. Как только орган умершего донора становится доступным, его нужно пересадить в течение часа, поскольку продление критического времени хранения трансплантата на холоде является одним из наиболее значительных факторов риска для отсроченной функции трансплантата и отторжения аллотрансплантата при трансплантации почки (Ojo с соавт., 1997).

Напротив, способ согласно настоящему изобретению позволяет быстро, временно и безопасно удалить DSA в организме потенциального реципиента трансплантата. Введение полипептида согласно изобретению непосредственно перед трансплантацией позволяет эффективно устранять сенсibilизацию у высоко сенсibilизированного пациента, что позволяет проводить трансплантацию и избежать острого отторжения, опосредуемого антителами. Однократная дозировка полипептида перед трансплантацией позволит проводить трансплантацию у тысяч пациентов, имеющих донор-специфические IgG антитела.

В альтернативном варианте в контексте этого примера осуществления способ может рассматриваться как способ лечения функциональной недостаточности органа у субъекта, где способ включает (а) введение субъекту

полипептида согласно изобретению и (b) последующую трансплантацию субъекту замещающего органа, причем:

- вводимое количество полипептида достаточно для расщепления по существу всех молекул IgG, присутствующих в плазме крови субъекта; и

5 - этапы (a) и (b) разделены промежутком времени, составляющим по меньшей мере 2 часа и не более 21 суток.

Другими словами, этот пример осуществления может рассматриваться как способ профилактики отторжения трансплантированного органа у субъекта, в частности, профилактики опосредуемого антителами острого отторжения трансплантата, где способ включает введение субъекту полипептида согласно изобретению за по меньшей мере 2 часа и не более чем за 21 сутки до трансплантации органа, и вводимое количество полипептида достаточно для расщепления по существу всех молекул IgG, присутствующих в плазме крови субъекта. Изобретение также относится к применению полипептида согласно изобретению в таком способе лечения функциональной недостаточности органа или профилактики отторжения трансплантата, в частности, опосредуемого антителами острого отторжения трансплантата. Изобретение также относится к применению полипептида согласно изобретению при получении медикамента для лечения функциональной недостаточности органа или для предотвращения отторжения трансплантата посредством этого способа. В данном примере осуществления способ согласно изобретению может дополнительно включать этап, проводимый во время или непосредственно до трансплантации, который включает индукционную супрессию Т-клеток и/или В-клеток в организме пациента. Обычно индукционная супрессия может включать введение эффективного количества агента, который убивает или ингибирует Т-клетки, и/или введение эффективного количества агента, который убивает или ингибирует В-клетки. Агенты, которые убивают или ингибируют Т-клетки, включают Муромонаб, Базиликсимаб, Даслизумаб, антитело к антиtimoцитарному глобулину (англ. antithymocyte globulin, сокращенно ATG) и лимфоцитарный иммуноглобулин, препарат антиtimoцитарного глобулина ATGAM® (от англ. anti-thymocyte globulin preparation). Известно, что Ритуксимаб убивает или ингибирует В-клетки.

Описание примеров осуществления изобретения

- Если не указано иное, применяемые способы представляют собой стандартные биохимические методики и методики молекулярной биологии. Примеры подходящих руководств, содержащих описание методологии, включают Sambrook с соавт., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (1989); Ausubel с соавт.,
- 5 *Current Protocols in Molecular Biology* (1995), John Wiley and Sons, Inc.

Пример 1

Конструирование, получение и очистка полипептидов

- Производили анализ зрелой молекулы IdeS и идентифицировали области, подходящие для мутации. В некоторых случаях для оценки вероятного исхода
- 10 мутации применяли анализ *in silico*. После подбора последовательности каждого полипептида, кДНК, кодирующую каждый полипептид, получали на устройстве GeneCust, Luxembourg, либо с помощью сайт-направленной мутации исходной последовательности, либо синтезом, зависящим от количества вводимых мутаций. кДНК были секвенированы и перенесены в экспрессионный вектор рЕТ9а
- 15 (Novagene) в рамке с С-терминальной 6xHis меткой, присоединенной к С-концевому участку коротким глициновым линкером (3xGly). Для улучшения бактериальной экспрессии добавляли N-терминальный метионин. Плазмиды трансформировали (тепловой шок) в *E. coli* BL21 (DE3) (Stratagene) и высевали на планшеты с арагозой LB (Luria-Bertani), содержащей 30 мг/мл канамицина. Отбирали отдельные колонии,
- 20 и в течение ночи производили культивирование (3 мл среды LB) при 37°C, 250 об./мин. На следующий день готовили глициновые растворы, и в 10 мл ТВ-среды (от англ. Terrific Broth), дополненной 30 мг/мл канамицина и антивспенивателя, производили инокуляцию культивированной в течение ночи культуры и выращивали до достижения оптической плотности OD (от англ. optical density) 0,6-0,8 (37°C, 300
- 25 об./мин.). На этом этапе добавляли IPTG (изопропил-бета-D-1-тиогалактопиранозид, 1 mM), и культивирование продолжали в течение 1 часа, после чего бактерии собирали центрифугированием. Гранулы промывали в ФСБ (фосфатно-солевом буфере) и замораживали при -20°C. Для лизиса бактерий применяли протокол замораживания-оттаивания (три цикла замораживания/оттаивания, каждый в 1 мл
- 30 ФСБ), и белки очищали, применяя центрифужные колонки, заранее заполненные Ni-NTA (где NTA означает нитрилуксусную кислоту, от англ. nitrilotriacetic acid) (Pierce). После очистки элюированные белки подвергали активации в 10 mM ДТТ (дтитотреитол), и затем производили обмен буфера (3 объема ФСБ в MWCO 9K Millipore cfd устройства). Чистоту и стабильность каждого белка оценивали способом

электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (англ. sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoreses, сокращенно SDS-PAGE) в устройстве из нержавеющей стали для проведения SDS-PAGE анализа 12% Mini-PROTEAN®TGX™ precast gel (Biorad).

- 5 В приведенной ниже Таблице указаны изменения, внесенные в каждый испытуемый полипептид по сравнению со зрелым IdeS, не включающие дополнительный N-терминальный метионин и гистидиновую метку. Таким образом, последовательность каждого полипептида, используемого в экспериментах согласно настоящему изобретению, обычно включает последовательность SEQ ID NO, указанную в таблице, плюс дополнительный N-терминальный метионин и гистидиновую метку, присоединенную к C-терминальному концу через короткий глициновый линкер.

Внутренняя ссылка	Модификации по сравнению с IdeS (положения соответствуют SEQ ID NO: 1)	SEQ ID NO
pCART152	N130R	3
pCART183	N130K, E198R, D216N	4
pCART184	N130R, E198K, D216N, S302K	5
pCART185	E119R, D216N, T244D	6
pCART186	E119K, D142R, D216N, T244E, S302K	7
pCART187	K115E, D216N, K241E, E245K, D316K, D333K	8
pCART188	E119K, N130R, D142R, D216N, K241S, T244E, E245N, S302K	9
pCART189	E119K, N130R, D142R, E198K, D216N, T244E	10
pCART190	K115E, N130R, E198K, D216N, K241E, E245K, D333K	11
pCART209	N336_N339del (удаление NQTN)	12
pCART125	D30_T49del (удаление DSFSANQEIR YSEVTPYHVT)	13
pCART213	D30_T49del (удаление DSFSANQEIR YSEVTPYHVT), N130K, D216N	14
pCART214	D30_T49del (удаление DSFSANQEIR YSEVTPYHVT), K115E, N130K, E139K, D216N, K241E, E245K, D333K	15
pCART228	S31_T49replZ (замена SEQ ID NO: 35 с SEQ ID NO: 36), K115E, N130K, E139K, D216N, K241E, E245K, D333K	16

В качестве контрольного варианта с помощью рассмотренной выше методики была получена версия IdeS. Эта версия IdeS включает последовательность SEQ ID NO: 2 плюс дополнительный N-терминальный метионин и his метку, присоединенную к С-терминальному концу через короткий глициновый линкер.

- 5 Согласно настоящему изобретению, эта версия IdeS может быть названа pCART124. Последовательность pCART124 приведена ниже:

MDSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTFN
GKDDLLCGAAMETKNMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTK
NHQLDSKLF EYFKEKAFPYLS TKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPR
10 GGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINL
WGADFD SNGNLKAIYVTDS SDSNASIGMKKYFVG VNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLF
TLSTGQDSWNQTNGGGHHHHHH (SEQ ID NO: 17)

- В соответствии со стандартом GMP (англ. Good Manufacturing Practice, т.е. стандарт Надлежащей производственной практики) с помощью автоматизированной
15 многостадийной хроматографической очистки также независимо был получен IdeS, не имеющий метки, который применяли в качестве дополнительного контроля. Согласно настоящему изобретению, этот полипептид называется BX1001865.

- Последовательность кДНК, используемая для получения каждого из
испытываемых полипептидов и pCART124, приведена ниже. Каждая кДНК
20 последовательность имеет на 3' конце кодон для N-терминального метионина (ATG) и на 5' конце перед терминирующим кодоном (TAA) имеет кодоны для глицинового линкера и гистидиновой метки.

pCART124 (IdeS; SEQ ID NO: 20)

- ATGGAMETKTTTTCTGCTAATCAAGAGATMETKATATTCGGAAGTAACACCTTATCAC
25 GTTACTTCCGTTTGGACCAAAGGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAA
GATGTTTTTACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTATGATATTACCAAAACATT
CAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTG
GTGGTTTCGATCAAACAAAGACCAAATTAACGTTATTTGGAAGAGCATCCAGAAAAG
CAAAAAATAAACTTCAATGGCGAACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCGACACTA
30 AAAACCACCAGCMETKAMETKTAAATTATTTGAATATTTTAAAGAAAAAGCTTTCCCTT
ATCTATCTACTAAACACCMETKGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTCAATTA
CGGCTACCGCCTMETKTCTAACTAACACGGTCCAACGCCAGTAAAAGAAGGMETKT
AAAGATCCCCGAGGTGGTATTTTTGACGCCGTATTTACAAGAGGTGATCAAAGTAAG

CTATTGACAAGTCGTCATGATTTTAAAGAAAAAATCTCAAAGAAATCAGTGATCTCAT
 TAAGAAAGAGTTAACCGAAGGCAAGGCTCMETKGCCTATCACACACCTACGCTAACG
 TACGCATCAACCATGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAACC
 TTAAAGCTATTTATGTAACAGACTCTGAMETKTAATGCATCTATTGGTATGAAGAAATA
 5 CTTTGTTGGTGTTAATTCCGCTGGAAAAGMETKCTATTTCTGCTAAAGAAATAAAGA
 AGATAATAMETKGTGCTCAAGTACMETKGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAGAME
 TKTTGGAATCAGACCAATGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART152 (SEQ ID NO: 21)

ATGGAMETKTTTTTCTGCTAATCAAGAGATMETKATATTCGGAAGTAACACCTTATCAC
 10 GTTACTTCCGTTTGGACCAAAGGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAA
 GATGTTTTTTCACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTATGATATTACCAAAACATT
 CAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTG
 GTGGTTCGATCAAAACAAAGACCAAATTAACGTTATTTGGAAGAGCATCCAGAAAAG
 CAAAAAATAAACTTCCGTGGCGAACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCGACACTA
 15 AAAACCACCAGCMETKAMETKTAAATTATTTGAATATTTTAAAGAAAAAGCTTTCCCTT
 ATCTATCTACTAAACACCMETKGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTCAATTA
 CGGCTACCGCCTMETKTCTAACTAACCACGGTCCAACGCCAGTAAAAGAAGGMETKT
 AAAGATCCCCGAGGTGGTATTTTTGACGCCGTATTTACAAGAGGTGATCAAAGTAAG
 CTATTGACAAGTCGTCATGATTTTAAAGAAAAAATCTCAAAGAAATCAGTGATCTCAT
 20 TAAGAAAGAGTTAACCGAAGGCAAGGCTCMETKGCCTATCACACACCTACGCTAACG
 TACGCATCAACCATGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAACC
 TTAAAGCTATTTATGTAACAGACTCTGAMETKTAATGCATCTATTGGTATGAAGAAATA
 CTTTGTTGGTGTTAATTCCGCTGGAAAAGMETKCTATTTCTGCTAAAGAAATAAAGA
 AGATAATAMETKGTGCTCAAGTACMETKGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAGAME
 25 TKTTGGAATCAGACCAATGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART183 (SEQ ID NO: 22)

ATGGAMETKTTTTTCTGCTAATCAAGAGATMETKATATTCGGAAGTAACACCTTATCAC
 GTTACTTCCGTTTGGACCAAAGGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAA
 GATGTTTTTTCACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTATGATATTACCAAAACATT
 30 CAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTG
 GTGGTTCGATCAAAACAAAGACCAAATTAACGTTATTTGGAAGAGCATCCAGAAAAG
 CAAAAAATAAACTTCAAAGGCGAACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCGACACTA
 AAAACCACCAGCMETKAMETKTAAATTATTTGAATATTTTAAAGAAAAAGCTTTCCCTT
 ATCTATCTACTAAACACCMETKGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTCAATTA

CGGCTACCGCCTMETKTCTAACTAACCACGGTCCAACGCCAGTAAACGTGGMETKT
 AAAGATCCCCGAGGTGGTATTTTTGACGCCGTATTTACAAGAGGTAACCAAAGTAAG
 CTATTGACAAGTCGTCATGATTTTAAAGAAAAAATCTCAAAGAAATCAGTGATCTCAT
 TAAGAAAGAGTTAACCGAAGGCAAGGCTCMETKGCCTATCACACACCTACGCTAACG
 5 TACGCATCAACCATGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAACC
 TTAAAGCTATTTATGTAACAGACTCTGAMETKTAATGCATCTATTGGTATGAAGAAATA
 CTTTGTTGGTGTTAATTCCGCTGGAAAAGMETKCTATTTCTGCTAAAGAAATAAAGA
 AGATAAMETKGTGCTCAAGTACMETKGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAGAME
 TKTTGGAATCAGACCAATGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

10 pCART184 (SEQ ID NO: 23)

ATGGAMETKTTTTCTGCTAATCAAGAGATMETKATATTCGGAAGTAACACCTTATCAC
 GTTACTTCCGTTTGGACCAAAGGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAA
 GATGTTTTTACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTATGATATTACCAAACATT
 CAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTG
 15 GTGGTTTCGATCAAACAAAGACCAAATTAACGTTATTTGGAAGAGCATCCAGAAAAG
 CAAAAATAAACTTCCGTGGCGAACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCGACACTA
 AAAACCACCAGCMETKAMETKTAAATTATTTGAATATTTTAAAGAAAAAGCTTTCCCTT
 ATCTATCTACTAAACACCMETKGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTCAATTA
 CGGCTACCGCCTMETKTCTAACTAACCACGGTCCAACGCCAGTAAAAAAGGMETKT
 20 AAAGATCCCCGAGGTGGTATTTTTGACGCCGTATTTACAAGAGGTAACCAAAGTAAG
 CTATTGACAAGTCGTCATGATTTTAAAGAAAAAATCTCAAAGAAATCAGTGATCTCAT
 TAAGAAAGAGTTAACCGAAGGCAAGGCTCMETKGCCTATCACACACCTACGCTAACG
 TACGCATCAACCATGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAACC
 TTAAAGCTATTTATGTAACAGACTCTGAMETKTAATGCATCTATTGGTATGAAGAAATA
 25 CTTTGTTGGTGTTAATAAAGCTGGAAAAGMETKCTATTTCTGCTAAAGAAATAAAGAA
 GATAAMETKGTGCTCAAGTACMETKGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAGAMET
 KTTGGAATCAGACCAATGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART185 (SEQ ID NO: 24)

ATGGAMETKTTTTCTGCTAATCAAGAGATMETKATATTCGGAAGTAACACCTTATCAC
 30 GTTACTTCCGTTTGGACCAAAGGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAA
 GATGTTTTTACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTATGATATTACCAAACATT
 CAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTG
 GTGGTTTCGATCAAACAAAGACCAAATTAACGTTATTTGCGTGAGCATCCAGAAAAG
 CAAAAATAAACTTCAATGGCGAACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCGACACTA

AAAACCACCAGCMETKAMETKTAAATTATTTGAATATTTTAAAGAAAAAGCTTTCCCTT
 ATCTATCTACTAAACACCMETKGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTCAATTA
 CGGCTACCGCCTMETKTCTAACTAACCACGGTCCAACGCCAGTAAAAGAAGGMETKT
 AAAGATCCCCGAGGTGGTATTTTTGACGCCGTATTTACAAGAGGTAACCAAAGTAAG
 5 CTATTGACAAGTCGTCATGATTTTTAAAGAAAAAAATCTCAAAGAAATCAGTGATCTCAT
 TAAGAAAGAGTMETKATGAAGGCAAGGCTCMETKGCCTATCACACACCTACGCTAAC
 GTACGCATCAACCATGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAAC
 CTTAAAGCTATTTATGTAACAGACTCTGAMETKTAATGCATCTATTGGTATGAAGAAAT
 ACTTTGTTGGTGTTAATTCCGCTGGAAAAGMETKCTATTTCTGCTAAAGAAATAAAG
 10 AAGATAATAMETKGTGCTCAAGTACMETKGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAGAM
 ETKTTGGAATCAGACCAATGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART186 (SEQ ID NO: 25)

ATGGAMETKTTTTCTGCTAATCAAGAGATMETKATATTCGGAAGTAACACCTTATCAC
 GTTACTTCCGTTTGGACCAAAGGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAA
 15 GATGTTTTTCACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTATGATATTACCAAACATT
 CAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTG
 GTGGTTTCGATCAAAACAAAGACCAAATTAACGTTATTTGAAAGAGCATCCAGAAAAG
 CAAAAAATAAACTTCAATGGCGAACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCCGTACTA
 AAAACCACCAGCMETKAMETKTAAATTATTTGAATATTTTAAAGAAAAAGCTTTCCCTT
 20 ATCTATCTACTAAACACCMETKGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTCAATTA
 CGGCTACCGCCTMETKTCTAACTAACCACGGTCCAACGCCAGTAAAAGAAGGMETKT
 AAAGATCCCCGAGGTGGTATTTTTGACGCCGTATTTACAAGAGGTAACCAAAGTAAG
 CTATTGACAAGTCGTCATGATTTTTAAAGAAAAAAATCTCAAAGAAATCAGTGATCTCAT
 TAAGAAAGAGTMETKAAGAAGGCAAGGCTCMETKGCCTATCACACACCTACGCTAAC
 25 GTACGCATCAACCATGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAAC
 CTTAAAGCTATTTATGTAACAGACTCTGAMETKTAATGCATCTATTGGTATGAAGAAAT
 ACTTTGTTGGTGTTAATAAAGCTGGAAAAGMETKCTATTTCTGCTAAAGAAATAAAGA
 AGATAATAMETKGTGCTCAAGTACMETKGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAGAME
 TKTTGGAATCAGACCAATGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

30 pCART187 (SEQ ID NO: 26)

ATGGAMETKTTTTCTGCTAATCAAGAGATMETKATATTCGGAAGTAACACCTTATCAC
 GTTACTTCCGTTTGGACCAAAGGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAA
 GATGTTTTTCACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTATGATATTACCAAACATT
 CAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTG

GTGGTTCGATCAAAACAAAGACCAAATTGAACGTTATTTGGAAGAGCATCCAGAAAA
 GCAAAAAATAAACTTCAATGGCGAACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCGACACT
 AAAAACCACCAGCMETKAMETKTAAATTATTTGAATATTTTAAAGAAAAAGCTTTCCCT
 TATCTATCTACTAAACACCMETKGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTCATT
 5 ACGGCTACCGCCTMETKTCTAACTAACCACGGTCCAACGCCAGTAAAAGAAGGMETK
 TAAAGATCCCCGAGGTGGTATTTTTTGACGCCGTATTTACAAGAGGTAACCAAAGTAA
 GCTATTGACAAGTCGTCATGATTTTAAAGAAAAAAATCTCAAAGAAATCAGTGATCTC
 ATTAAGGAAGAGTTAACCAAAGGCAAGGCTCMETKGCCTATCACACACCTACGCTAA
 CGTACGCATCAACCATGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAA
 10 CCTTAAAGCTATTTATGTAACAGACTCTGAMETKTAATGCATCTATTGGTATGAAGAAA
 TACTTTGTTGGTGTTAATTCCGCTGGAAAAGMETKCTATTTCTGCTAAAGAAATAAAG
 AAAAAAATAMETKGTGCTCAAGTACMETKGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAAAA
 AGTTGGAATCAGACCAATGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART188 (SEQ ID NO: 27)

15 ATGGAMETKTTTTCTGCTAATCAAGAGATMETKATATTCGGAAGTAACACCTTATCAC
 GTTACTTCCGTTTGGACCAAAGGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAA
 GATGTTTTTTCACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTATGATATTACCAAACATT
 CAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTG
 GTGGTTCGATCAAAACAAAGACCAAATTAACGTTATTTGAAAGAGCATCCAGAAAAG
 20 CAAAAAATAAACTTCCGTGGCGAACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCCGTACTA
 AAAACCACCAGCMETKAMETKTAAATTATTTGAATATTTTAAAGAAAAAGCTTTCCCTT
 ATCTATCTACTAAACACCMETKGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTCAATTA
 CGGCTACCGCCTMETKTCTAACTAACCACGGTCCAACGCCAGTAAAAGAAGGMETKT
 AAAGATCCCCGAGGTGGTATTTTTTGACGCCGTATTTACAAGAGGTAACCAAAGTAAG
 25 CTATTGACAAGTCGTCATGATTTTAAAGAAAAAAATCTCAAAGAAATCAGTGATCTCAT
 TAAGAGTGAGTMETKAAAACGGCAAGGCTCMETKGCCTATCACACACCTACGCTAAC
 GTACGCATCAACCATGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAAC
 CTTAAAGCTATTTATGTAACAGACTCTGAMETKTAATGCATCTATTGGTATGAAGAAAT
 ACTTTGTTGGTGTTAATAAAGCTGGAAAAGMETKCTATTTCTGCTAAAGAAATAAAGA
 30 AGATAATAMETKGTGCTCAAGTACMETKGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAGAME
 TKTTGGAATCAGACCAATGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART189 (SEQ ID NO: 28)

ATGGAMETKTTTTCTGCTAATCAAGAGATMETKATATTCGGAAGTAACACCTTATCAC
 GTTACTTCCGTTTGGACCAAAGGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAA

GATGTTTTTCACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTATGATATTACCAAAACATT
 CAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTG
 GTGGTTCGATCAAAACAAAGACCAAATTAACGTTATTTGAAAGAGCATCCAGAAAAG
 CAAAAAATAAACTTCCGTGGCGAACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCCGTACTA
 5 AAAACCACCAGCMETKAMETKTAAATTATTTGAATATTTTAAAGAAAAAGCTTTCCCTT
 ATCTATCTACTAAACACCMETKGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTCAATTA
 CGGCTACCGCCTMETKTCTAACTAACCACGGTCCAACGCCAGTAAAAAAGGMETKT
 AAAGATCCCCGAGGTGGTATTTTTGACGCCGTATTTACAAGAGGTAACCAAAGTAAG
 CTATTGACAAGTCGTCATGATTTTAAAGAAAAAAATCTCAAAGAAATCAGTGATCTCAT
 10 TAAGAAAGAGTMETKAAGAAGGCAAGGCTCMETKGCCTATCACACACCTACGCTAAC
 GTACGCATCAACCATGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAAC
 CTTAAAGCTATTTATGTAACAGACTCTGAMETKTAATGCATCTATTGGTATGAAGAAAT
 ACTTTGTTGGTGTTAATTCCGCTGGAAAAGMETKCTATTTCTGCTAAAGAAATAAAAG
 AAGATAATAMETKGTGCTCAAGTACMETKGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAGAM
 15 ETKTTGGAATCAGACCAATGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART190 (SEQ ID NO: 29)

ATGGAMETKTTTTTCTGCTAATCAAGAGATMETKATATTCGGAAGTAACACCTTATCAC
 GTTACTTCCGTTTGGACCAAAGGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAA
 GATGTTTTTCACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTATGATATTACCAAAACATT
 20 CAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTG
 GTGGTTCGATCAAAACAAAGACCAAATTAACGTTATTTGGAAGAGCATCCAGAAAA
 GCAAAAAATAAACTTCCGTGGCGAACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCGACAC
 TAAAAACCACCAGCMETKAMETKTAAATTATTTGAATATTTTAAAGAAAAAGCTTTCCC
 TTATCTATCTACTAAACACCMETKGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTCAAT
 25 AACGGCTACCGCCTMETKTCTAACTAACCACGGTCCAACGCCAGTAAAAAAGGMET
 KTAAAGATCCCCGAGGTGGTATTTTTGACGCCGTATTTACAAGAGGTAACCAAAGTAA
 GCTATTGACAAGTCGTCATGATTTTAAAGAAAAAAATCTCAAAGAAATCAGTGATCTC
 ATTAAGGAAGAGTTAACCAAAGGCAAGGCTCMETKGCCTATCACACACCTACGCTAA
 CGTACGCATCAACCATGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAA
 30 CCTTAAAGCTATTTATGTAACAGACTCTGAMETKTAATGCATCTATTGGTATGAAGAAA
 TACTTTGTTGGTGTTAATTCCGCTGGAAAAGMETKCTATTTCTGCTAAAGAAATAAAAG
 AAGATAATAMETKGTGCTCAAGTACMETKGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAAAA
 AGTTGGAATCAGACCAATGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART209 (SEQ ID NO: 30)

ATGGAMETKTTTTCTGCTAATCAAGAGATMETKATATTCGGAAGTAACACCTTATCAC
 GTTACTTCCGTTTGGACCAAAGGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAA
 GATGTTTTTACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTATGATATTACCAAAACATT
 CAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTG
 5 GTGGTTCGATCAAAACAAAGACCAAATTAACGTTATTTGGAAGAGCATCCAGAAAAG
 CAAAAAATAAACTTCAATGGCGAACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCGACACTA
 AAAACCACCAGCMETKAMETKTAAATTATTTGAATATTTTAAAGAAAAAGCTTTCCCTT
 ATCTATCTACTAAACACCMETKGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTCAATTA
 CGGCTACCGCCTMETKTCTAACTAACCACGGTCCAACGCCAGTAAAAGAAGGMETKT
 10 AAAGATCCCCGAGGTGGTATTTTTGACGCCGTATTTACAAGAGGTGATCAAAGTAAG
 CTATTGACAAGTCGTCATGATTTTAAAGAAAAAATCTCAAAGAAATCAGTGATCTCAT
 TAAGAAAGAGTTAACCGAAGGCAAGGCTCMETKGCCTATCACACACCTACGCTAACG
 TACGCATCAACCATGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAACC
 TTAAAGCTATTTATGTAACAGACTCTGAMETKTAATGCATCTATTGGTATGAAGAAATA
 15 CTTTGTTGGTGTTAATTCCGCTGGAAAAGMETKCTATTTCTGCTAAAGAAATAAAAGA
 AGATAATAMETKGTGCTCAAGTACMETKGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAGAME
 TKTTGGGGTGGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART125 (SEQ ID NO: 31)

ATGTCCGTTTGGACCAAAGGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAAGAT
 20 GTTTTTACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTATGATATTACCAAAACATTCAA
 TGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTGGTG
 GTTCGATCAAAACAAAGACCAAATTAACGTTATTTGGAAGAGCATCCAGAAAAGCAA
 AAAATAAACTTCAATGGCGAACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCGACACTAAAA
 ACCACCAGCMETKAMETKTAAATTATTTGAATATTTTAAAGAAAAAGCTTTCCCTTATC
 25 TATCTACTAAACACCMETKGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTCAATTAACGG
 CTACCGCCTMETKTCTAACTAACCACGGTCCAACGCCAGTAAAAGAAGGMETKTAAA
 GATCCCCGAGGTGGTATTTTTGACGCCGTATTTACAAGAGGTGATCAAAGTAAGCTA
 TTGACAAGTCGTCATGATTTTAAAGAAAAAATCTCAAAGAAATCAGTGATCTCATTAA
 GAAAGAGTTAACCGAAGGCAAGGCTCMETKGCCTATCACACACCTACGCTAACGTAC
 30 GCATCAACCATGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAACCTTAA
 AGCTATTTATGTAACAGACTCTGAMETKTAATGCATCTATTGGTATGAAGAAATACTTT
 GTTGGTGTTAATTCCGCTGGAAAAGMETKCTATTTCTGCTAAAGAAATAAAAGAAGAT
 AATAMETKGTGCTCAAGTACMETKGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAGAMETKTT
 GGAATCAGACCAATGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART213 (SEQ ID NO: 32)

ATGTCCGTTTGGACCAAAGGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAAGAT
 GTTTTTACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTATGATATTACCAAACATTCAA
 TGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTGGTG
 5 GTTCGATCAAAACAAAGACCAAATTAACGTTATTTGGAAGAGCATCCAGAAAAGCAA
 AAAATAAACTTCAAAGGCGAACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCGACACTAAAA
 ACCACCAGCMETKAMETKTAAATTATTTGAATATTTTAAAGAAAAAGCTTTCCCTTATC
 TATCTACTAAACACCMETKGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTTATTAACGG
 CTACCGCCTMETKTCTAACTAACCACGGTCCAACGCCAGTAAAAGAAGGMETKTAAA
 10 GATCCCCGAGGTGGTATTTTTGACGCCGTATTTACAAGAGGTAACCAAAGTAAGCTA
 TTGACAAGTCGTCATGATTTTTAAAGAAAAAAATCTCAAAGAAATCAGTGATCTCATTAA
 GAAAGAGTTAACCGAAGGCAAGGCTCMETKGCCTATCACACACCTACGCTAACGTAC
 GCATCAACCATGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAACCTTAA
 AGCTATTTATGTAACAGACTCTGAMETKTAATGCATCTATTGGTATGAAGAAATACTTT
 15 GTTGGTGTTAATTCCGCTGGAAAAGMETKCTATTTCTGCTAAAGAAATAAAAGAAGAT
 AATAMETKGTGCTCAAGTACMETKGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAGAMETKTT
 GGAATCAGACCAATGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART214 (SEQ ID NO: 33)

ATGTCCGTTTGGACCAAAGGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAAGAT
 20 GTTTTTACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTATGATATTACCAAACATTCAA
 TGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTGGTG
 GTTCGATCAAAACAAAGACCAAATTGAACGTTATTTGGAAGAGCATCCAGAAAAGCAA
 AAAATAAACTTCAAAGGCGAACAGATGTTTGACGTAAAAAAGCTATCGACACTAAAA
 ACCACCAGCMETKAMETKTAAATTATTTGAATATTTTAAAGAAAAAGCTTTCCCTTATC
 25 TATCTACTAAACACCMETKGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTTATTAACGG
 CTACCGCCTMETKTCTAACTAACCACGGTCCAACGCCAGTAAAAGAAGGMETKTAAA
 GATCCCCGAGGTGGTATTTTTGACGCCGTATTTACAAGAGGTAACCAAAGTAAGCTA
 TTGACAAGTCGTCATGATTTTTAAAGAAAAAAATCTCAAAGAAATCAGTGATCTCATTAA
 GGAAGAGTTAACCAAAGGCAAGGCTCMETKGCCTATCACACACCTACGCTAACGTAC
 30 GCATCAACCATGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAACCTTAA
 AGCTATTTATGTAACAGACTCTGAMETKTAATGCATCTATTGGTATGAAGAAATACTTT
 GTTGGTGTTAATTCCGCTGGAAAAGMETKCTATTTCTGCTAAAGAAATAAAAGAAGAT
 AATAMETKGTGCTCAAGTACMETKGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAAAAAGTTG
 GAATCAGACCAATGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART228 (SEQ ID NO: 34)

ATGGACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAAGCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAG
 ATCACTTCCGTTTGGACCAAAGGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAA
 GATGTTTTTTCACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTATGATATTACCAAAACATT
 5 CAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTG
 GTGGTTTCGATCAAAACAAAGACCAAATTGAACGTTATTTGGAAGAGCATCCAGAAAA
 GCAAAAAATAAACTTCAAAGGCGAACAGATGTTTGACGTAAAAAAGCTATCGACACT
 AAAAACACCAGCMETKAMETKTAATTTATTTGAATATTTTAAAGAAAAAGCTTTCCCT
 TATCTATCTACTAAACACCMETKGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTCATTA
 10 ACGGCTACCGCCTMETKTCTAACTAACCACGGTCCAACGCCAGTAAAAGAAGGMETK
 TAAAGATCCCCGAGGTGGTATTTTTGACGCCGTATTTACAAGAGGTAACCAAAGTAA
 GCTATTGACAAGTCGTCATGATTTTAAAGAAAAAATCTCAAAGAAATCAGTGATCTC
 ATTAAGGAAGAGTTAACCAAAGGCAAGGCTCMETKGCCTATCACACACCTACGCTAA
 CGTACGCATCAACCATGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAA
 15 CCTTAAAGCTATTTATGTAACAGACTCTGAMETKTAATGCATCTATTGGTATGAAGAAA
 TACTTTGTTGGTGTTAATTCCGCTGGAAAAGMETKCTATTTCTGCTAAAGAAATAAAG
 AAGATAATAMETKGTGCTCAAGTACMETKGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAAAA
 AGTTGGAATCAGACCAATGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

Пример 2

20 Оценка активности (эффективности расщепления IgG)

ELISA

Ферментативную активность определяли с помощью анализа активности, проводимого на основе анализа ELISA. Принцип ELISA состоит в следующем: на лунки планшета для множественного титрования наносят мишени для антитела (BSA), затем в лунках инкубируют различные концентрации полипептида IgG-цистеиновой протеазы (испытуемого или контрольного) с анти-BSA антителом, после чего с помощью идентифицирующего антитела определяют количество анти-BSA антитела, связанного с лунками. Чем выше концентрация заданного полипептида IgG-цистеиновой протеазы в лунке, тем меньше интактного анти-BSA полипептида будет закреплено в лунке, что приводит к получению более низкого уровня сигнала. Аналогично, полипептид IgG-цистеиновой протеазы с более высокой эффективностью дает более низкий уровень сигнала, чем менее эффективный полипептид IgG-цистеиновой протеазы в той же концентрации.

Эталонный IdeS BX1001865 (белок для сравнения) был приготовлен в виде серии титрования при поэтапном разведении 1:2 от концентрации 320 нМ до 0,16 нМ, на основании чего была построена стандартная калибровочная кривая для анализа. Результаты, полученные при анализе множества известных концентраций каждого из испытуемых полипептидов, сравнивали с линейным участком калибровочной кривой, определяя концентрацию эталонного IdeS, при которой достигается такая же активность. Делением известной концентрации каждого полипептида на определяемую эквивалентную концентрацию эталонного IdeS, полученную из кривой, определяли показатель, который представлял собой кратность изменения активности по сравнению с эталонным IdeS BX1001865. Например, если действие 5 нМ испытуемого полипептида приводит к результату, эквивалентному действию 10 нМ эталонного IdeS по калибровочной кривой, то активность испытуемого полипептида в 2 раза превышает активность эталонного IdeS BX1001865. Средний показатель кратности активности по сравнению с эталонным IdeS BX1001865 вычисляют из всех показателей, полученных при различных концентрациях для каждого из испытуемых полипептидов, при условии, что они находятся на линейном участке калибровочной кривой. Этот средний показатель затем сравнивают со средним показателем, полученным для рCART124 эталонного IdeS, который включали в каждый планшет для сравнения результатов, полученных на различных планшетах. Средний показатель для рCART124 делят на средний показатель, полученный для испытуемого полипептида, получая "отношение рCART124", которое по существу представляет собой кратность активности каждого полипептида по отношению к активности IdeS. Отношение рCART124 затем может быть визуально представлено с помощью гистограммы.

Краткое описание лабораторного протокола: На лунки планшетов для множественного титрования наносили BSA (10 мг/мл) и выдерживали в течение ночи, затем промывали с ФСБ-Т (фосфатно-солевым буфером с добавлением Tween) и блокировали в течение 1 часа добавлением 2% желатина из шкуры рыб в ФСБ. Полипептид IdeS BX1001865 получали в виде серии титрования при поэтапном разведении 1:2 ФСБ, содержащим 0,1% желатина, от концентрации 320 нМ до 0,16 нМ. Затем подготавливали испытуемые полипептиды и контрольный рCART124 в концентрациях 15, 7,5, 3,75 и 1,9 нМ в ФСБ, содержащем 0,1% желатина. В каждую лунку, содержащую в качестве субстрата 50 мкл анти-BSA кролика (ACRIS, #R1048P, 10 нМ), добавляли 50 мкл образца полипептида. Планшеты подвергали инкубации при комнатной температуре в течение 1 часа и

затем промывали ФСБ-Т. В качестве идентифицирующего антитела добавляли биотинилированное анти-кроличье Fc-специфическое антитело козы (30000-кратное разбавление) и инкубировали в течение 30 минут. Планшет промывали, добавляли разведенную в 40000 раз пероксидазу SA хрена (англ. SA-Horseradish Peroxidase, сокращенно HRP; Pierce) и инкубировали в течение 30 минут. Планшеты промывали и проявляли с помощью ТМБ (тетраметилбензидинового) однокомпонентного хромогенного субстрата для HRP в течение 7 минут, останавливая добавлением 0,5 М H₂SO₄. Поглощение (OD, т.е. оптическую плотность, от англ. optical density) измеряли при λ равном 450 нм. Для каждого испытуемого полипептида и для pCART124 определяли средние показатели кратности активности по сравнению с BX1001865. Затем, как описано выше для каждого испытуемого полипептида вычисляли “отношение pCART124”.

Величины “отношения pCART124” для pCART152, 183, 184, 185, 186, 187, 189 и 190 представлены на Фиг. 1 вместе с результатом для pCART124. Все примеры представленных полипептидов согласно изобретению показывают по меньшей мере 1,5-кратное повышение активности по сравнению с контрольным IdeS (pCART124). pCART152, 183, 184, 188, 189 и 190 проявляются гораздо более высокую активность; так, активность pCART189 в 8,0 раз превышает активность контрольного вещества. Каждый из представленных шести испытуемых полипептидов включает модификацию N130R/K. Полипептид pCART125 исследовали отдельно, и было показано, что его активность сравнима с активностью IdeS (данные не показаны).

Визуальное представление картин расщепления IgG

Эффективность различных pCART полипептидов дополнительно оценивали посредством визуального представления на SDS-PAGE продуктов расщепления, получаемых в серии титрования каждого полипептида на различных субстратах. Для определения эффективности в чистом IgG субстрате, для IgG1 применяли Адалимумаб (Humira), и для IgG2 применяли Деносумаб (XGEVA). Для определения эффективности в более сложном физиологическом окружении, некоторые полипептиды также титровали в IVIg (Octagam). Это позволяло оценить влияние нейтрализующих анти-IdeS антител на активность полипептида. Картины расщепления, полученные для каждого полипептида, сравнивали с картинками расщепления, полученными при использовании IdeS (BX1001865 и pCART124) на том же субстрате. Применяли следующий протокол:

Для испытаний с чистым IgG, каждый испытуемый полипептид или контрольное вещество поэтапно разводили в отношении 1:3 в серии титрования от концентрации 6,7 мг/мл до 0,04 нг/мл в ФСБ, содержащем 0,05% BSA в качестве поддерживающего белка. 25 мкл каждой концентрации переносили в планшеты для

5 множественного титрования, и начинали реакцию расщепления, добавляя 25 мкл либо препарата Humiga, либо препарата XGEVA (2 мг/мл). Таким образом, каждую из исходных концентраций полипептида в лунке разбавляли в отношении 1:2, получая серию титрования с концентрациями от 3,3 мг/мл до 0,02 нг/мл.

Для испытаний с IVIg каждый испытуемый полипептид или контрольное

10 вещество поэтапно разводили в отношении 1:2 в серии титрования от концентрации 30 мг/мл до 0,015 нг/мл в ФСБ, содержащем 0,05% BSA в качестве поддерживающего белка. 25 мкл каждой концентрации переносили в планшеты для множественного титрования, и начинали реакцию расщепления, добавляя 25 мкл 10 мг/мл IVIg. Таким образом, каждую из исходных концентраций полипептида в лунке

15 разбавляли в отношении 1:2, получая титруемую серию концентраций от 15 мг/мл до 0,0075 нг/мл.

Планшеты инкубировали при 37°C в течение 1,5 часов. Образцы смешивали в отношении 1:4 с 2X SDS загрузочным буфером и нагревали при 92°C в течение 5 минут. 10 мкл загружали на полиакриламидный гель (15-луночные 4-20% Mini-PROTEAN®TGX™, заранее подготовленный гель (Biorad)), информацию с которого

20 считывали согласно стандартным протоколам.

На Фиг. 2 представлены картины расщепления, полученные на субстрате IgG1 (адалимуаб) при использовании pCART183, 184, 185, 186, 187, 189 и 190 в сравнении с IdeS (pCART124). Концентрации полипептидов составляли от 3,33

25 мг/мл (дорожка 1) до 0,02 нг/мл (дорожка 12) при поэтапном серийном разведении в отношении 1:3. Действие интактного адалимуаба (без фермента) показано слева (дорожка C).

Стрелками справа показаны различные продукты расщепления, получаемые из IgG. Стрелка 1: Интактный IgG; стрелка 2: scIgG (однократно расщепленный

30 (англ. single cleaved) IgG – получен при расщеплении первой тяжелой цепи IgG); стрелка 3: фрагмент F(ab')₂ (получен при расщеплении второй тяжелой цепи IgG). Вертикальные линии были добавлены для облегчения сравнения при проведении расщепления первой тяжелой цепи IgG, при котором интактный IgG превращается в scIgG (между дорожками 6 и 7), и при проведении расщепления второй тяжелой

цепи IgG, при котором sclgG превращается во фрагмент $F(ab')_2$ (между дорожками 2 и 3).

В частности, каждый из pCART183, 184, 188, 189 и 190 проявляет повышенную эффективность при расщеплении второй тяжелой цепи IgG, что приводит к образованию более интенсивной полосы $F(ab')_2$ (стрелка 3) и менее интенсивной полосы sclgG (стрелка 2) по сравнению с действием pCART124 в тех же концентрациях. Различие начинает проявляться с концентрации 0,12 мг/мл (дорожка 4), но становится еще более очевидным при концентрации 0,37 мг/мл (дорожка 3). Таким образом, в целом на Фиг. 2 показано, что замена на положительно заряженную аминокислоту в положении 130 (N130R/K) повышает эффективность расщепления второй тяжелой цепи IgG (pCART183, 184, 188, 189 и 190).

На Фиг. 3 представлены картины расщепления, полученные на субстрате IgG1 при использовании pCART152 и pCART209 в сравнении с обоими контрольными веществами IdeS (pCART124 и BX1001865). Концентрации фермента составляют от 3,33 мг/мл (дорожка 1) до 0,02 нг/мл (дорожка 12) при поэтапном серийном разведении в отношении 1:3. Стрелками справа показаны различные продукты расщепления, получаемые из IgG. Стрелка 1: Интактный IgG; стрелка 2: sclgG (однократно расщепленный IgG – получен при расщеплении первой тяжелой цепи IgG); стрелка 3: фрагмент $F(ab')_2$ (получен при расщеплении второй тяжелой цепи IgG); стрелка 4: фрагмент Fc; (*) обозначает белок-носитель (BSA) в буфере титрования. Вертикальные линии были добавлены для облегчения сравнения при проведении расщепления первой тяжелой цепи IgG, при котором интактный IgG превращается в sclgG (между дорожками 6 и 7), и при проведении расщепления второй тяжелой цепи IgG, при котором sclgG превращается во фрагмент $F(ab')_2$ (между дорожками 2 и 3).

Как pCART152, так и pCART209 проявляет повышенную эффективность расщепления второй тяжелой цепи IgG, что приводит к образованию более интенсивных полос $F(ab')_2$ (стрелка 3) и меньшему количеству остающегося sclgG (стрелка 2) по сравнению с действием pCART124 и BX1001865 (стрелки 3 и 2) в той же концентрации. Это различие становится заметным при концентрациях фермента, составляющих 41 нг/мл (дорожка 5) и становится еще более очевидным при концентрациях 0,12 мг/мл и 0,37 мг/мл (дорожки 4 и 3). Как pCART152, так и pCART209 эффективно расщепляет вторую тяжелую цепь IgG, и их эффективность

приблизительно в 3 раза превышает эффективность первоначального IdeS (BX1001865 и pCART124), т.е. использование 0,37 мг/мл pCART152 и pCART209 (дорожка 3) дает тот же результат, что и применение 1,11 мг/мл BX100186 и pCART124 (дорожка 2).

- 5 pCART152 и pCART209 также проявляют повышенную эффективность расщепления первой тяжелой цепи IgG, что приводит к образованию более интенсивных полос sclgG (стрелка 2) и менее интенсивной полосы IgG (стрелка 1) по сравнению с исходным IdeS (BX1001865 и pCART124) в той же концентрации. При действии pCART152 эту эффективность можно отметить при концентрации фермента 1,5 нг/мл (дорожка 8), но она становится еще более очевидной при концентрации 4,6 нг/мл (дорожка 7). pCART209 также проявляет повышенную эффективность расщепления, приблизительно в 3 раза превышающую эффективность исходного IdeS (BX1001865 и pCART124), при расщеплении первой тяжелой цепи, т.е. действие 4,6 нг/мл (дорожка 7) pCART209 дает аналогичный результат, что и действие 14 нг/мл (дорожка 6) BX1001865 и pCART124.

Таким образом, из Фиг. 3 видно, что замещение одной аминокислоты в положении 130 (N130K в pCART152) повышает эффективность расщепления главным образом второй тяжелой цепи, а также, до некоторой степени эффективность расщепления первой тяжелой цепи IgG1, и что удаление последовательности NQTN (pCART209) повышает эффективность расщепления и первой, и второй тяжелых цепей IgG1 в 3 раза.

На Фиг. 4 представлены картины расщепления, полученные на субстрате IgG2 при использовании pCART152 и pCART209 в сравнении с обоими контрольными IdeS (pCART124 и BX1001865). Концентрации фермента составляют от 3,33 мг/мл (дорожка 1) до 0,02 нг/мл (дорожка 12) при поэтапном серийном разведении в отношении 1:3. Стрелками справа показаны различные продукты расщепления, получаемые из IgG. Стрелка 1: Интактный IgG; стрелка 2: sclgG (однократно расщепленный IgG – получен при расщеплении первой тяжелой цепи IgG); стрелка 3: фрагмент F(ab')₂ (получен при расщеплении второй тяжелой цепи IgG); стрелка 4: фрагмент Fc; (*) обозначает белок-носитель (BSA) в буфере титрования. Вертикальные линии были добавлены для облегчения сравнения при проведении расщепления первой тяжелой цепи IgG, при котором интактный IgG превращается в sclgG (между дорожками 6 и 7), и при проведении расщепления

второй тяжелой цепи IgG, при котором sclgG превращается во фрагмент F(ab')₂ (между дорожками 2 и 3).

Как pCART152, так и pCART209 проявляют повышенную эффективность расщепления второй тяжелой цепи IgG, что приводит к образованию более интенсивных полос F(ab')₂ (стрелка 3) и менее интенсивных полос sclgG (стрелка 2) по сравнению с действием pCART124 и BX1001865 (стрелка 3 и 2) в тех же концентрациях. Это различие становится заметным при концентрациях фермента, составляющих 0,37 мг/мл (дорожка 3), но становится еще более очевидным при концентрации 1,11 мг/мл (дорожка 2).

Результаты, полученные при использовании pCART209, дорожка 6 (концентрация фермента 14 нг/мл), показывают, что по сравнению с BX1001865 и pCART124 pCART209 также обладает большей эффективностью при расщеплении первой тяжелой цепи IgG. Это приводит к появлению менее интенсивной полосы интактного IgG (стрелка 1) и более интенсивной полосы sclgG (стрелка 2), поскольку большая часть белка была превращена в sclgG.

Так, на Фиг. 4 показано, что замещение одной аминокислоты в положении 130 (N130K в pCART152) повышает эффективность расщепления, главным образом, второй тяжелой цепи IgG2, и что удаление последовательности NQTN (pCART209) повышает эффективность расщепления как первой, так и второй тяжелых цепей IgG2.

В целом, можно отметить, что эффективность испытываемых полипептидов в расщеплении IgG1 и IgG2 обычно выше, чем у IdeS. Особенно эффективными оказались pCART152, 183, 184, 188, 189 и 190, что согласуется с результатами ELISA. Оказалось, что повышенная эффективность этих полипептидов связана, главным образом, с расщеплением второй тяжелой цепи IgG.

Ожидается, что замена G в положении 131 на положительно заряженную аминокислоту даст результаты, аналогичные замещению N130R/K. Положения 130 и 131 находятся в петле бета-«шпильчатой» структуры, занимающей положения с 126 по 136 в SEQ ID NO: 1. На основании результатов, полученных согласно настоящему изобретению, ожидается, что замена на положительные аминокислоты в любом из положений 130 и 131 или в обоих этих положениях повышает активность IgG-цистеиновой протеазы.

Оценка иммуногенности

Анализ конкурентного связывания ADA

Этот анализ основан на конкуренции между испытуемым полипептидом и IdeS за связывание с анти-IdeS антителом. Предварительная инкубация
5 испытуемого фермента и IVIg приводит к связыванию анти-IdeS антител с
испытуемым ферментом pCART. После этого смесь IVIg-фермент наносят на
планшет, на который нанесено IdeS, и любое анти-IdeS антитело, не связанное с
испытуемым полипептидом, будет связываться с IdeS, иммобилизованным на
планшете. Для ингибирования расщепления IgG, все инкубации связывания были
10 произведены в присутствии 2 мМ йодуксусной кислоты (IHAc) и при высокой
концентрации соли, что допускало существование связей только при высоком
сродстве. После промывки в качестве детектора применяют биотинилированное
козье-антитело к человеческому $F(ab')_2$ -специфическому фрагменту $F(ab')_2$. При
плохом распознавании испытуемого полипептида анти-IdeS антителами,
15 находящимися в IVIg, происходит интенсивное связывание анти-IdeS антител,
находящихся в IVIg, с планшетом, что проявляется в виде интенсивного сигнала.
Хорошее распознавание испытуемого полипептида анти-IdeS антителами,
находящимися в IVIg, дает обратный результат. Ниже представлен подробный
протокол.

20 Эталонный IdeS (BX1001865) наносили на планшеты для множественного
титрования (5 мг/мл) и выдерживали в течение ночи, затем промывали ФСБ-Т и в
течение 1 часа блокировали добавлением 2% BSA в ФСБ, дополненном 2 мМ IHAc и
1 М NaCl. С помощью поэтапных разбавлений испытуемого полипептида и 20 мг/мл
IVIg в ФСБ, дополненном 0,1% BSA, 2 мМ IHAc и 1 М NaCl, был подготовлен
25 планшет для смешивания. Планшет для смешивания инкубировали в течение 1 часа
при комнатной температуре на устройстве для встряхивания. По завершении
инкубации, блокирующий раствор удаляли с планшета, покрытого IdeS, и 50 мкл
каждой смеси переносили с планшета для смешивания в лунки планшета с
нанесенным покрытием. После инкубации в течение 1 часа при комнатной
30 температуре на устройстве для встряхивания, планшет промывали ФСБ-Т и
добавляли детектор, биотинилированное козье антитело к человеческому $F(ab')_2$ -
специфическому фрагменту $F(ab')_2$ (20000-кратное разбавление). После инкубации в
течение 30 минут планшет промывали, добавляли разбавленный в 40000 раз SA-
HRP (Pierce) и инкубировали в течение 30 минут. Планшет промывали и проявляли

с помощью ТМБ однокомпонентного хромогенного субстрата для HRP в течение 7 минут и останавливали добавлением 0,5 М H₂SO₄. Поглощение (OD) измеряли при λ равном 450 нм. Результаты инвертировали (получая значение 1/OD) и представляли в виде отношения в сравнении с pCART124 (1/(испытуемый полипептид/pCART124)) для визуальной демонстрации на гистограммах.

Результаты, полученные при использовании pCART183, 184, 185, 186, 187, 189 и 190, представлены на Фиг. 5. Результаты, полученные при использовании pCART125, представлены на Фиг. 6. Все испытуемые полипептиды проявляют некоторое снижение распознавания анти-IdeS антитела по сравнению с IdeS, обычно составляющее по меньшей мере 10%. В частности, pCART185, 186 и 187 проявляют большее снижение распознавания, составляющее приблизительно 40% по сравнению с IdeS. Снижение распознавания, проявляемое pCART125, составляет приблизительно 60%.

Краткие выводы

Все испытуемые полипептиды проявляют повышенную активность и/или пониженную иммуногенность по сравнению с IdeS.

Пример 4

Оценка активности

Активность в испытании ELISA

Для оценки способности к расщеплению человеческих IgG1 и IgG2 были проведены два анализа активности на основе анализа ELISA. В одном анализе оценивали расщепление IgG1, а в другом – расщепление IgG2. Для различных испытуемых полипептидов IgG-цистеиновой протеазы были вычислены значения EC50 (концентрации полумаксимального эффекта). Принцип анализов состоял в следующем: на лунки планшета для множественного титрования наносили F(ab)₂-фрагмент, нацеленный на человеческие IgG антитела, специфично на область Fab. Затем титруемые концентрации полипептида IgG-цистеиновой протеазы (испытуемого или контрольного) инкубировали в лунках вместе с человеческим IgG1 антителом (Humira) или человеческим IgG2 антителом (XGEVA). Количество интактного или однократно расщепленного человеческого IgG (Humira или XGEVA), связанного с лунками, измеряли с помощью идентифицирующего антитела, направленного на человеческий IgG специфично на Fc часть антитела. Чем выше

концентрация заданного полипептида IgG-цистеиновой протеазы в лунке, тем меньше интактного человеческого IgG антитела будет связано с лункой, что приводит к снижению интенсивности сигнала. Аналогично, действие более активного полипептида, представляющего собой IgG-цистеиновую протеазу, будет приводить к созданию более слабого сигнала, чем действие менее активного полипептида, представляющего собой IgG-цистеиновую протеазу, в той же концентрации. В обоих анализах, т.е. при добавлении IgG1 (Humira) и IgG2 (XGEVA), были построены кривые “дозировка титрования-ответ” для контрольного IdeS (pCART124) и всех испытуемых полипептидов IgG-цистеиновой протеазы. Для каждого испытуемого варианта также были вычислены значения EC50, которые представляют собой концентрации полипептида, при которых достигается 50% от его максимального эффекта при втором расщеплении молекулы IgG, т.е. концентрации, при которых половина IgG оказывается полностью расщепленной. Чем ниже значение EC50, тем выше эффективность IgG-цистеиновой протеазы. Расщепление первой тяжелой цепи IgG, IgG до sIgG, в этом анализе не наблюдается, поскольку в нем все еще присутствует Fc-часть IgG, которая может быть обнаружена Fc-специфическим идентифицирующим антителом (Фиг. 13).

Краткое описание лабораторного протокола: На лунки планшетов для множественного титрования наносили козье антитело к человеческому F(ab')₂-специфическому фрагменту F(ab')₂ (0,5 мг/мл) (Jackson #109-006-097) и выдерживали в течение ночи (от +2 до 8°C), затем промывали с ФСБ плюс 0,05% Tween 20 (ФСБ-Т) и производили блокировку выдерживанием в 0,45% рыбьего желатина в фосфатно-солевом буферном растворе с добавлением Твин (Tween) (ФСБ-Т) (блокирующий буфер) в течение 45-120 минут при комнатной температуре. Контрольный IdeS (pCART124) и испытуемые полипептиды IgG-цистеиновой протеазы были приготовлены в виде серии титрования поэтапным разбавлением 1:4 блокирующим буфером с исходной концентрацией 80 мг/мл. В лунки добавляли равные объемы (25 мкл), содержащие 0,5 мг/мл человеческого IgG1 (Humira) и титруемое количество полипептида IgG-цистеиновой протеазы, инкубировали в течение 2 часов при встряхивании и регулируемой температуре, составляющей 37°C, и затем промывали ФСБ-Т. Биотинилированное анти-человеческое IgG Fc-специфическое антитело мыши (m-a-hIgG Bio II, Lot: C0013-ZC43C, Southern Biotech) (600 нг/мл) смешивали с Strep-sulfo (200 нг/мл) и добавляли в планшеты для множественного титрования. Планшеты герметизировали алюминиевой пленкой и инкубировали при +25°C в течение 1 часа при встряхивании. Затем планшеты

промывали ФСБ-Т, и в каждую лунку добавляли 150 мкл разбавленного в 2 раза буфера Т для считывания (MSD read buffer Т, номер по каталогу R92TC-2). Планшеты сразу же считывали на считывателе планшетов марки MSD (Meso Scale Discovery) QuickPlex SQ 120, Модель 1300.

- 5 Эффективность анализов визуализировали на геле: Анализ проводили, как рассмотрено в Примере 2 для расщепления IgG1 (Humira), IgG2 (XGEVA), а также для расщепления объединенного человеческого IgG IVIg (Octagam).

Результаты

Активность по данным ELISA

- 10 Полученные в анализах активности для испытуемых IgG цистеиновых протеаз кривые дозировка-ответ представлены на Фиг. 7 (расщепление IgG1) и Фиг. 8 (расщепление IgG2). В этом испытании полипептиды согласно изобретению pCART125, 213 и 214 проявляли повышенную по сравнению с контролем IdeS pCART124 активность и имели пониженные величины EC50 (Таблица 1) в опытах
- 15 расщепления тяжелых цепей IgG1 (Фиг. 7) и IgG2 (Фиг. 8); при этом, кратность повышения активности при расщеплении IgG1 составила: 1,5 для pCART125, 2,2 для pCART214 и 3,0 для pCART213. При расщеплении IgG2 (Фиг. 8) кратность повышения активности в сравнении с pCART124 (IdeS) составила 1,6 для pCART125, 2,1 для pCART214 и 3,5 для pCART213.

- 20 Визуализация результатов анализов эффективности на геле

- Визуализация результатов расщепления IgG1 (Фиг. 9A) и IgG2 (Фиг. 9B) на геле ясно показывает, что расщепление первой и второй тяжелых цепей (вертикальными линиями на фигурах отмечено расщепление первой и второй
- 25 тяжелых цепей под действием BX1001865 и расщепление под действием pCART124). Звездочкой (*) на фигурах отмечено приблизительное значение EC50, т.е. концентрации, при которой 50% IgG однократно расщеплено (scIgG) и 50% полностью расщеплено ($F(ab')_2$). Данные, полученные на геле, представлены в Таблице 2 (расщепление IgG1) и Таблице 3 (расщепление IgG2). Концентрация IgG-цистеиновой протеазы, необходимая для расщепления первой тяжелой цепи IgG1
- 30 (Humira) приблизительно одинакова для всех испытуемых полипептидов и составляет 1,5 нг/мл для BX1001865 и pCART124 (IdeS контроль), pCART125, 213 и 214 (Фиг. 9A). При расщеплении второй тяжелой цепи IgG1 требуется приблизительно 120 нг/мл IdeS, pCART125 и 214 для получения на геле

доминантной полосы $F(ab')_2$ и меньше приблизительно на один этап титрования, 40 нг/мл, для pCART213 (Фиг. 9A). Визуальное представление расщепления IgG2 (XGEVA) на Фиг. 9B показывает, что все испытуемые полипептиды, BX1001865, pCART124, 125, 213 и 214, проявляют приблизительно одинаковую эффективность, и при этом 14 нг/мл требуется для расщепления первой тяжелой цепи IgG и образования scliG2 и приблизительно 370 нг/мл для образования фрагментов $F(ab')_2$ (Таблица 3). В другой серии экспериментов по исследованию эффективности pCART228 испытывали в присутствии Humira (IgG1) и XGEVA (IgG2), сравнивая с BX1001865 и pCART124, применяемыми как контроль IdeS (Фиг. 10A и 10B, Таблица 4). В этих экспериментах для контрольных веществ (BX1001865 и pCART124) требуется концентрация, приблизительно на один этап титрования превышающая концентрации, применяемые для получения результатов, представленных на Фиг. 9 и в Таблице 3; небольшие различия между экспериментами могут наблюдаться из-за различий в обращении с образцами и точности лабораторного оборудования при титровании серии разбавления образцов. Для надежности сравнения, расщепление под действием pCART228 следует сравнивать с расщеплением под действием контрольных IdeS в том же эксперименте. При расщеплении IgG1 и IgG2 под действием pCART228 и контрольных IdeS наблюдались очень похожие картины расщепления IgG (Фиг. 10A и B), но с приблизительно 3-х кратным (один этап титрования), более эффективным расщеплением второй тяжелой IgG цепи IgG1 под действием pCART228 (Фиг. 10A), при требуемой концентрации составляющей 120 нг/мл вместо 370 нг/мл, требуемой для IdeS (Таблица 4).

Полипептиды IgG-цистеиновой протеазы pCART125, 213 и 214 также титровали в объединенном человеческом IgG, IVIg (Octagam), применяя IdeS (BX1001865 и pCART124) в качестве контрольных веществ (Фиг. 11). Необходимые концентрации всех испытуемых полипептидов составляли 1,5 мг/мл для расщепления первой тяжелой цепи IgG и приблизительно 6 мг/мл для расщепления второй цепи (Фиг. 11 и Таблица 5). Расщепление IVIg под действием pCART228 исследовали в более широком диапазоне титрования по сравнению с испытуемыми вариантами, представленными на Фиг. 11, при разведении 1:2, начиная с концентрации 30 мг/мл (Фиг. 12). Такую же эффективность обнаруживали при использовании IdeS (BX1001865 и pCART124) и pCART228 (Фиг. 12), который в концентрации 1,9 мг/мл вызывал образование scliG, а в концентрации 7,5 мг/мл вызывал образование фрагментов $F(ab')_2$ (Таблица 6), в тех же этапах титрования, что и pCART125, 213 и 214 (Фиг. 11 и Таблица 5).

Краткое описание графических материалов Примера 4

Фиг. 7: Кривые титрования при расщеплении IgG1 (Humira) различными полипептидами IgG-цистеиновой протеазы.

5 Фиг. 8: Кривые титрования при расщеплении IgG2 (XGEVA) различными полипептидами IgG-цистеиновой протеазы.

Фиг. 9: Анализ расщепления IgG способом SDS-PAGE с использованием титруемых (разбавление 1:3, начиная с концентрации 3300 нг/мл) количеств pCART125, 213 и 214 и с использованием BX1001865 и pCART124 (исходный IdeS) в качестве контрольных веществ в том же эксперименте по расщеплению. А: расщепление Humira (IgG1) и В: расщепление XGEVA (IgG2). Вертикальными линиями отмечены концентрации IdeS (BX1001865 и pCART124), необходимые для расщепления первой и второй тяжелых цепей IgG (при котором количество расщепленного продукта превышает количество нерасщепленного продукта). Звездочкой (*) на фигурах представлено приблизительное значение EC50 в этом эксперименте.

10

15

Фиг. 10: Анализ расщепления IgG способом SDS-PAGE с использованием титруемых (разбавление 1:3, начиная с концентрации 3300 нг/мл) количеств pCART228 с использованием BX1001865 и pCART124 (исходный IdeS) в качестве контрольных веществ в том же эксперименте по расщеплению. А: расщепление Humira (IgG1) и В: расщепление XGEVA (IgG2). Вертикальными линиями отмечены концентрации IdeS (BX1001865 и pCART124), необходимые для расщепления первой и второй тяжелых цепей IgG (при котором количество расщепленного продукта превышает количество нерасщепленного продукта).

20

Фиг. 11: Анализ расщепления IVIg способом SDS-PAGE с использованием титруемых (разбавление 1:2, начиная с концентрации 6 мг/мл) количеств испытуемых полипептидов IgG-цистеиновой протеазы и IdeS (BX1001865 и pCART124) в качестве контроля в том же эксперименте по расщеплению.

25

Фиг. 12: Анализ расщепления IVIg способом SDS-PAGE с использованием титруемых количеств (разбавление 1:2, начиная с концентрации 30 мг/мл) pCART228 с применением IdeS (BX1001865 и pCART124) в качестве контроля в том же эксперименте по расщеплению.

30

Фиг. 13: Схематичное представление расщепления иммуноглобулинов полипептидами согласно изобретению. Ферментативное расщепление IgG проводят в два этапа. Сначала проводят расщепление тяжелой цепи интактного IgG, получая однократно расщепленный IgG (sclgG). Затем разрезается следующая тяжелая цепь IgG, и высвобождается Fc-часть. Fc-часть все еще связана с Fab-частью молекулы sclgG, и поскольку в анализе активности ELISA идентифицирующее антитело распознает Fc-часть молекулы IgG, то в этом анализе невозможно отличить целый IgG от sclgG.

Обсуждение и заключение

Более низкие значения EC₅₀, полученные в анализе ELISA определения активности pCART125, 213 и 214, указывают на то, что эти полипептиды обладают более высокой активностью при расщеплении второй тяжелой цепи IgG (от sclgG до F(ab')₂) как IgG1, так и IgG2 по сравнению с pCART124 (исходный IdeS). При визуализации расщепления IgG на геле видно разрезание первой тяжелой цепи (от IgG до sclgG), которое нельзя измерить в анализе ELISA определения активности с использованием Fc-специфического идентифицирующего антитела. Большая часть опосредуемых Fc действий IgG в однократно расщепленной молекуле теряются (данные не показаны), что является очень важным в клинической ситуации, в которой основные усилия сфокусированы на обезвреживании патогенных молекул IgG. pCART228 обладает той же эффективностью в расщеплении IgG1 и IgG2, что и исходный IdeS. Это важно в тех случаях, когда необходима IgG цистеиновая протеаза такого же молекулярного размера, что и IdeS, но с пониженным распознаванием IdeS специфических антител. IVIg представляет собой объединенный человеческий IgG, содержащий приблизительно 65-70% IgG1, 35-30% IgG2 и суммарное количество IgG3/IgG4 приблизительно 1%. Природный человеческий IVIg также содержит анти-IdeS антитела, выработанные в результате предыдущего воздействия *S. pyogenes* на донора IgG. Анти-IdeS антитела в человеческом IVIg являются нейтрализующими в той степени, в которой их связывание с IdeS может снижать или полностью прекращать IgG протеазную активность IdeS. Результаты расщепления IVIg показывают общее расщепление всех различных подклассов IgG с преобладанием IgG1 и IgG2 и присутствие нейтрализующих анти-IdeS антител. В целом, все испытываемые полипептиды IgG-цистеиновой протеазы обладают более низкой эффективностью расщепления IgG2 по сравнению с эффективностью расщепления IgG1.

Таблица 1

Величины EC50 (нг/мл), определенные в анализе активности ELISA и кратность увеличения активности по сравнению с исходным IdeS (pCART124)

	EC50 (нг/мл) при расщеплении IgG1 (Humira)	Кратность увеличения активности	EC50 (нг/мл) при расщеплении IgG2 (XGEVA)	Кратность увеличения активности
PCART124	243	1	199	1
PCART125	165	1,5	125	1,6
pCART213	80	3,0	57	3,5
pCART214	111	2,2	95	2,1

5

Таблица 2

Данные расщепления IgG1 (Humira), полученные на геле (Фиг. 9A). Концентрация (нг/мл) полипептида, необходимая для осуществления первого и второго расщепления IgG, таким образом, чтобы количество расщепленных продуктов превышало количество нерасщепленных продуктов. Приблизительное значение EC50 (* на Фиг. 9A).

10

ID	Первая тяжелая цепь IgG IgG до <u>sclgG</u> Конц. фермента (нг/мл)	Вторая тяжелая цепь IgG <u>sclgG</u> до F(ab') ₂ Конц. фермента (нг/мл)	Прибл. величина EC50, т.е. равные количества <u>sclgG</u> и F(ab') ₂ (*) Конц. фермента (нг/мл)
BX1001865	1,5	120	100
pCART124	1,5	120	100
PCART125	1,5	120	40-100
pCART213	1,5	40	40
pCART214	1,5	120	40-100

Таблица 3

Данные расщепления IgG2 (XGEVA), полученные на геле (Фиг. 9B). Концентрация (нг/мл) полипептида, необходимая для осуществления первого и второго расщепления IgG, таким образом, чтобы количество расщепленных продуктов превышало количество нерасщепленных продуктов. Приблизительное значение EC50 (* на Фиг. 9B).

ID	Первая тяжелая цепь IgG IgG до <u>sclgG</u> Конц. фермента (нг/мл)	Вторая тяжелая цепь IgG <u>sclgG</u> до F(ab') ₂ Конц. фермента (нг/мл)	Прибл. величина EC50, т.е. равные количества <u>sclgG</u> и F(ab') ₂ (*) Конц. фермента (нг/мл)
BX1001865	14	370	100-400
pCART124	14	370	100-400
PCART125	14	370	100-400
pCART213	14	370	100-400
pCART214	14	370	100-400

Таблица 4

Данные расщепления IgG1 (Humira) и IgG2 (XGEVA) под действием pCART228, полученные на геле (Фиг. 10). Концентрация (нг/мл) полипептида, необходимая для осуществления первого и второго расщепления IgG (таким образом, чтобы количество расщепленных продуктов превышало количество нерасщепленных продуктов).

ID	Первая тяжелая цепь IgG (Humira) IgG до <u>sclgG</u> Конц. фермента (нг/мл)	Вторая тяжелая цепь IgG (Humira) <u>sclgG</u> до F(ab') ₂ Конц. фермента (нг/мл)	Первая тяжелая цепь IgG (XGEVA) IgG до <u>sclgG</u> Конц. фермента (нг/мл)	Вторая тяжелая цепь IgG (XGEVA) <u>sclgG</u> до F(ab') ₂ Конц. фермента (нг/мл)
BX1001865	4,6	370	14	1100
PCART124	4,6	370	14	1100
pCART228	4,6	120	40	1100

Таблица 5

Данные расщепления IVIg под действием pCART125, 213 и 214, полученные на геле (Фиг. 11). Концентрация (нг/мл) полипептида, необходимая для осуществления первого и второго расщепления IgG таким образом, чтобы количество расщепленных продуктов превышало количество нерасщепленных продуктов

ID	Первая тяжелая цепь IgG IgG до <u>sclgG</u> Конц. фермента (нг/мл)	Вторая тяжелая цепь IgG <u>sclgG</u> до F(ab') ₂ Конц. фермента (нг/мл)
BX1001865	1500	6000
PCART124	1500	6000
pCART125	1500	6000
pCART213	1500	6000
PCART214	1500	6000

Таблица 6

Данные расщепления IVIg под действием pCART228, полученные на геле (Фиг. 12). Концентрация (нг/мл) полипептида, необходимая для осуществления первого и второго расщепления тяжелой цепи IgG, таким образом, чтобы количество расщепленных продуктов превышало количество нерасщепленных продуктов

ID	Первая тяжелая цепь IgG IgG до <u>sclgG</u> Конц. фермента (нг/мл)	Вторая тяжелая цепь IgG <u>sclgG</u> до F(ab') ₂ Конц. фермента (нг/мл)
BX1001865	1900	7500
pCART124	1900	7500
pCART229	1900	7500

Пример 5

ADA ELISA, конкурентный анализ ELISA за центры связывания ADA-IdeS

Конкуренцию за центры связывания между антителами к лекарственному средству (ADA) и IdeS определяли для "ADA"-модифицированных полипептидов согласно изобретению (pCART125, 213 и 214) с помощью анализа на основе ELISA,

Meso Scale Discovery (MSD). Принцип ELISA состоит в нанесении на лунки планшета для множественного титрования исходного IdeS, меченого his (pCART124). Сыворотка крови большинства людей содержит антитела к IdeS, выработанные благодаря перенесенным ранее инфекциям стрептококка группы А. В настоящем исследовании в качестве стандартов для обнаружения ADA были применены две различные клинические объединенные сыворотки человеческой крови. Первая объединенная сыворотка представляла собой нормальную сыворотку человеческой крови, полученную от 100 человек; ее называли Объединенной человеческой сывороткой 1191807, и вторая представляла собой объединенную сыворотку крови, полученную от пациентов, находящихся в фазе II исследования 13-HMedIdeS-02; ее называли Объединенной сывороткой-2 Фазы II. Этим пациентам производили однократное введение IdeS в дозировке от 0,24 до 0,5 мг/кг массы тела, в результате чего в их сыворотке крови содержались повышенные уровни (приблизительно в 50 раз) анти-IdeS ADA.

Основной принцип этого конкурентного анализа ADA ELISA состоит в том, что IdeS (pCART124) наносят на дно микротитрационного планшета. Объединенные человеческие сыворотки предварительно инкубируют вместе с полипептидами согласно изобретению для последующего анализа на распознавание ADA или с положительным контролем IdeS (pCART124) в молярном отношении 1:100 со 100-кратным избытком полипептидов согласно изобретению. Концентрации двух различных объединенных сывороток, используемых для предварительной инкубации, оценивают по стандартной кривой, получая приблизительно 80% связывания с исходным IdeS. Если центры связывания ADA были удалены из испытуемых полипептидов, то эти варианты не могут конкурировать за связывание ADA с исходным IdeS, находящимся на дне лунок, т.е. слабый сигнал демонстрирует сильное сходство ADA с исходным IdeS (pCART124), а сильный сигнал демонстрирует слабое сходство ADA с исходным IdeS.

Концентрация обоих стандартов, при которой достигается приблизительно 80% связывание на линейном участке стандартной кривой, составляла приблизительно 200 нг ADA (IdeS)/мл. При проведении предварительной конкурентной инкубации эта концентрация была выбрана для каждого из стандартов, и концентрация полипептидов согласно изобретению в 100 раз превышала концентрацию ADA, с учетом разности в молярных массах между антителом, масса которого составляет 150 кДа, и IdeS, масса которого составляет приблизительно 35 кДа, то есть меньше в 4,2 раза; таким образом, 100 умножаем на

200 нг/мл и делим на 4,2, получая приблизительно 5 мг/мл испытуемых полипептидов. Стандартную сыворотку, содержащую 200 нг/мл ADA и IdeS (pCART124) или полипептиды согласно изобретению, подвергали предварительной инкубации в течение 1 часа при комнатной температуре (КТ). В качестве контроля для максимального связывания ADA, такие же концентрации стандартов подвергали предварительной инкубации в отсутствие IdeS (pCART124) или испытуемых полипептидов, и полученную величину принимали за 80% от максимальной величиной связывания. За нижние предельные значения диапазона расчета конкурентного связывания принимали самые низкие значения кривой стандартов. Из средних показателей стандартов, предварительно инкубированных с IdeS (pCART124) или испытуемыми полипептидами, вычитали 80% величины связывания стандартов, деленной на 80% величины связывания стандартов, из которой вычитали нижние предельные значения, получая выраженную в % величину конкурентного связывания. Если для испытуемых полипептидов было получено наименьшее % значение конкурентного связывания, то это означало, что большинство эпитопов, связывающих ADA, были удалены из полипептида по сравнению с исходным IdeS (pCART124).

Краткое описание лабораторного протокола: На лунки планшетов для множественного титрования наносили и выдерживали в течение ночи pCART124 (1 мг/мл), трижды промывали ФСБ-Т и блокировали в течение 1 часа добавлением 0,45% желатина из шкуры рыб и 2 мМ ингибитора цистеиновой протеазы, т.е. йодуксусной кислоты (ИНАс) в ФСБ.

Оба стандарта были приготовлены в виде серии титрования поэтапным разбавлением 1:3 в среде из 0,45% желатина из шкуры рыб и 2 мМ ИНАс в ФСБ, с концентрации 5000 нг ADA (IdeS)/мл до 2,5 нг ADA (IdeS)/мл; на основании полученных данных была построена стандартная калибровочная кривая для анализа, причем измерения проводились как на линейной части, так и в области максимальных и минимальных значений стандартной кривой. Во время проведения блокировки планшета в течение 1 часа при КТ проводили предварительную совместную инкубацию стандартов и IdeS (pCART124) или испытуемых полипептидов, т.е. образцов для этапа конкурентного анализа, применяя 200 нг/мл ADA (стандарты) и 5 мг/мл IdeS (pCART124) или испытуемых полипептидов.

Планшет, на который наносили pCART124, трижды промывали, и в каждую лунку планшета для множественного титрования добавляли 50 мкл предварительно инкубированных образцов или 50 мкл стандарта.

Планшет инкубировали при КТ в течение 2 часа и затем промывали ФСБ-Т. В качестве идентифицирующего антитела добавляли биотинилированное козье антитело к человеческому $F(ab')_2$ -специфическому фрагменту $F(ab')_2$ (Jackson #109-066-097, 0,65 мг/мл), (1000-кратное разбавление) и Стрептавидин-Сульфо (MSD, номер по каталогу: R32AD-1 или R32AD-5) (2000-кратное разбавление) в блокирующем буфере, инкубированный в течение 1 часа при КТ в темноте. Планшет трижды промывали, добавляли разбавленный в 4 раза буфер Т для считывания (MSD Read буфер Т (4x)), и планшет непосредственно анализировали с помощью считывателя планшетов MSD (Meso Scale Discovery) QuickPlex SQ 120, Модель 1300.

Результаты и выводы

Все испытуемые полипептиды IgG-цистеиновой протеазы, pCART125, 213 и 214 хуже распознаются IdeS специфическими ADA в сыворотке крови человека по сравнению с исходным IdeS (pCART124). Некоторые из эпитопов распознавания ADA обнаружены в N-терминальной части IdeS. Во всех полипептидах согласно изобретению N-терминальная часть, имеющаяся в IdeS, удалена, и единственным различием в последовательностях pCART125 и исходного IdeS является удаление N-терминального участка.

Процентная доля (%) блокированных центров связывания IdeS-ADA в pCART125, 213 и 214 представлена на Фиг. 14 и 15, и исходный IdeS pCART124 применяют в качестве положительного контроля для 100% сходства.

Пример 6

Оценка *in vivo* эффективности Octagam (человеческого IVIg) в опытах на мышах

В этом исследовании мышам BALB/c интраперитонеально (i.p.) вводили человеческий IVIg (Octagam). Концентрацию вводимого человеческого IVIg подбирали таким образом, чтобы дозировка составляла 900 мг/кг, то есть коррелировала с концентрацией IgG в человеческой плазме (10 мг/мл). Человеческий IVIg вводили i.p. в сутки 0. Спустя двадцать четыре часа (сутки 1) после инъекции человеческого IVIg, мышам внутривенно (i.v.) в дозировке 1 мг/кг

вводили ФСБ, контрольные IdeS (BX1001865 и pCART124) или испытуемые IgG цистеиновые протеазы, pCART125, pCART213 и pCART214. Спустя два часа отбирали образцы сыворотки крови, и мышей умерщвляли.

Анализ эффективности ELISA

- 5 Принцип анализа состоял в нанесении на лунки планшета для множественного титрования F(ab')₂-фрагмента, нацеленного на человеческие IgG антитела, специфического для области Fab. Затем сыворотку крови мышей обрабатывали IVIg и добавляли контрольные IdeS (BX1001865 и pCART124) или
- 10 испытуемые полипептиды IgG-цистеиновой протеазы. Количество интактного или однократно расщепленного человеческого IgG (IVIg), иммобилизованного на лунках, измеряли с помощью идентифицирующего антитела к человеческому IgG (IVIg), специфического для участка Fc антитела. Чем ниже обнаруживаемая концентрация интактного человеческого IgG антитела (IVIg), тем большей эффективностью должен обладать полипептид IgG-цистеиновой протеазы.
- 15 Краткое описание лабораторного протокола: На лунки планшета для множественного титрования наносили и выдерживали в течение ночи (от +2 до 8°C) козье антитело к человеческому F(ab')₂-специфическому фрагменту F(ab')₂ (0,5 мг/мл) (Jackson #109-006-097), затем промывали ФСБ плюс 0,05% Tween 20 (ФСБ-Т) и производили блокировку выдерживанием в 2% BSA в ФСБ-Т (блокирующий
- 20 буфер) в течение 45-120 минут при КТ (при комнатной температуре). В качестве стандарта применяли калибратор белка человеческой сыворотки (DAKO #X0908), который добавляли в концентрации от 0,5 до 300 нг/мл. Образцы сыворотки крови, отобранные у мышей, обрабатывали IVIg; различные полипептиды IgG-цистеиновой протеазы размораживали и разбавляли блокирующим буфером в 100000 раз, после
- 25 чего добавляли в аналитический планшет для множественного титрования. Планшет инкубировали 2 часа при встряхивании при КТ и затем промывали ФСБ-Т. Биотинилированное мышиное антитело, специфическое к человеческому Fc IgG (600 нг/мл) (Jackson #109-066-098) смешивали со Strep-sulfo (стрептавидином-сульфо) (200 нг/мл) (MSD #R32AD-1) и добавляли в планшет для множественного
- 30 титрования. Планшет герметизировали алюминиевой пленкой и инкубировали при КТ в течение 1 часа при встряхивании. Затем планшет промывали ФСБ-Т, и в каждую лунку добавляли 150 мкл разбавленного в 2 раза буфера Т для считывания (MSD #R92TC-2). Планшет непосредственно анализировали на считывателе планшетов MSD (Meso Scale Discovery) QuickPlex SQ 120, Модель 1300.

Визуальное представление эффективности на геле

10 мкл сыворотки крови мыши разбавляли в отношении 1:10 в 90 мкл ФСБ. После этого 10 мкл разбавленную сыворотку смешивали с 30 мкл 4x SDS-PAGE загрузочного буфера. Для обнаружения различных фрагментов IgG (IgG, scIgG и F(ab')₂) применяли 5 мкл маркера IgG, созданного в собственной лаборатории. Образцы нагревали при 92°C в течение 3 минут (Thermo mixer compact, Eppendorf) и центрифугировали в течение короткого времени, после чего загружали 10 мкл на гель 4-20% Mini-Protean® TGX, Stain-free™ (номер по каталогу #456-8096, Biorad). На гели воздействовали напряжением 200В в течение 40 минут.

10

Результаты и выводы

Расщепление человеческого IVIg (Octagam) *in vivo* под действием контрольных IdeS (BX1001865 и pCART124) и pCART125, 213 и 214 сравнивали посредством определения уровня человеческого IgG в сыворотке крови с помощью анализа эффективности ELISA, а также анализировали разложение IgG с помощью SDS-PAGE. Введение мышам контрольных IdeS (BX1001865 и pCART124) и различных IgG цистеиновых протеаз pCART125, pCART213 и pCART214 ясно показало протекание расщепления человеческого IgG *in vivo* (Таблица 7 и Фиг. 16).

Было показано полное расщепление контрольных IdeS (BX100186 и pCART124), pCART125 и pCART213 при отсутствии на геле видимых полос scIgG и значительных полос F(ab')₂ (Фиг. 17). В опытах с мышами была показана более низкая эффективность pCART214, поскольку молекулы scIgG присутствовали в сыворотке крови спустя два часа (* на Фиг. 17C). Однако, на геле не было обнаружено интактного IVIg, что означает, что более высокая полоса pCART214 на Фиг. 16 относится к scIgG, а не к интактному IgG. Это показывает, что полипептиды согласно изобретению расщепляют IgG в опытах *in vivo*.

Таблица 7

Анализ расщепления *in vivo* человеческого IgG в сыворотке крови мышей, которым вводили IdeS (BX1001865 и pCART124) / варианты IdeS, проведенный с помощью исследования эффективности ELISA (среднее ± среднееквадратичное отклонение)

	Среднее (мг/мл)	Среднееквадратичное отклонение
Контроль (ФСБ)	6,58	0,80
BX1001865	0,30	0,05

pCART124	0,39	0,12
pCART125	0,38	0,39
pCART213	0,26	0,06
pCART214	1,29	0,05

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> HANSA MEDICAL AB

<120> ЦИСТЕИНОВАЯ ПРОТЕАЗА

<130> N404707WO

<160> 37

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 339

<212> белок

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 1

Met Arg Lys Arg Cys Tyr Ser Thr Ser Ala Ala Val Leu Ala Ala Val
1 5 10 15

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

Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro Tyr His Val
35 40 45

Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn Phe Thr Gln
50 55 60

Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln Gly Trp Tyr
65 70 75 80

Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp Asp Leu Leu Cys Gly Ala
85 90 95

Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln Asn Lys Asp
100 105 110

Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln Lys Ile Asn
115 120 125

Phe Asn Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile Asp Thr Lys
130 135 140

Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys Glu Lys Ala
145 150 155 160

Phe Pro Tyr Leu Ser Thr Lys His Leu Gly Val Phe Pro Asp His Val
165 170 175

Ile Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr Asn His Gly

180

185

190

Pro Thr Pro Val Lys Glu Gly Ser Lys Asp Pro Arg Gly Gly Ile Phe
 195 200 205

Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Ser Lys Leu Leu Thr Ser Arg
 210 215 220

His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp Leu Ile Lys
 225 230 235 240

Lys Glu Leu Thr Glu Gly Lys Ala Leu Gly Leu Ser His Thr Tyr Ala
 245 250 255

Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asp
 260 265 270

Ser Asn Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser Asp Ser Asn
 275 280 285

Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn Ser Ala Gly
 290 295 300

Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn Ile Gly Ala
 305 310 315 320

Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp Ser Trp Asn
 325 330 335

Gln Thr Asn

<210> 2

<211> 310

<212> белок

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 2

Asp Ser Phe Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro
 1 5 10 15

Tyr His Val Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn
 20 25 30

Phe Thr Gln Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln
 35 40 45

Gly Trp Tyr Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp Asp Leu Leu
 50 55 60

Cys Gly Ala Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln
65 70 75 80

Asn Lys Asp Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln
85 90 95

Lys Ile Asn Phe Asn Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile
100 105 110

Asp Thr Lys Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys
115 120 125

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

Asp His Val Ile Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr
145 150 155 160

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

Gly Ile Phe Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Ser Lys Leu Leu
180 185 190

Thr Ser Arg His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp
195 200 205

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

Thr Tyr Ala Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala
225 230 235 240

Asp Phe Asp Ser Asn Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser
245 250 255

Asp Ser Asn Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn
260 265 270

Ser Ala Gly Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn
275 280 285

Ile Gly Ala Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp
290 295 300

Ser Trp Asn Gln Thr Asn
305 310

<210> 3
<211> 310
<212> белок
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 3

Asp Ser Phe Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro
1 5 10 15

Tyr His Val Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn
20 25 30

Phe Thr Gln Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln
35 40 45

Gly Trp Tyr Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp Asp Leu Leu
50 55 60

Cys Gly Ala Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln
65 70 75 80

Asn Lys Asp Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln
85 90 95

Lys Ile Asn Phe Arg Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile
100 105 110

Asp Thr Lys Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys
115 120 125

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

Asp His Val Ile Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr
145 150 155 160

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

Gly Ile Phe Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Ser Lys Leu Leu
180 185 190

Thr Ser Arg His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp
195 200 205

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

Thr Tyr Ala Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala
225 230 235 240

Asp Phe Asp Ser Asn Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser
245 250 255

Asp Ser Asn Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn
260 265 270

Ser Ala Gly Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn
275 280 285

Ile Gly Ala Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp
290 295 300

Ser Trp Asn Gln Thr Asn
305 310

<210> 4

<211> 310

<212> белок

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 4

Asp Ser Phe Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro
1 5 10 15

Tyr His Val Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn
20 25 30

Phe Thr Gln Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln
35 40 45

Gly Trp Tyr Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp Asp Leu Leu
50 55 60

Cys Gly Ala Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln
65 70 75 80

Asn Lys Asp Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln
85 90 95

Lys Ile Asn Phe Lys Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile
100 105 110

Asp Thr Lys Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys
115 120 125

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

Asp His Val Ile Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr
145 150 155 160

Asn His Gly Pro Thr Pro Val Lys Arg Gly Ser Lys Asp Pro Arg Gly
165 170 175

Gly Ile Phe Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asn Gln Ser Lys Leu Leu
180 185 190

Thr Ser Arg His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp
195 200 205

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

Thr Tyr Ala Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala
225 230 235 240

Asp Phe Asp Ser Asn Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser
245 250 255

Asp Ser Asn Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn
260 265 270

Ser Ala Gly Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn
275 280 285

Ile Gly Ala Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp
290 295 300

Ser Trp Asn Gln Thr Asn
305 310

<210> 5
<211> 310
<212> белок
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 5

Asp Ser Phe Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro
1 5 10 15

Tyr His Val Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn
20 25 30

Phe Thr Gln Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln

35

40

45

Gly Trp Tyr Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp Asp Leu Leu
50 55 60

Cys Gly Ala Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln
65 70 75 80

Asn Lys Asp Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln
85 90 95

Lys Ile Asn Phe Arg Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile
100 105 110

Asp Thr Lys Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys
115 120 125

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

Asp His Val Ile Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr
145 150 155 160

Asn His Gly Pro Thr Pro Val Lys Lys Gly Ser Lys Asp Pro Arg Gly
165 170 175

Gly Ile Phe Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asn Gln Ser Lys Leu Leu
180 185 190

Thr Ser Arg His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp
195 200 205

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

Thr Tyr Ala Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala
225 230 235 240

Asp Phe Asp Ser Asn Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser
245 250 255

Asp Ser Asn Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn
260 265 270

Lys Ala Gly Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn
275 280 285

Ile Gly Ala Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp

290

295

300

Ser Trp Asn Gln Thr Asn
305 310

<210> 6

<211> 310

<212> белок

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 6

Asp Ser Phe Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro
1 5 10 15

Tyr His Val Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn
20 25 30

Phe Thr Gln Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln
35 40 45

Gly Trp Tyr Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp Asp Leu Leu
50 55 60

Cys Gly Ala Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln
65 70 75 80

Asn Lys Asp Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Arg Glu His Pro Glu Lys Gln
85 90 95

Lys Ile Asn Phe Asn Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile
100 105 110

Asp Thr Lys Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys
115 120 125

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

Asp His Val Ile Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr
145 150 155 160

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

Gly Ile Phe Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asn Gln Ser Lys Leu Leu
180 185 190

Thr Ser Arg His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp
195 200 205

Leu Ile Lys Lys Glu Leu Asp Glu Gly Lys Ala Leu Gly Leu Ser His
210 215 220

Thr Tyr Ala Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala
225 230 235 240

Asp Phe Asp Ser Asn Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser
245 250 255

Asp Ser Asn Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn
260 265 270

Ser Ala Gly Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn
275 280 285

Ile Gly Ala Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp
290 295 300

Ser Trp Asn Gln Thr Asn
305 310

<210> 7
<211> 310
<212> белок
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 7

Asp Ser Phe Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro
1 5 10 15

Tyr His Val Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn
20 25 30

Phe Thr Gln Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln
35 40 45

Gly Trp Tyr Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp Asp Leu Leu
50 55 60

Cys Gly Ala Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln
65 70 75 80

Asn Lys Asp Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Lys Glu His Pro Glu Lys Gln
85 90 95

Lys Ile Asn Phe Asn Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile
100 105 110

Arg Thr Lys Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys
115 120 125

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

Asp His Val Ile Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr
145 150 155 160

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

Gly Ile Phe Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asn Gln Ser Lys Leu Leu
180 185 190

Thr Ser Arg His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp
195 200 205

Leu Ile Lys Lys Glu Leu Glu Glu Gly Lys Ala Leu Gly Leu Ser His
210 215 220

Thr Tyr Ala Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala
225 230 235 240

Asp Phe Asp Ser Asn Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser
245 250 255

Asp Ser Asn Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn
260 265 270

Lys Ala Gly Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn
275 280 285

Ile Gly Ala Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp
290 295 300

Ser Trp Asn Gln Thr Asn
305 310

<210> 8
<211> 310
<212> белок
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 8

Asp Ser Phe Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro
1 5 10 15

Tyr	His	Val	Thr	Ser	Val	Trp	Thr	Lys	Gly	Val	Thr	Pro	Pro	Ala	Asn		
			20					25					30				
Phe	Thr	Gln	Gly	Glu	Asp	Val	Phe	His	Ala	Pro	Tyr	Val	Ala	Asn	Gln		
		35					40					45					
Gly	Trp	Tyr	Asp	Ile	Thr	Lys	Thr	Phe	Asn	Gly	Lys	Asp	Asp	Leu	Leu		
	50					55					60						
Cys	Gly	Ala	Ala	Thr	Ala	Gly	Asn	Met	Leu	His	Trp	Trp	Phe	Asp	Gln		
65					70					75					80		
Asn	Lys	Asp	Gln	Ile	Glu	Arg	Tyr	Leu	Glu	Glu	His	Pro	Glu	Lys	Gln		
				85					90					95			
Lys	Ile	Asn	Phe	Asn	Gly	Glu	Gln	Met	Phe	Asp	Val	Lys	Glu	Ala	Ile		
		100						105					110				
Asp	Thr	Lys	Asn	His	Gln	Leu	Asp	Ser	Lys	Leu	Phe	Glu	Tyr	Phe	Lys		
		115					120					125					
Glu	Lys	Ala	Phe	Pro	Tyr	Leu	Ser	Thr	Lys	His	Leu	Gly	Val	Phe	Pro		
	130					135					140						
Asp	His	Val	Ile	Asp	Met	Phe	Ile	Asn	Gly	Tyr	Arg	Leu	Ser	Leu	Thr		
145					150					155					160		
Asn	His	Gly	Pro	Thr	Pro	Val	Lys	Glu	Gly	Ser	Lys	Asp	Pro	Arg	Gly		
				165					170					175			
Gly	Ile	Phe	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Arg	Gly	Asn	Gln	Ser	Lys	Leu	Leu		
		180						185					190				
Thr	Ser	Arg	His	Asp	Phe	Lys	Glu	Lys	Asn	Leu	Lys	Glu	Ile	Ser	Asp		
		195					200					205					
Leu	Ile	Lys	Glu	Glu	Leu	Thr	Lys	Gly	Lys	Ala	Leu	Gly	Leu	Ser	His		
	210					215					220						
Thr	Tyr	Ala	Asn	Val	Arg	Ile	Asn	His	Val	Ile	Asn	Leu	Trp	Gly	Ala		
225					230					235					240		
Asp	Phe	Asp	Ser	Asn	Gly	Asn	Leu	Lys	Ala	Ile	Tyr	Val	Thr	Asp	Ser		
				245					250					255			
Asp	Ser	Asn	Ala	Ser	Ile	Gly	Met	Lys	Lys	Tyr	Phe	Val	Gly	Val	Asn		
		260						265					270				

Ser Ala Gly Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Lys Asn
275 280 285

Ile Gly Ala Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Lys
290 295 300

Ser Trp Asn Gln Thr Asn
305 310

<210> 9
<211> 310
<212> белок
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 9

Asp Ser Phe Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro
1 5 10 15

Tyr His Val Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn
20 25 30

Phe Thr Gln Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln
35 40 45

Gly Trp Tyr Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp Asp Leu Leu
50 55 60

Cys Gly Ala Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln
65 70 75 80

Asn Lys Asp Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Lys Glu His Pro Glu Lys Gln
85 90 95

Lys Ile Asn Phe Arg Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile
100 105 110

Arg Thr Lys Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys
115 120 125

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

Asp His Val Ile Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr
145 150 155 160

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

Gly Ile Phe Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asn Gln Ser Lys Leu Leu

				180				185				190			
Thr	Ser	Arg	His	Asp	Phe	Lys	Glu	Lys	Asn	Leu	Lys	Glu	Ile	Ser	Asp
		195					200					205			
Leu	Ile	Lys	Ser	Glu	Leu	Glu	Asn	Gly	Lys	Ala	Leu	Gly	Leu	Ser	His
		210					215					220			
Thr	Tyr	Ala	Asn	Val	Arg	Ile	Asn	His	Val	Ile	Asn	Leu	Trp	Gly	Ala
225					230					235					
Asp	Phe	Asp	Ser	Asn	Gly	Asn	Leu	Lys	Ala	Ile	Tyr	Val	Thr	Asp	Ser
				245					250					255	
Asp	Ser	Asn	Ala	Ser	Ile	Gly	Met	Lys	Lys	Tyr	Phe	Val	Gly	Val	Asn
				260					265					270	
Lys	Ala	Gly	Lys	Val	Ala	Ile	Ser	Ala	Lys	Glu	Ile	Lys	Glu	Asp	Asn
		275					280					285			
Ile	Gly	Ala	Gln	Val	Leu	Gly	Leu	Phe	Thr	Leu	Ser	Thr	Gly	Gln	Asp
		290					295					300			
Ser	Trp	Asn	Gln	Thr	Asn										
305					310										
<210>	10														
<211>	310														
<212>	белок														
<213>	Streptococcus pyogenes														
<400>	10														
Asp	Ser	Phe	Ser	Ala	Asn	Gln	Glu	Ile	Arg	Tyr	Ser	Glu	Val	Thr	Pro
1					5					10					15
Tyr	His	Val	Thr	Ser	Val	Trp	Thr	Lys	Gly	Val	Thr	Pro	Pro	Ala	Asn
				20					25					30	
Phe	Thr	Gln	Gly	Glu	Asp	Val	Phe	His	Ala	Pro	Tyr	Val	Ala	Asn	Gln
		35					40					45			
Gly	Trp	Tyr	Asp	Ile	Thr	Lys	Thr	Phe	Asn	Gly	Lys	Asp	Asp	Leu	Leu
		50					55					60			
Cys	Gly	Ala	Ala	Thr	Ala	Gly	Asn	Met	Leu	His	Trp	Trp	Phe	Asp	Gln
65					70					75					
Asn	Lys	Asp	Gln	Ile	Lys	Arg	Tyr	Leu	Lys	Glu	His	Pro	Glu	Lys	Gln
				85					90					95	

Lys Ile Asn Phe Arg Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile
100 105 110

Arg Thr Lys Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys
115 120 125

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

Asp His Val Ile Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr
145 150 155 160

Asn His Gly Pro Thr Pro Val Lys Lys Gly Ser Lys Asp Pro Arg Gly
165 170 175

Gly Ile Phe Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asn Gln Ser Lys Leu Leu
180 185 190

Thr Ser Arg His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp
195 200 205

Leu Ile Lys Lys Glu Leu Glu Glu Gly Lys Ala Leu Gly Leu Ser His
210 215 220

Thr Tyr Ala Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala
225 230 235 240

Asp Phe Asp Ser Asn Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser
245 250 255

Asp Ser Asn Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn
260 265 270

Ser Ala Gly Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn
275 280 285

Ile Gly Ala Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp
290 295 300

Ser Trp Asn Gln Thr Asn
305 310

<210> 11

<211> 310

<212> белок

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 11

Asp	Ser	Phe	Ser	Ala	Asn	Gln	Glu	Ile	Arg	Tyr	Ser	Glu	Val	Thr	Pro	1	5	10	15
Tyr	His	Val	Thr	Ser	Val	Trp	Thr	Lys	Gly	Val	Thr	Pro	Pro	Ala	Asn	20	25	30	
Phe	Thr	Gln	Gly	Glu	Asp	Val	Phe	His	Ala	Pro	Tyr	Val	Ala	Asn	Gln	35	40	45	
Gly	Trp	Tyr	Asp	Ile	Thr	Lys	Thr	Phe	Asn	Gly	Lys	Asp	Asp	Leu	Leu	50	55	60	
Cys	Gly	Ala	Ala	Thr	Ala	Gly	Asn	Met	Leu	His	Trp	Trp	Phe	Asp	Gln	65	70	75	80
Asn	Lys	Asp	Gln	Ile	Glu	Arg	Tyr	Leu	Glu	Glu	His	Pro	Glu	Lys	Gln	85	90	95	
Lys	Ile	Asn	Phe	Arg	Gly	Glu	Gln	Met	Phe	Asp	Val	Lys	Glu	Ala	Ile	100	105	110	
Asp	Thr	Lys	Asn	His	Gln	Leu	Asp	Ser	Lys	Leu	Phe	Glu	Tyr	Phe	Lys	115	120	125	
Glu	Lys	Ala	Phe	Pro	Tyr	Leu	Ser	Thr	Lys	His	Leu	Gly	Val	Phe	Pro	130	135	140	
Asp	His	Val	Ile	Asp	Met	Phe	Ile	Asn	Gly	Tyr	Arg	Leu	Ser	Leu	Thr	145	150	155	160
Asn	His	Gly	Pro	Thr	Pro	Val	Lys	Lys	Gly	Ser	Lys	Asp	Pro	Arg	Gly	165	170	175	
Gly	Ile	Phe	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Arg	Gly	Asn	Gln	Ser	Lys	Leu	Leu	180	185	190	
Thr	Ser	Arg	His	Asp	Phe	Lys	Glu	Lys	Asn	Leu	Lys	Glu	Ile	Ser	Asp	195	200	205	
Leu	Ile	Lys	Glu	Glu	Leu	Thr	Lys	Gly	Lys	Ala	Leu	Gly	Leu	Ser	His	210	215	220	
Thr	Tyr	Ala	Asn	Val	Arg	Ile	Asn	His	Val	Ile	Asn	Leu	Trp	Gly	Ala	225	230	235	240
Asp	Phe	Asp	Ser	Asn	Gly	Asn	Leu	Lys	Ala	Ile	Tyr	Val	Thr	Asp	Ser	245	250	255	

Asp Ser Asn Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn
260 265 270

Ser Ala Gly Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn
275 280 285

Ile Gly Ala Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Lys
290 295 300

Ser Trp Asn Gln Thr Asn
305 310

<210> 12

<211> 306

<212> белок

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 12

Asp Ser Phe Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro
1 5 10 15

Tyr His Val Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn
20 25 30

Phe Thr Gln Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln
35 40 45

Gly Trp Tyr Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp Asp Leu Leu
50 55 60

Cys Gly Ala Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln
65 70 75 80

Asn Lys Asp Gln Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln
85 90 95

Lys Ile Asn Phe Asn Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile
100 105 110

Asp Thr Lys Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys
115 120 125

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

Asp His Val Ile Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr
145 150 155 160

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

Gly Ile Phe Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Ser Lys Leu Leu
180 185 190

Thr Ser Arg His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp
195 200 205

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

Thr Tyr Ala Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala
225 230 235 240

Asp Phe Asp Ser Asn Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser
245 250 255

Asp Ser Asn Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn
260 265 270

Ser Ala Gly Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn
275 280 285

Ile Gly Ala Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp
290 295 300

Ser Trp
305

<210> 13
<211> 290
<212> белок
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 13

Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn Phe Thr Gln Gly
1 5 10 15

Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln Gly Trp Tyr Asp
20 25 30

Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp Asp Leu Leu Cys Gly Ala Ala
35 40 45

Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln Asn Lys Asp Gln
50 55 60

Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln Lys Ile Asn Phe

65					70					75				80	
Asn	Gly	Glu	Gln	Met	Phe	Asp	Val	Lys	Glu	Ala	Ile	Asp	Thr	Lys	Asn
				85					90					95	
His	Gln	Leu	Asp	Ser	Lys	Leu	Phe	Glu	Tyr	Phe	Lys	Glu	Lys	Ala	Phe
			100					105					110		
Pro	Tyr	Leu	Ser	Thr	Lys	His	Leu	Gly	Val	Phe	Pro	Asp	His	Val	Ile
		115					120					125			
Asp	Met	Phe	Ile	Asn	Gly	Tyr	Arg	Leu	Ser	Leu	Thr	Asn	His	Gly	Pro
	130					135					140				
Thr	Pro	Val	Lys	Glu	Gly	Ser	Lys	Asp	Pro	Arg	Gly	Gly	Ile	Phe	Asp
145					150				155						160
Ala	Val	Phe	Thr	Arg	Gly	Asp	Gln	Ser	Lys	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	His
				165					170					175	
Asp	Phe	Lys	Glu	Lys	Asn	Leu	Lys	Glu	Ile	Ser	Asp	Leu	Ile	Lys	Lys
			180					185					190		
Glu	Leu	Thr	Glu	Gly	Lys	Ala	Leu	Gly	Leu	Ser	His	Thr	Tyr	Ala	Asn
		195					200					205			
Val	Arg	Ile	Asn	His	Val	Ile	Asn	Leu	Trp	Gly	Ala	Asp	Phe	Asp	Ser
	210					215					220				
Asn	Gly	Asn	Leu	Lys	Ala	Ile	Tyr	Val	Thr	Asp	Ser	Asp	Ser	Asn	Ala
225					230					235					240
Ser	Ile	Gly	Met	Lys	Lys	Tyr	Phe	Val	Gly	Val	Asn	Ser	Ala	Gly	Lys
				245					250					255	
Val	Ala	Ile	Ser	Ala	Lys	Glu	Ile	Lys	Glu	Asp	Asn	Ile	Gly	Ala	Gln
			260					265					270		
Val	Leu	Gly	Leu	Phe	Thr	Leu	Ser	Thr	Gly	Gln	Asp	Ser	Trp	Asn	Gln
		275					280					285			
Thr	Asn														
	290														

<210> 14
 <211> 290
 <212> белок
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 14

Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn Phe Thr Gln Gly
1 5 10 15

Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln Gly Trp Tyr Asp
20 25 30

Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp Asp Leu Leu Cys Gly Ala Ala
35 40 45

Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln Asn Lys Asp Gln
50 55 60

Ile Lys Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln Lys Ile Asn Phe
65 70 75 80

Lys Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Glu Ala Ile Asp Thr Lys Asn
85 90 95

His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys Glu Lys Ala Phe
100 105 110

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

Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr Asn His Gly Pro
130 135 140

Thr Pro Val Lys Glu Gly Ser Lys Asp Pro Arg Gly Gly Ile Phe Asp
145 150 155 160

Ala Val Phe Thr Arg Gly Asn Gln Ser Lys Leu Leu Thr Ser Arg His
165 170 175

Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp Leu Ile Lys Lys
180 185 190

Glu Leu Thr Glu Gly Lys Ala Leu Gly Leu Ser His Thr Tyr Ala Asn
195 200 205

Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asp Ser
210 215 220

Asn Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser Asp Ser Asn Ala
225 230 235 240

Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn Ser Ala Gly Lys
245 250 255

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

Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Asp Ser Trp Asn Gln
275 280 285

Thr Asn
290

<210> 15
<211> 290
<212> белок
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 15

Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn Phe Thr Gln Gly
1 5 10 15

Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln Gly Trp Tyr Asp
20 25 30

Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp Asp Leu Leu Cys Gly Ala Ala
35 40 45

Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln Asn Lys Asp Gln
50 55 60

Ile Glu Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln Lys Ile Asn Phe
65 70 75 80

Lys Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Lys Ala Ile Asp Thr Lys Asn
85 90 95

His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys Glu Lys Ala Phe
100 105 110

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

Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr Asn His Gly Pro
130 135 140

Thr Pro Val Lys Glu Gly Ser Lys Asp Pro Arg Gly Gly Ile Phe Asp
145 150 155 160

Ala Val Phe Thr Arg Gly Asn Gln Ser Lys Leu Leu Thr Ser Arg His
165 170 175

Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp Leu Ile Lys Glu
180 185 190

Glu Leu Thr Lys Gly Lys Ala Leu Gly Leu Ser His Thr Tyr Ala Asn
195 200 205

Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asp Ser
210 215 220

Asn Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser Asp Ser Asn Ala
225 230 235 240

Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn Ser Ala Gly Lys
245 250 255

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

Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Lys Ser Trp Asn Gln
275 280 285

Thr Asn
290

<210> 16
<211> 319
<212> белок
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 16

Asp Asp Tyr Gln Arg Asn Ala Thr Glu Ala Tyr Ala Lys Glu Val Pro
1 5 10 15

His Gln Ile Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Pro Ala Asn
20 25 30

Phe Thr Gln Gly Glu Asp Val Phe His Ala Pro Tyr Val Ala Asn Gln
35 40 45

Gly Trp Tyr Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp Asp Leu Leu
50 55 60

Cys Gly Ala Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His Trp Trp Phe Asp Gln
65 70 75 80

Asn Lys Asp Gln Ile Glu Arg Tyr Leu Glu Glu His Pro Glu Lys Gln
85 90 95

Lys Ile Asn Phe Lys Gly Glu Gln Met Phe Asp Val Lys Lys Ala Ile
100 105 110

Asp Thr Lys Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Glu Tyr Phe Lys
115 120 125

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

Asp His Val Ile Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Arg Leu Ser Leu Thr
145 150 155 160

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

Gly Ile Phe Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asn Gln Ser Lys Leu Leu
180 185 190

Thr Ser Arg His Asp Phe Lys Glu Lys Asn Leu Lys Glu Ile Ser Asp
195 200 205

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

Thr Tyr Ala Asn Val Arg Ile Asn His Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala
225 230 235 240

Asp Phe Asp Ser Asn Gly Asn Leu Lys Ala Ile Tyr Val Thr Asp Ser
245 250 255

Asp Ser Asn Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Val Asn
260 265 270

Ser Ala Gly Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp Asn
275 280 285

Ile Gly Ala Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln Lys
290 295 300

Ser Trp Asn Gln Thr Asn Gly Gly Gly His His His His His His
305 310 315

<210> 17

<211> 320

<212> белок

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 17

Met Asp Ser Phe Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr

1		5		10		15													
Pro	Tyr	His	Val	Thr	Ser	Val	Trp	Thr	Lys	Gly	Val	Thr	Pro	Pro	Ala				
			20					25					30						
Asn	Phe	Thr	Gln	Gly	Glu	Asp	Val	Phe	His	Ala	Pro	Tyr	Val	Ala	Asn				
		35					40					45							
Gln	Gly	Trp	Tyr	Asp	Ile	Thr	Lys	Thr	Phe	Asn	Gly	Lys	Asp	Asp	Leu				
	50					55					60								
Leu	Cys	Gly	Ala	Ala	Thr	Ala	Gly	Asn	Met	Leu	His	Trp	Trp	Phe	Asp				
65					70					75					80				
Gln	Asn	Lys	Asp	Gln	Ile	Lys	Arg	Tyr	Leu	Glu	Glu	His	Pro	Glu	Lys				
				85					90					95					
Gln	Lys	Ile	Asn	Phe	Asn	Gly	Glu	Gln	Met	Phe	Asp	Val	Lys	Glu	Ala				
			100					105					110						
Ile	Asp	Thr	Lys	Asn	His	Gln	Leu	Asp	Ser	Lys	Leu	Phe	Glu	Tyr	Phe				
		115					120					125							
Lys	Glu	Lys	Ala	Phe	Pro	Tyr	Leu	Ser	Thr	Lys	His	Leu	Gly	Val	Phe				
	130					135					140								
Pro	Asp	His	Val	Ile	Asp	Met	Phe	Ile	Asn	Gly	Tyr	Arg	Leu	Ser	Leu				
145					150					155					160				
Thr	Asn	His	Gly	Pro	Thr	Pro	Val	Lys	Glu	Gly	Ser	Lys	Asp	Pro	Arg				
				165					170					175					
Gly	Gly	Ile	Phe	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Arg	Gly	Asp	Gln	Ser	Lys	Leu				
			180					185					190						
Leu	Thr	Ser	Arg	His	Asp	Phe	Lys	Glu	Lys	Asn	Leu	Lys	Glu	Ile	Ser				
		195					200					205							
Asp	Leu	Ile	Lys	Lys	Glu	Leu	Thr	Glu	Gly	Lys	Ala	Leu	Gly	Leu	Ser				
	210					215					220								
His	Thr	Tyr	Ala	Asn	Val	Arg	Ile	Asn	His	Val	Ile	Asn	Leu	Trp	Gly				
225					230					235					240				
Ala	Asp	Phe	Asp	Ser	Asn	Gly	Asn	Leu	Lys	Ala	Ile	Tyr	Val	Thr	Asp				
				245					250					255					
Ser	Asp	Ser	Asn	Ala	Ser	Ile	Gly	Met	Lys	Lys	Tyr	Phe	Val	Gly	Val				

260

265

270

Asn Ser Ala Gly Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Glu Ile Lys Glu Asp
 275 280 285

Asn Ile Gly Ala Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Thr Gly Gln
 290 295 300

Asp Ser Trp Asn Gln Thr Asn Gly Gly Gly His His His His His His
 305 310 315 320

<210> 18

<211> 4

<212> белок

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 18

Asn Gln Thr Asn
 1

<210> 19

<211> 20

<212> белок

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 19

Asp Ser Phe Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro
 1 5 10 15

Tyr His Val Thr
 20

<210> 20

<211> 963

<212> ДНК

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 20

atggatagtt tttctgctaa tcaagagatt agatattcgg aagtaacacc ttatcacggt 60
 acttccggtt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tcaactcaagg tgaagatggt 120
 tttcacgctc cttatggtgc taaccaagga tggtagata ttaccaaacc attcaatgga 180
 aaagacgata ttctttgcgg ggctgccaca gcagggaata tgcttcaact gtggttcgat 240
 caaaacaaag accaaattaa acgttatttg gaagagcatt cagaaaagca aaaaataaac 300
 ttcaatggcg aacagatggt tgacgtaaaa gaagctatcg aactaaaaa ccaccagcta 360
 gatagtaaatt ttttgaata ttttaaagaa aaagctttcc cttatctatc tactaaacac 420
 ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta 480
 actaaccacg gtccaacgcc agtaaaagaa ggtagtaaag atccccgagg tggtagtttt 540

gacgccgtat ttacaagagg tgatcaaagt aagctattga caagtcgtca tgatttttaa	600
gaaaaaaaaatc tcaaagaaat cagtgatctc attaagaaag agttaaccga aggcaaggct	660
ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcatacaacc atgtttataaa cctgtgggga	720
gctgactttg attctaacgg gaaccttaaa gctattttatg taacagactc tgatagtaat	780
gcatctattg gtatgaagaa atactttgtt ggtgttaatt ccgctggaaa agtagctatt	840
tctgctaaag aaataaaaga agataatata ggtgctcaag tactagggtt atttacactt	900
tcaacagggc aagatagttg gaatcagacc aatggcggtg gccatcatca ccatcaccac	960
taa	963

<210> 21
 <211> 963
 <212> ДНК
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 21	
atggatagtt tttctgctaa tcaagagatt agatattcgg aagtaacacc ttatcacggt	60
acttccgttt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tcaactcaagg tgaagatggt	120
tttcacgctc cttatgtttgc taaccaagga tggtagata ttaccaaacc attcaatgga	180
aaagacgatc ttctttgctg ggctgccaca gcagggaata tgcttcaactg gtgggttcgat	240
caaaacaaag accaaattaa acgttattttg gaagagcatc cagaaaagca aaaaataaac	300
ttccgtggcg aacagatggt tgacgtaaaa gaagctatcg acactaaaaa ccaccagcta	360
gatagtaaatt tatttgaata ttttaaagaa aaagctttcc cttatctatc tactaaacac	420
ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta	480
actaaccacg gtccaacgcc agtaaaagaa ggtagtaaag atccccgagg tggatatttt	540
gacgccgtat ttacaagagg tgatcaaagt aagctattga caagtcgtca tgatttttaa	600
gaaaaaaaaatc tcaaagaaat cagtgatctc attaagaaag agttaaccga aggcaaggct	660
ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcatacaacc atgtttataaa cctgtgggga	720
gctgactttg attctaacgg gaaccttaaa gctattttatg taacagactc tgatagtaat	780
gcatctattg gtatgaagaa atactttgtt ggtgttaatt ccgctggaaa agtagctatt	840
tctgctaaag aaataaaaga agataatata ggtgctcaag tactagggtt atttacactt	900
tcaacagggc aagatagttg gaatcagacc aatggcggtg gccatcatca ccatcaccac	960
taa	963

<210> 22
 <211> 963
 <212> ДНК
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 22
atggatagtt tttctgctaa tcaagagatt agatattcgg aagtaacacc ttatcacggt 60
acttccggtt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tcaactcaagg tgaagatggt 120
tttcacgctc cttatgttgc taaccaagga tggatgata ttaccaaacc attcaatgga 180
aaagacgatc ttctttgcgg ggctgccaca gcagggaata tgcttcaactg gtggttcgat 240
caaaacaaag accaaattaa acgttatttg gaagagcatc cagaaaagca aaaaataaac 300
ttcaaaggcg aacagatggt tgacgtaaaa gaagctatcg aactaaaaa ccaccagcta 360
gatagtaaat tatttgaata ttttaaagaa aaagctttcc cttatctatc tactaaacac 420
ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta 480
actaaccacg gtccaacgcc agtaaacgt ggtagtaaag atccccgagg tgggtattttt 540
gacgccgtat ttacaagagg taaccaaagt aagctattga caagtcgtca tgattttaaa 600
gaaaaaaatc tcaagaaat cagtgatctc attaagaaag agttaaccga aggcaaggct 660
ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcataacc atgttataaa cctgtgggga 720
gctgactttg attctaacgg gaaccttaaa gctatttatg taacagactc tgatagtaat 780
gcatctattg gtatgaagaa atactttgtt ggtgttaatt ccgctggaaa agtagctatt 840
tctgctaaag aaataaaaga agataatata ggtgctcaag tactagggtt atttacactt 900
tcaacagggc aagatagttg gaatcagacc aatggcgggtg gccatcatca ccatcaccac 960
taa 963

<210> 23
<211> 963
<212> ДНК
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 23
atggatagtt tttctgctaa tcaagagatt agatattcgg aagtaacacc ttatcacggt 60
acttccggtt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tcaactcaagg tgaagatggt 120
tttcacgctc cttatgttgc taaccaagga tggatgata ttaccaaacc attcaatgga 180
aaagacgatc ttctttgcgg ggctgccaca gcagggaata tgcttcaactg gtggttcgat 240
caaaacaaag accaaattaa acgttatttg gaagagcatc cagaaaagca aaaaataaac 300
ttccgtggcg aacagatggt tgacgtaaaa gaagctatcg aactaaaaa ccaccagcta 360
gatagtaaat tatttgaata ttttaaagaa aaagctttcc cttatctatc tactaaacac 420
ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta 480
actaaccacg gtccaacgcc agtaaaaaa ggtagtaaag atccccgagg tgggtattttt 540
gacgccgtat ttacaagagg taaccaaagt aagctattga caagtcgtca tgattttaaa 600
gaaaaaaatc tcaagaaat cagtgatctc attaagaaag agttaaccga aggcaaggct 660

ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcatacaacc atgtttataaa cctgtgggga	720
gctgactttg attctaacgg gaaccttaaa gctattttatg taacagactc tgatagtaat	780
gcatctattg gtatgaagaa atactttgtt ggtgttaata aagctggaaa agtagctatt	840
tctgctaaag aaataaaaga agataatata ggtgctcaag tactagggtt atttacactt	900
tcaacagggc aagatagttg gaatcagacc aatggcggtg gccatcatca ccatcaccac	960
taa	963

<210> 24
 <211> 963
 <212> ДНК
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 24	
atggatagtt tttctgctaa tcaagagatt agatattcgg aagtaacacc ttatcacggt	60
acttccgttt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tcaactcaagg tgaagatggt	120
tttcacgctc cttatgttgc taaccaagga tggatgata ttaccaaacc attcaatgga	180
aaagacgatc ttctttgcgg ggctgccaca gcagggaata tgcttactg gtgggttcgat	240
caaaacaaag accaaattaa acgttatttg cgtgagcatc cagaaaagca aaaaataaac	300
ttcaatggcg aacagatggt tgacgtaaaa gaagctatcg aactaaaaa ccaccagcta	360
gatagtaaatt tatttgaata ttttaaagaa aaagctttcc cttatctatc tactaaacac	420
ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta	480
actaaccacg gtccaacgcc agtaaaagaa ggtagtaaag atccccgagg tgggtattttt	540
gacgccgtat ttacaagagg taaccaagt aagctattga caagtcgtca tgattttaaa	600
gaaaaaaaaatc tcaaagaaat cagtgatctc attaagaaag agttagatga aggcaaggct	660
ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcatacaacc atgtttataaa cctgtgggga	720
gctgactttg attctaacgg gaaccttaaa gctattttatg taacagactc tgatagtaat	780
gcatctattg gtatgaagaa atactttgtt ggtgttaatt ccgctggaaa agtagctatt	840
tctgctaaag aaataaaaga agataatata ggtgctcaag tactagggtt atttacactt	900
tcaacagggc aagatagttg gaatcagacc aatggcggtg gccatcatca ccatcaccac	960
taa	963

<210> 25
 <211> 963
 <212> ДНК
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 25	
atggatagtt tttctgctaa tcaagagatt agatattcgg aagtaacacc ttatcacggt	60
acttccgttt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tcaactcaagg tgaagatggt	120

tttcacgctc cttatgttgc taaccaagga tggatgata ttacaaaac attcaatgga	180
aaagacgatc ttctttgcgg ggctgccaca gcaggaata tgcttactg gtggttcgat	240
caaaacaaag accaaattaa acgttatttg aaagagcatc cagaaaagca aaaaataaac	300
ttcaatggcg aacagatggt tgacgtaaaa gaagctatcc gtactaaaaa ccaccagcta	360
gatagtaaatt tatttgaata ttttaaagaa aaagctttcc cttatctatc tactaaacac	420
ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta	480
actaaccacg gtccaacgcc agtaaaagaa ggtagtaaag atccccgagg tggatatttt	540
gacgccgtat ttacaagagg taaccaaaagt aagctattga caagtcgtca tgattttaaa	600
gaaaaaaatc tcaaagaaat cagtgatctc attaagaaag agttagaaga aggcaaggct	660
ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcacaaacc atgttataaa cctgtgggga	720
gctgactttg attctaacgg gaaccttaaa gctatttatg taacagactc tgatagtaat	780
gcatctattg gtatgaagaa atactttggt ggtgttaata aagctggaaa agtagctatt	840
tctgctaaag aaataaaaga agataatata ggtgctcaag tactagggtt atttacactt	900
tcaacagggc aagatagtgt gaatcagacc aatggcggtg gccatcatca ccatcaccac	960
taa	963

<210> 26
 <211> 963
 <212> ДНК
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 26	
atggatagtt tttctgctaa tcaagagatt agatattcgg aagtaacacc ttatcacggt	60
acttccggtt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tcaactcaagg tgaagatggt	120
tttcacgctc cttatgttgc taaccaagga tggatgata ttacaaaac attcaatgga	180
aaagacgatc ttctttgcgg ggctgccaca gcaggaata tgcttactg gtggttcgat	240
caaaacaaag accaaattga acgttatttg gaagagcatc cagaaaagca aaaaataaac	300
ttcaatggcg aacagatggt tgacgtaaaa gaagctatcg aactaaaaa ccaccagcta	360
gatagtaaatt tatttgaata ttttaaagaa aaagctttcc cttatctatc tactaaacac	420
ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta	480
actaaccacg gtccaacgcc agtaaaagaa ggtagtaaag atccccgagg tggatatttt	540
gacgccgtat ttacaagagg taaccaaaagt aagctattga caagtcgtca tgattttaaa	600
gaaaaaaatc tcaaagaaat cagtgatctc attaaggaag agttaaccaa aggcaaggct	660
ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcacaaacc atgttataaa cctgtgggga	720
gctgactttg attctaacgg gaaccttaaa gctatttatg taacagactc tgatagtaat	780
gcatctattg gtatgaagaa atactttggt ggtgttaatt ccgctggaaa agtagctatt	840

tctgctaaag aaataaaaaga aaaaaatata ggtgctcaag tactaggggtt atttacactt	900
tcaacagggc aaaaaagttg gaatcagacc aatggcggtg gccatcatca ccatcaccac	960
taa	963

<210> 27
 <211> 963
 <212> ДНК
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 27	
atggatagtt tttctgctaa tcaagagatt agatattcgg aagtaacacc ttatcacggt	60
acttccgttt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tcactcaagg tgaagatggt	120
tttcacgctc cttatgttgc taaccaagga tggatgata ttacaaaac attcaatgga	180
aaagacgac ttctttgcgg ggctgccaca gcagggaata tgcttactg gtgggttcgat	240
caaaacaaag accaaattaa acgttatttg aaagagcatc cagaaaagca aaaaataaac	300
ttccgtggcg aacagatggt tgacgtaaaa gaagctatcc gtactaaaaa ccaccagcta	360
gatagtaaatt tatttgaata ttttaaagaa aaagctttcc cttatctatc tactaaacac	420
ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta	480
actaaccacg gtccaacgcc agtaaaagaa ggtagtaaag atccccgagg tggatatttt	540
gacgccgtat ttacaagagg taaccaagt aagctattga caagtcgtca tgatttttaa	600
gaaaaaaatc tcaaagaaat cagtgatctc attaagagtg agttagaaaa cggcaaggct	660
ctaggcctat cacacaccta cgtaacgta cgcacaaacc atgttataaa cctgtgggga	720
gctgactttg attctaacgg gaaccttaaa gctatttatg taacagactc tgatagtaat	780
gcatctattg gtatgaagaa atactttgtt ggtgttaata aagctggaaa agtagctatt	840
tctgctaaag aaataaaaaga agataatata ggtgctcaag tactaggggtt atttacactt	900
tcaacagggc aagatagttg gaatcagacc aatggcggtg gccatcatca ccatcaccac	960
taa	963

<210> 28
 <211> 963
 <212> ДНК
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 28	
atggatagtt tttctgctaa tcaagagatt agatattcgg aagtaacacc ttatcacggt	60
acttccgttt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tcactcaagg tgaagatggt	120
tttcacgctc cttatgttgc taaccaagga tggatgata ttacaaaac attcaatgga	180
aaagacgac ttctttgcgg ggctgccaca gcagggaata tgcttactg gtgggttcgat	240
caaaacaaag accaaattaa acgttatttg aaagagcatc cagaaaagca aaaaataaac	300

ttccgtggcg aacagatggt tgacgtaaaa gaagctatcc gtactaaaaa ccaccagcta	360
gatagtaaata tttttgaata ttttaaagaa aaagctttcc cttatctatc tactaaacac	420
ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta	480
actaaccacg gtccaacgcc agtaaaaaaa ggtagtaaag atccccgagg tggatatttt	540
gacgccgtat ttacaagagg taaccaaagt aagctattga caagtcgtca tgattttaaa	600
gaaaaaaatc tcaaagaaat cagtgatctc attaagaaag agttagaaga aggcaaggct	660
ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcatacaacc atgtttataaa cctgtgggga	720
gctgactttg attctaacgg gaaccttaaa gctatttatg taacagactc tgatagtaata	780
gcatctattg gtatgaagaa atactttggt ggtgttaatt ccgctggaaa agtagctatt	840
tctgctaaag aaataaaaaga agataatata ggtgctcaag tactagggtt atttacactt	900
tcaacagggc aagatagttg gaatcagacc aatggcggtg gccatcatca ccatcaccac	960
ttaa	963

<210> 29
 <211> 963
 <212> ДНК
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 29	
atggatagtt tttctgctaa tcaagagatt agatattcgg aagtaacacc ttatcacggt	60
acttccgttt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tcactcaagg tgaagatggt	120
tttcacgctc cttatgttgc taaccaagga tggtagata ttacaaaac attcaatgga	180
aaagacgatc ttctttgcgg ggctgccaca gcagggaata tgcttactg gtgggtcgat	240
caaaacaaag accaaattga acgttatttg gaagagcatc cagaaaagca aaaaataaac	300
ttccgtggcg aacagatggt tgacgtaaaa gaagctatcg aactaaaaa ccaccagcta	360
gatagtaaata tttttgaata ttttaaagaa aaagctttcc cttatctatc tactaaacac	420
ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta	480
actaaccacg gtccaacgcc agtaaaaaaa ggtagtaaag atccccgagg tggatatttt	540
gacgccgtat ttacaagagg taaccaaagt aagctattga caagtcgtca tgattttaaa	600
gaaaaaaatc tcaaagaaat cagtgatctc attaaggaag agttaaccaa aggcaaggct	660
ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcatacaacc atgtttataaa cctgtgggga	720
gctgactttg attctaacgg gaaccttaaa gctatttatg taacagactc tgatagtaata	780
gcatctattg gtatgaagaa atactttggt ggtgttaatt ccgctggaaa agtagctatt	840
tctgctaaag aaataaaaaga agataatata ggtgctcaag tactagggtt atttacactt	900
tcaacagggc aaaaaagttg gaatcagacc aatggcggtg gccatcatca ccatcaccac	960

<210> 30
 <211> 957
 <212> ДНК
 <213> *Streptococcus pyogenes*

<400> 30
 atggatagtt tttctgctaa tcaagagatt agatattcgg aagtaacacc ttatcacggt 60
 acttccgttt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tcaactcaagg tgaagatggt 120
 tttcacgctc cttatgttgc taaccaagga tggtagata ttaccaaacc attcaatgga 180
 aaagacgata ttctttgcgg ggctgccaca gcagggaata tgcttcaactg gtgggttcgat 240
 caaaacaaag accaaattaa acgttatttg gaagagcatt cagaaaagca aaaaataaac 300
 ttcaatggcg aacagatggt tgacgtaaaa gaagctatcg aactaaaaa ccaccagcta 360
 gatagtaaat tatttgaata ttttaaagaa aaagctttcc cttatctatc tactaaacac 420
 ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta 480
 actaaccacg gtccaacgcc agtaaaagaa ggtagtaaag atccccgagg tggtagtttt 540
 gacgccgtat ttacaagagg tgatcaaagt aagctattga caagtcgtca tgatttttaa 600
 gaaaaaaatc tcaagaaat cagtgatctc attaagaaag agttaaccga aggcaaggct 660
 ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcattcaacc atgttataaa cctgtgggga 720
 gctgactttg attctaacgg gaaccttaaa gctatttatg taacagactc tgatagtaat 780
 gcatctattg gtatgaagaa atactttggt ggtgttaatt ccgctggaaa agtagctatt 840
 tctgctaaag aaataaaaga agataatata ggtgctcaag tactagggtt atttacactt 900
 tcaacagggc aagatagttg ggggtggcggc ggtggccatc atcaccatca ccactaa 957

<210> 31
 <211> 903
 <212> ДНК
 <213> *Streptococcus pyogenes*

<400> 31
 atgtccgttt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tcaactcaagg tgaagatggt 60
 tttcacgctc cttatgttgc taaccaagga tggtagata ttaccaaacc attcaatgga 120
 aaagacgata ttctttgcgg ggctgccaca gcagggaata tgcttcaactg gtgggttcgat 180
 caaaacaaag accaaattaa acgttatttg gaagagcatt cagaaaagca aaaaataaac 240
 ttcaatggcg aacagatggt tgacgtaaaa gaagctatcg aactaaaaa ccaccagcta 300
 gatagtaaat tatttgaata ttttaaagaa aaagctttcc cttatctatc tactaaacac 360
 ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta 420
 actaaccacg gtccaacgcc agtaaaagaa ggtagtaaag atccccgagg tggtagtttt 480

gacgccgtat ttacaagagg tgatcaaagt aagctattga caagtcgtca tgattttaaa	540
gaaaaaaatc tcaaagaaat cagtgatctc attaagaaag agttaaccga aggcaaggct	600
ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcatacaacc atgtttataaa cctgtgggga	660
gctgactttg attctaacgg gaaccttaaa gctattttatg taacagactc tgatagtaat	720
gcatctattg gtatgaagaa atactttgtt ggtgttaatt ccgctggaaa agtagctatt	780
tctgctaaag aaataaaaaga agataatata ggtgctcaag tactagggtt atttacactt	840
tcaacagggc aagatagttg gaatcagacc aatggcggtg gccatcatca ccatcaccac	900
taa	903

<210> 32
 <211> 903
 <212> ДНК
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 32	
atgtccgttt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tcaactcaagg tgaagatggt	60
tttcacgctc cttatgttgc taaccaagga tggatgata ttaccaaaac attcaatgga	120
aaagacgata ttctttgcgg ggctgccaca gcagggaata tgcttactg gtgggtcgat	180
caaaacaaag accaaattaa acgttattttg gaagagcatc cagaaaagca aaaaataaac	240
ttcaaaggcg aacagatggt tgacgtaaaa gaagctatcg aactaaaaa ccaccagcta	300
gatagtaaata tatttgaata ttttaaagaa aaagctttcc cttatctatc tactaaacac	360
ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta	420
actaaccacg gtccaacgcc agtaaaagaa ggtagtaaag atccccgagg tggatTTTTT	480
gacgccgtat ttacaagagg taaccaaagt aagctattga caagtcgtca tgattttaaa	540
gaaaaaaatc tcaaagaaat cagtgatctc attaagaaag agttaaccga aggcaaggct	600
ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcatacaacc atgtttataaa cctgtgggga	660
gctgactttg attctaacgg gaaccttaaa gctattttatg taacagactc tgatagtaat	720
gcatctattg gtatgaagaa atactttgtt ggtgttaatt ccgctggaaa agtagctatt	780
tctgctaaag aaataaaaaga agataatata ggtgctcaag tactagggtt atttacactt	840
tcaacagggc aagatagttg gaatcagacc aatggcggtg gccatcatca ccatcaccac	900
taa	903

<210> 33
 <211> 903
 <212> ДНК
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 33	
atgtccgttt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tcaactcaagg tgaagatggt	60

tttcacgctc cttatgttgc taaccaagga tggatgata ttaccaaacc attcaatgga	120
aaagacgac ttctttgcgg ggctgccaca gcaggaata tgcttactg gtggttcgat	180
caaaacaaag accaaattga acgttatttg gaagagcatc cagaaaagca aaaaataaac	240
ttcaaaggcg aacagatggt tgacgtaaaa aaagctatcg aactaaaaa ccaccagcta	300
gatagtaaatt ttttgaata ttttaaagaa aaagctttcc cttatctatc tactaaacac	360
ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta	420
actaaccacg gtccaacgcc agtaaaagaa ggtagtaaag atccccgagg tggatatttt	480
gacgccgtat ttacaagagg taaccaaaagt aagctattga caagtcgtca tgattttaaa	540
gaaaaaaatc tcaaagaaat cagtgatctc attaaggaag agttaacca aggcaaggct	600
ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcacaaacc atgttataaa cctgtgggga	660
gctgactttg attctaacgg gaaccttaaa gctatttatg taacagactc tgatagtaat	720
gcatctattg gtatgaagaa atactttggt ggtgttaatt ccgctggaaa agtagctatt	780
tctgctaaag aaataaaaga agataatata ggtgctcaag tactagggtt atttacactt	840
tcaacagggc aaaaaagttg gaatcagacc aatggcgggt gccatcatca ccatcaccac	900
taa	903

<210> 34
 <211> 963
 <212> ДНК
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 34	
atggacgatt accaaaggaa tgctacggaa gcttatgcca aagaagtacc acatcagatc	60
acttccgttt ggaccaaagg agttactcct ccagcaaact tcaactcaagg tgaagatggt	120
tttcacgctc cttatgttgc taaccaagga tggatgata ttaccaaacc attcaatgga	180
aaagacgac ttctttgcgg ggctgccaca gcaggaata tgcttactg gtggttcgat	240
caaaacaaag accaaattga acgttatttg gaagagcatc cagaaaagca aaaaataaac	300
ttcaaaggcg aacagatggt tgacgtaaaa aaagctatcg aactaaaaa ccaccagcta	360
gatagtaaatt ttttgaata ttttaaagaa aaagctttcc cttatctatc tactaaacac	420
ctaggagttt tccctgatca tgtaattgat atgttcatta acggctaccg ccttagtcta	480
actaaccacg gtccaacgcc agtaaaagaa ggtagtaaag atccccgagg tggatatttt	540
gacgccgtat ttacaagagg taaccaaaagt aagctattga caagtcgtca tgattttaaa	600
gaaaaaaatc tcaaagaaat cagtgatctc attaaggaag agttaacca aggcaaggct	660
ctaggcctat cacacaccta cgctaacgta cgcacaaacc atgttataaa cctgtgggga	720
gctgactttg attctaacgg gaaccttaaa gctatttatg taacagactc tgatagtaat	780
gcatctattg gtatgaagaa atactttggt ggtgttaatt ccgctggaaa agtagctatt	840

tctgctaaag aaataaaaga agataatata ggtgctcaag tactagggtt atttacactt 900
tcaacagggc aaaaaagttg gaatcagacc aatggcggtg gccatcatca ccatcaccac 960
taa 963

<210> 35
<211> 19
<212> белок
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 35

Ser Phe Ser Ala Asn Gln Glu Ile Arg Tyr Ser Glu Val Thr Pro Tyr
1 5 10 15

His Val Thr

<210> 36
<211> 19
<212> белок
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 36

Asp Tyr Gln Arg Asn Ala Thr Glu Ala Tyr Ala Lys Glu Val Pro His
1 5 10 15

Gln Ile Thr

<210> 37
<211> 20
<212> белок
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 37

Asp Asp Tyr Gln Arg Asn Ala Thr Glu Ala Tyr Ala Lys Glu Val Pro
1 5 10 15

His Gln Ile Thr
20

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, обладающий активностью цистеиновой протеазы в отношении IgG и включающий вариант последовательности SEQ ID NO:2, причем этот вариант:

5 (a) по меньшей мере на 50% идентичен SEQ ID NO: 2;

(b) имеет цистеин (C) в том положении указанного варианта последовательности, которое соответствует положению 94 в SEQ ID NO: 1; и необязательно

10 (c) имеет в тех положениях указанного варианта последовательности, которые соответствуют положениям 84, 262, 284 и 286 в SEQ ID NO: 1, лизин (K), гистидин (H), аспарагиновую кислоту (D) и аспарагиновую кислоту (D), соответственно;

и где указанный полипептид более эффективно расщепляет IgG, чем IdeS, и/или обладает меньшей иммуногенностью, чем IdeS.

15 2. Полипептид по п. 1, в котором вариант последовательности SEQ ID NO: 2:

(1) имеет положительно заряженную аминокислоту в том положении варианта, которое соответствует положению 130 в SEQ ID NO: 1, и положительно заряженная аминокислота необязательно представляет собой аргинин (R) или лизин (K); и/или

20 (2) имеет положительно заряженную аминокислоту в том положении варианта, которое соответствует положению 131 в SEQ ID NO: 1, и положительно заряженная аминокислота необязательно представляет собой аргинин (R) или лизин (K); и/или

(3) не включает непрерывной последовательности NQTN; и/или

25 (4) не включает непрерывной последовательности DSFSANQEIR YSEVTPYHVT.

3. Полипептид по п. 1 или п. 2, в котором вариант последовательности SEQ ID NO: 2 по меньшей мере на 80%, 90%, 95% или 99% идентичен SEQ ID NO: 2.

30 4. Полипептид по любому из пп. 1-3, который включает или состоит из любой из последовательностей SEQ ID NO: 3-16, где указанная последовательность

необязательно включает дополнительный метионин на N-конце и/или гистидиновую метку на C-конце.

5 5. Полипептид по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что полипептид обладает эффективностью при расщеплении IgG, которая по меньшей мере в 1,5 раза, 2,0 раза, 2,5 раза, 3,0 раза, 4,0 раза, 4,5 раза, 5,0 раз, 6,0 раз, 7,0 раз или 7,5 раз превышает эффективность IdeS, определяемую с помощью одного и того же анализа.

10 6. Полипептид по любому из пп. 1-5, который обладает меньшей иммуногенностью, чем IdeS, и предпочтительно иммуногенность указанного полипептида составляет не более 85% от иммуногенности IdeS, определяемой с помощью того же анализа.

7. Полинуклеотид или экспрессионный вектор, который включает последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую полипептид по любому из пп. 1-6.

15 8. Клетка-хозяин, включающая полинуклеотид или экспрессионный вектор по п. 7, которая предпочтительно представляет собой бактериальную клетку, наиболее предпочтительно – клетку *E. coli*.

9. Композиция, включающая полипептид по любому из пп. 1-6 и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

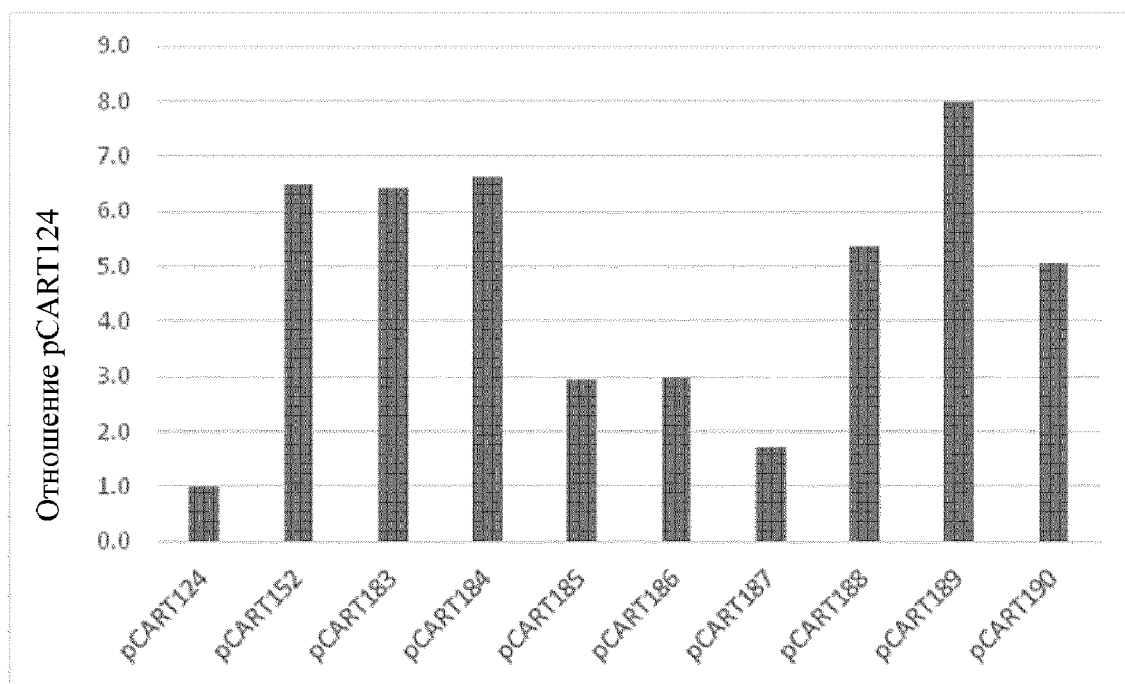
20 10. Полипептид по любому из пп. 1-6 для применения в лечении человека или животного.

25 11. Способ профилактики или лечения заболевания или состояния у субъекта, отличающийся тем, что способ включает введение субъекту полипептида по любому из пп. 1-6 в профилактически или терапевтически эффективном количестве.

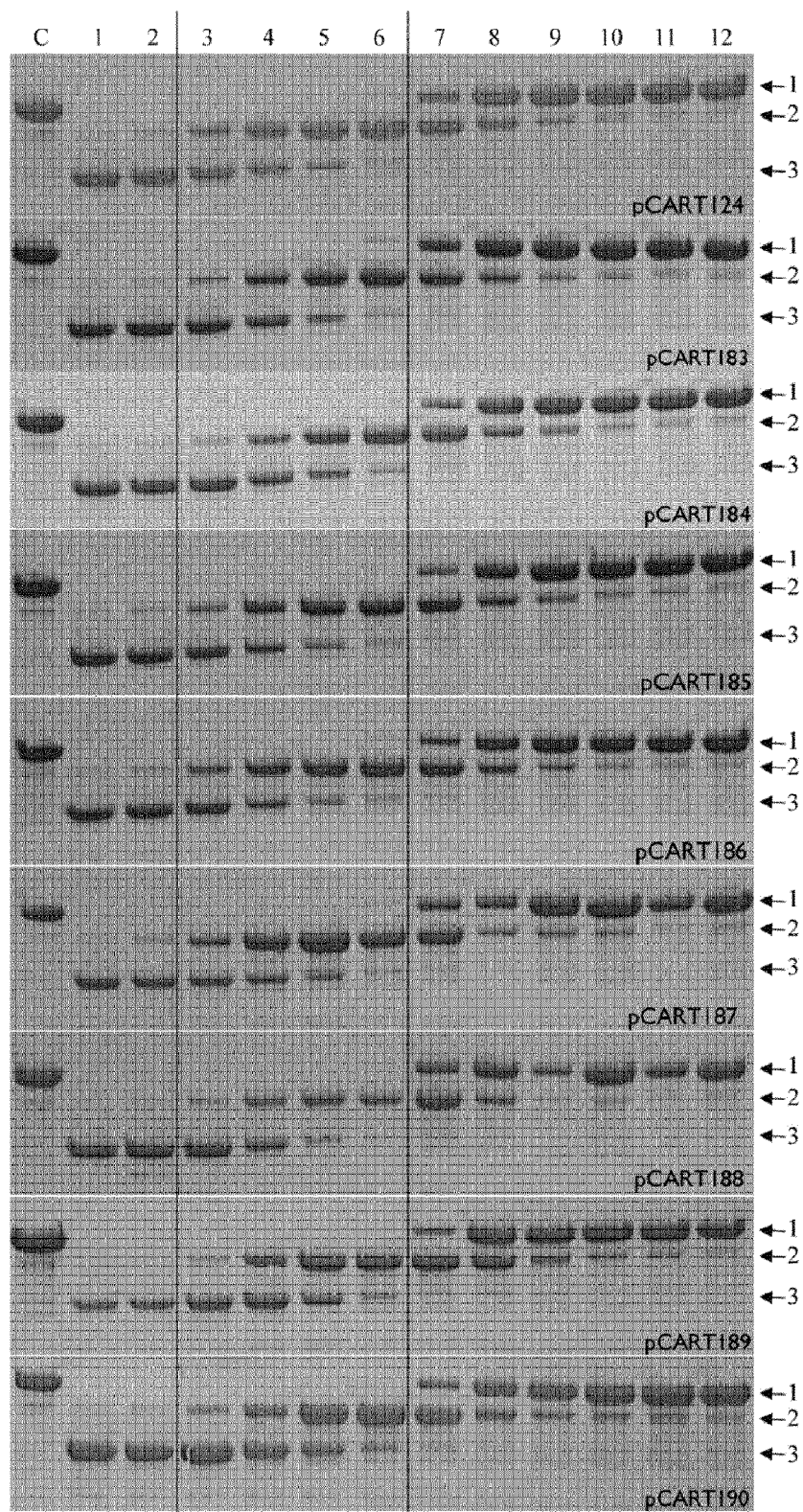
12. Способ по п. 11, где указанное заболевание или состояние представляет собой заболевание или состояние, полностью или частично опосредуемое патогенными IgG антителами, и предпочтительно заболевание или состояние упомянуто в Таблице D.

13. Способ расщепления IgG, который включает контакт образца, содержащего IgG, с полипептидом по любому из пп. 1-6, в условиях позволяющих проявиться активности IgG-цистеиновой протеазы.

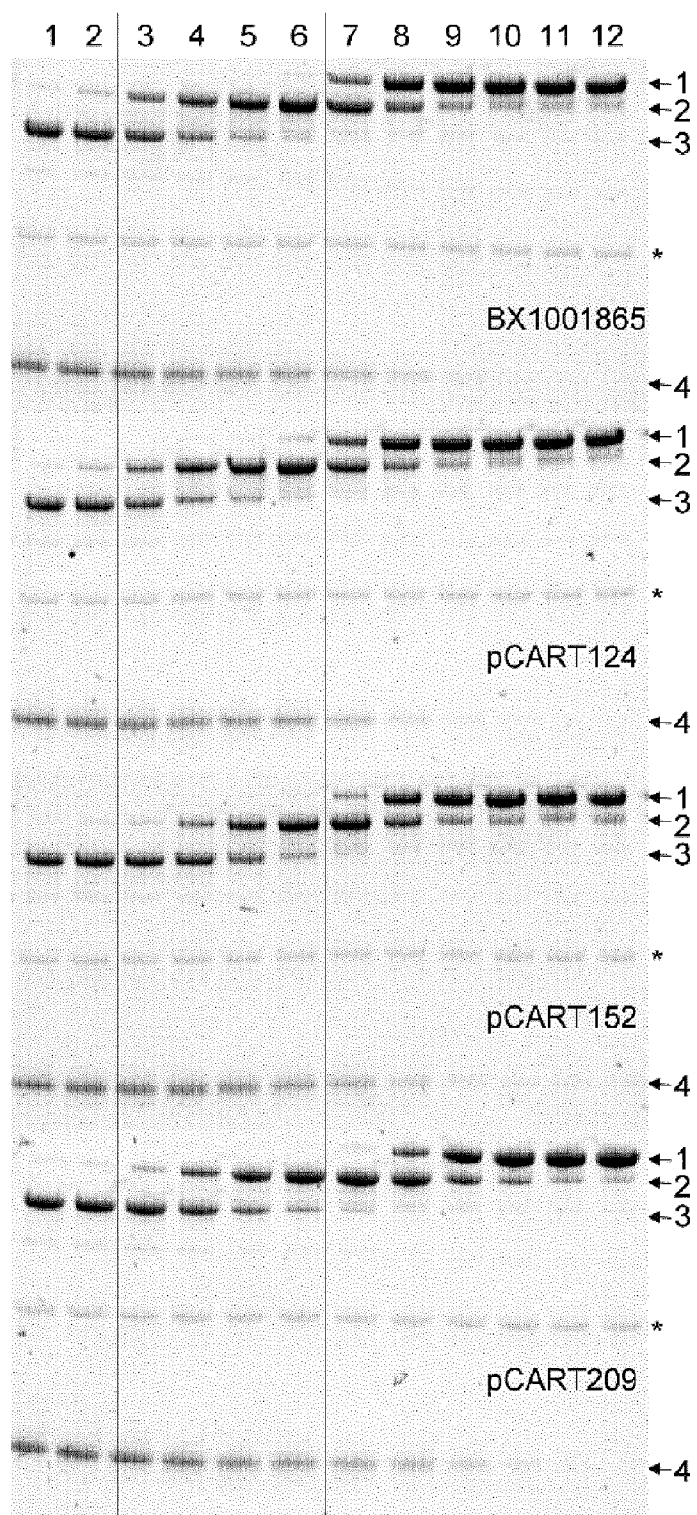
5 14. Способ по п. 13, который выполняют *ex vivo* и/или выполняют для получения Fc и Fab фрагментов и/или в котором образец представляет собой образец крови, отобранный у субъекта, имеющего заболевание или состояние, определенное в п. 12.



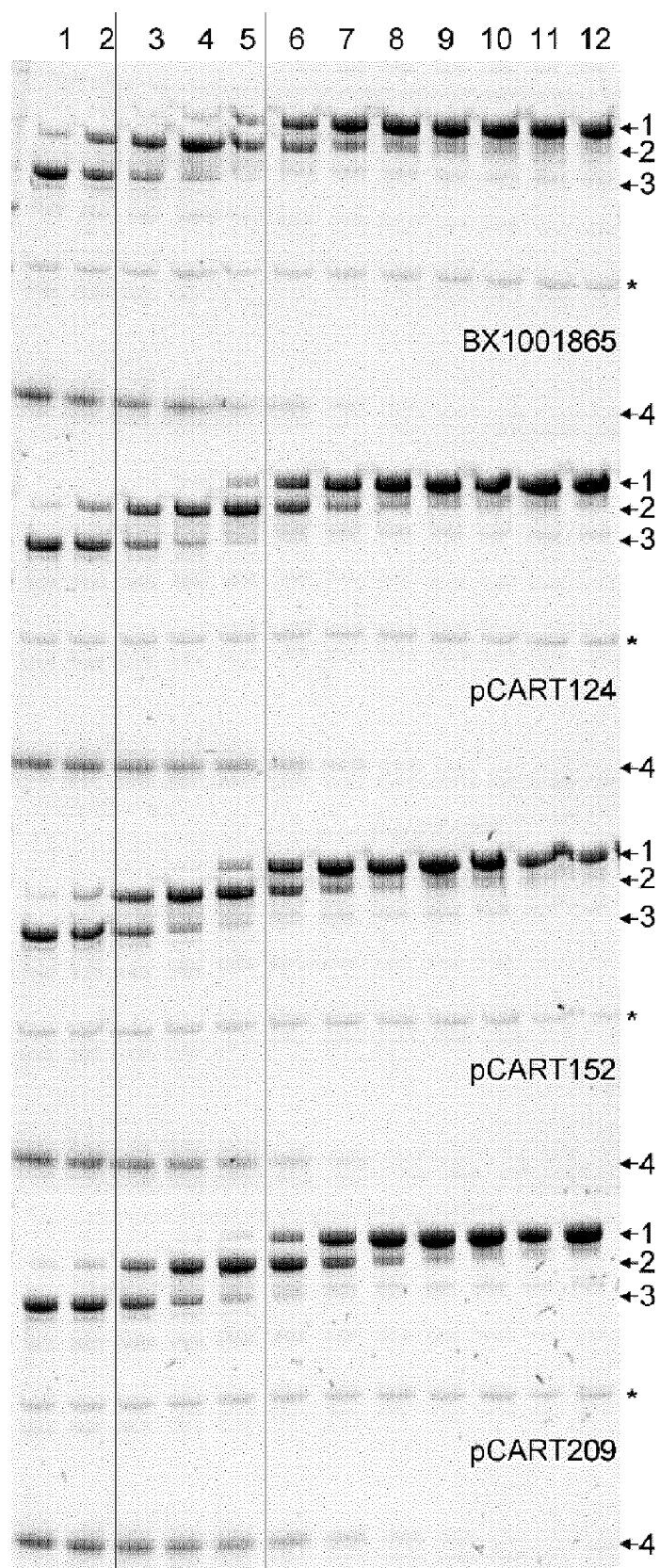
ФИГ. 1



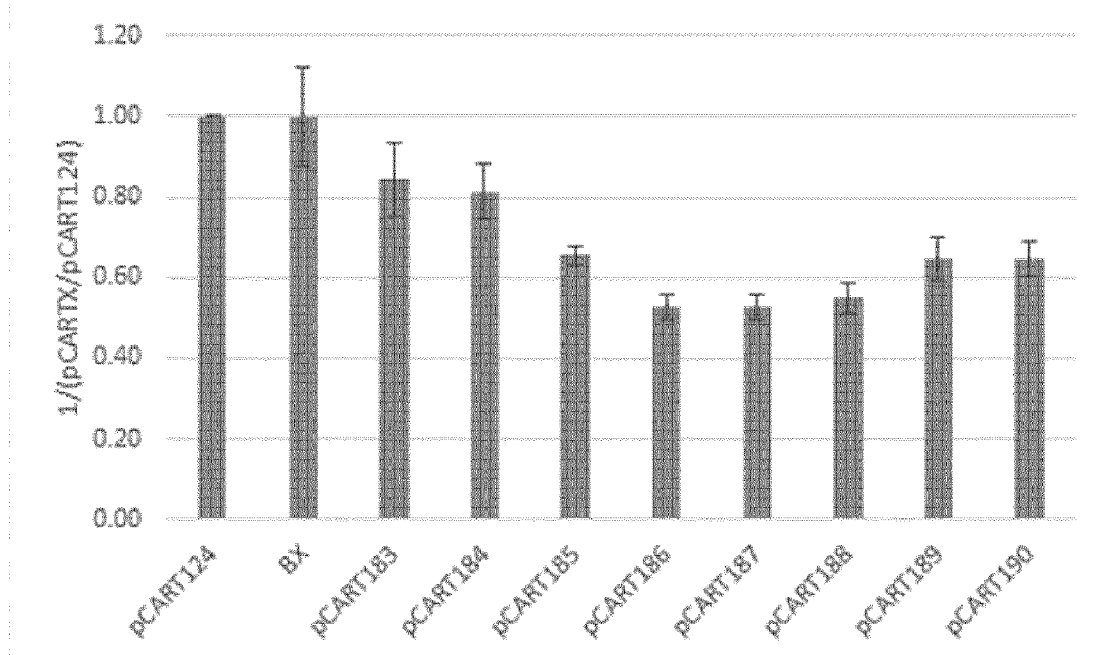
ФИГ. 2



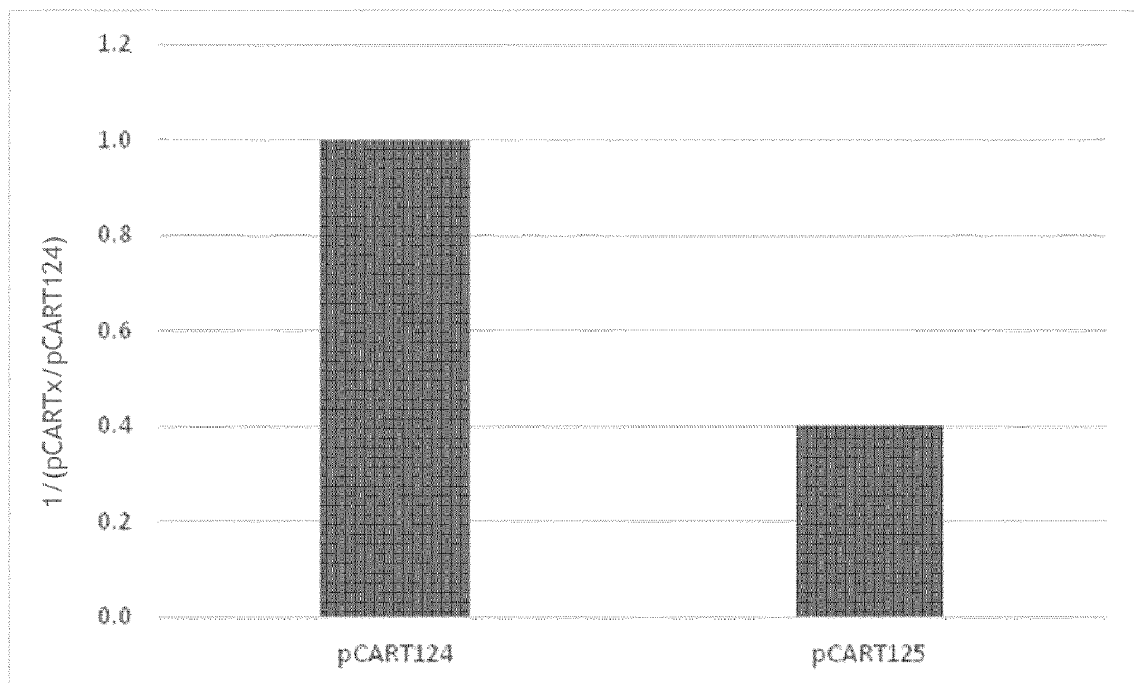
ФИГ. 3



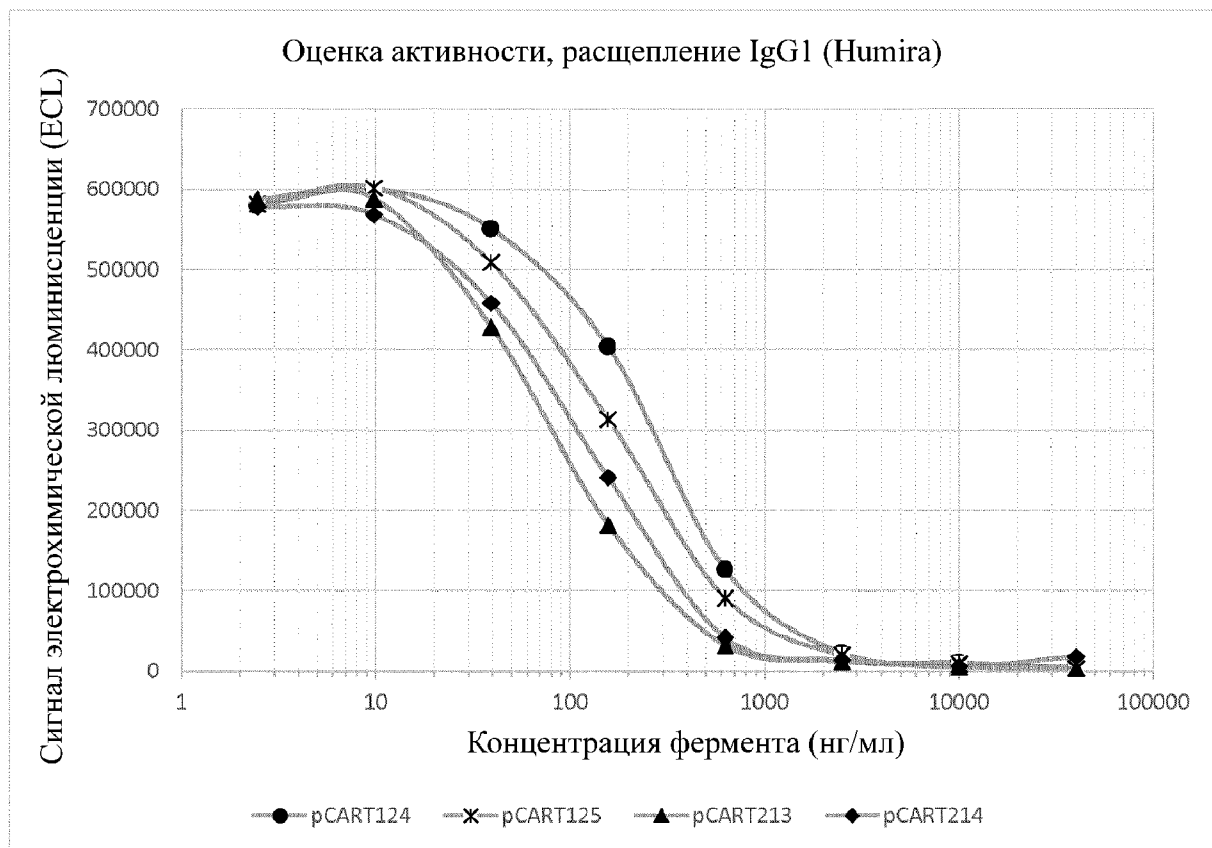
ФИГ. 4



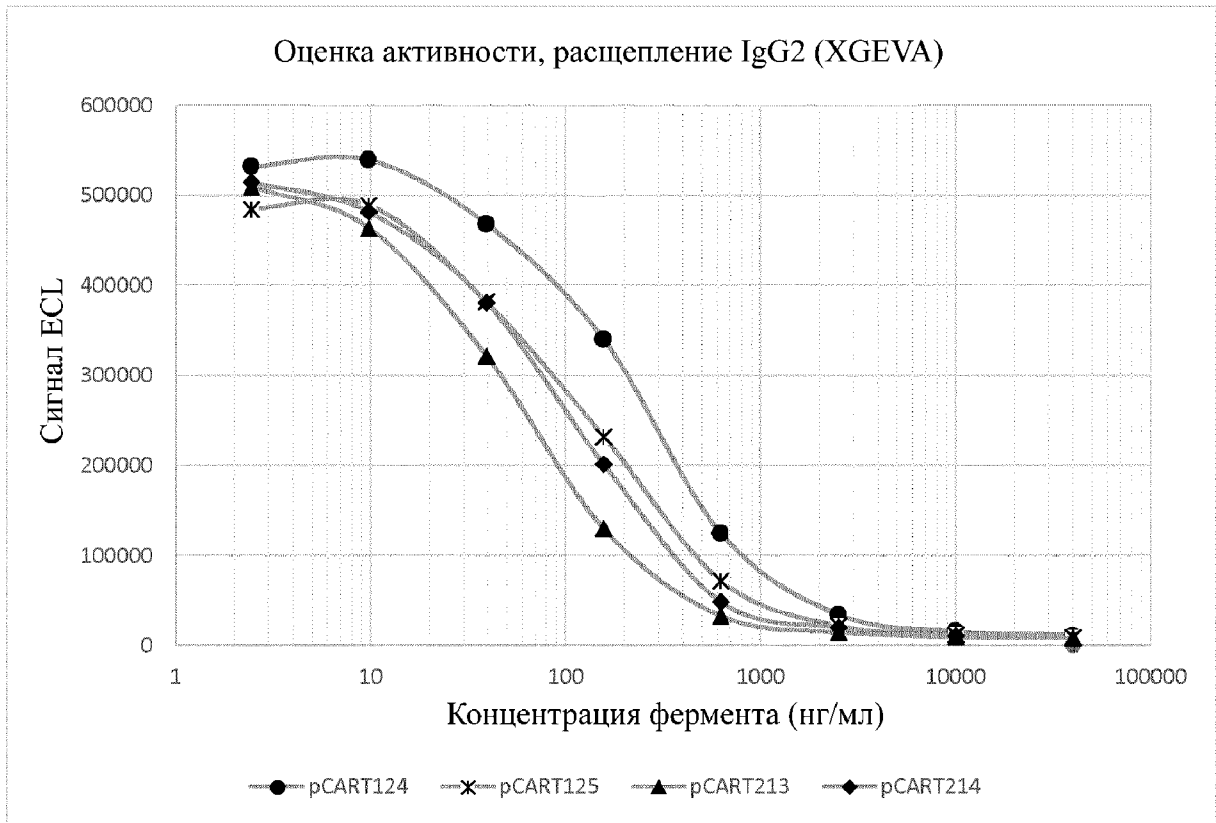
ФИГ. 5



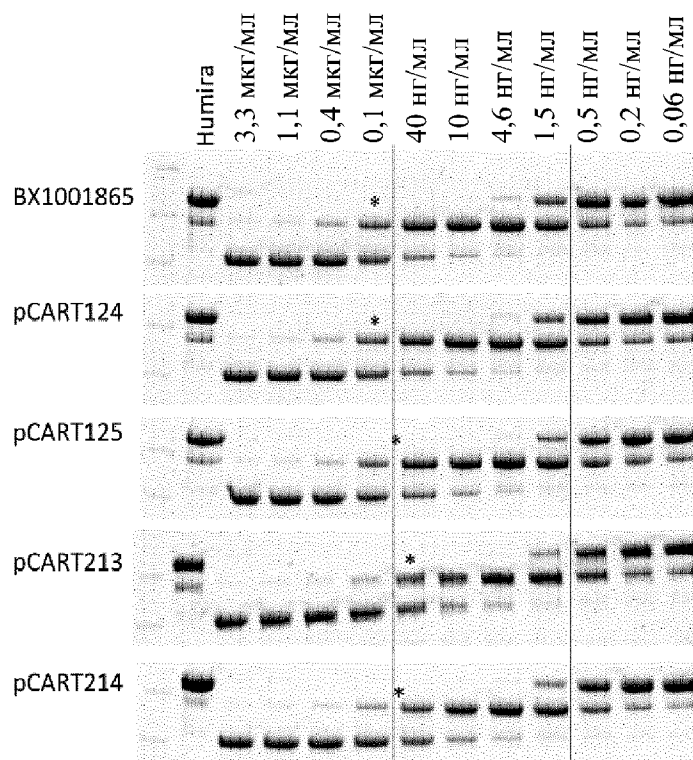
ФИГ. 6



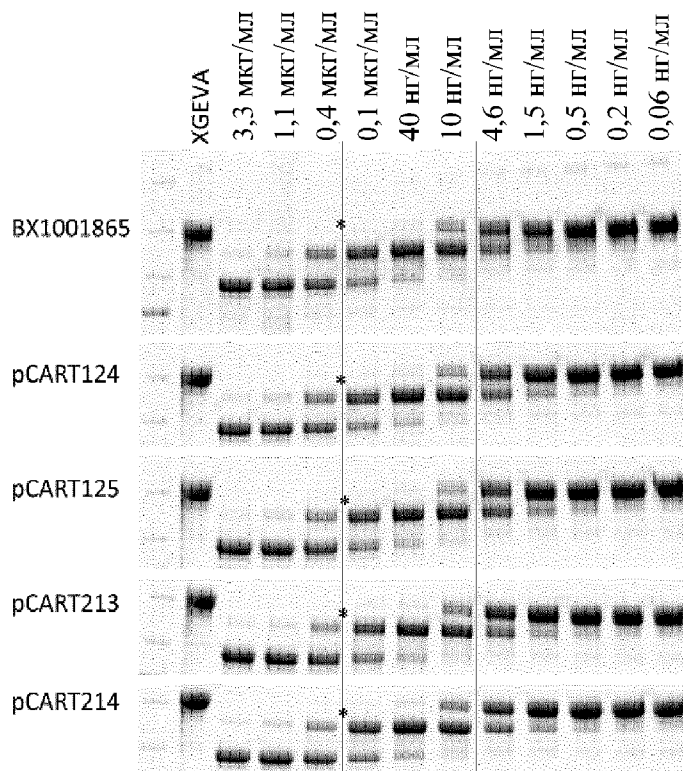
ФИГ. 7



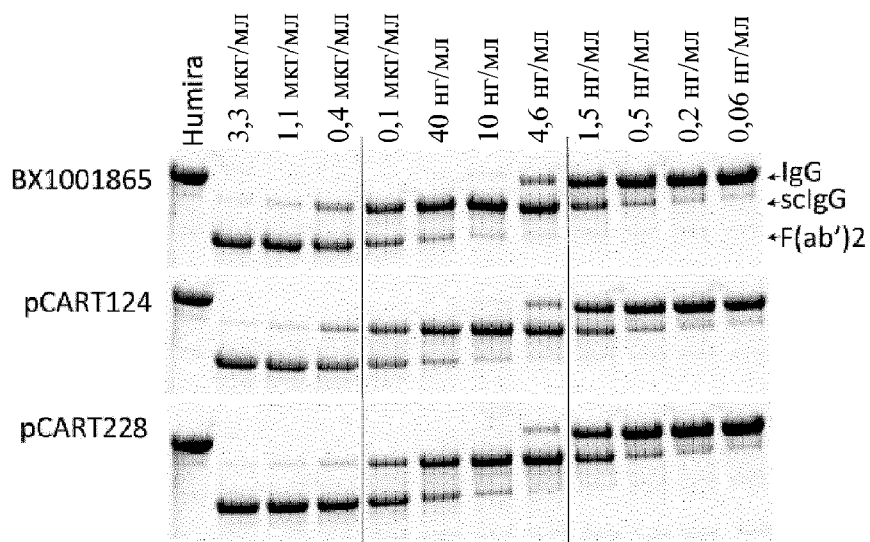
ФИГ. 8



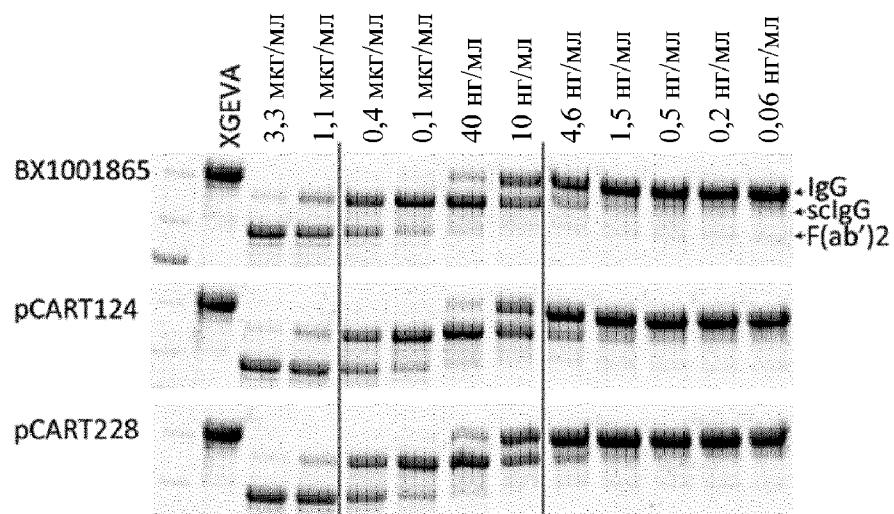
ФИГ. 9А



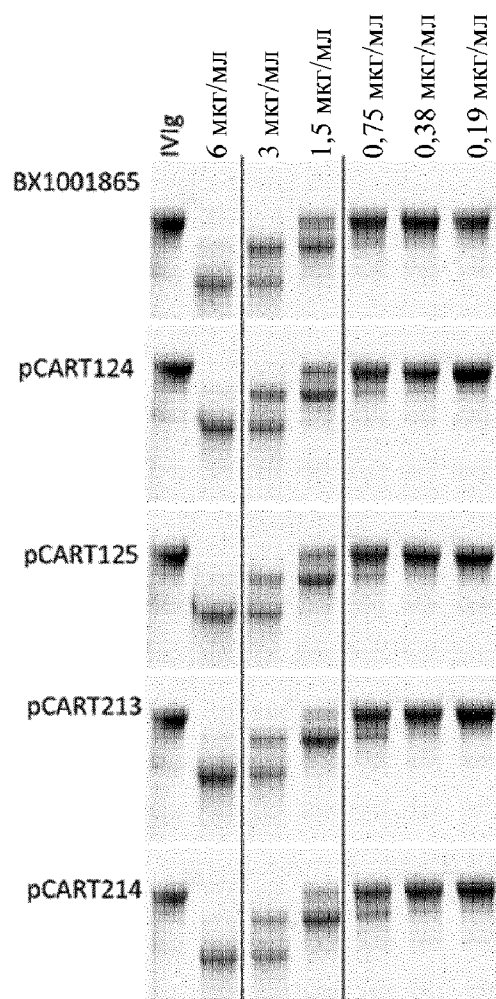
ФИГ. 9В



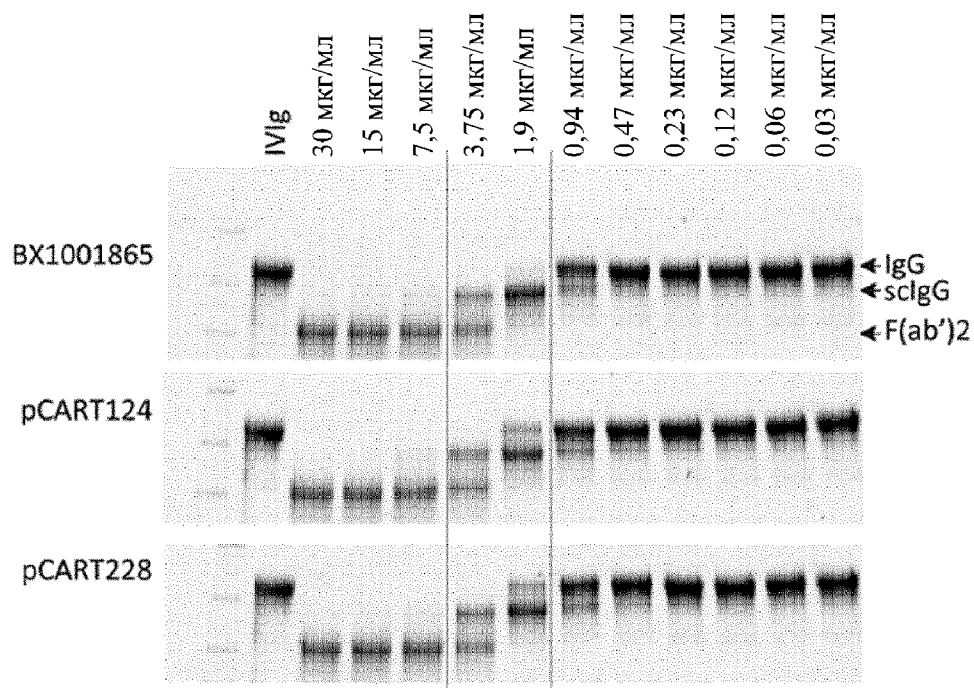
ФИГ. 10А



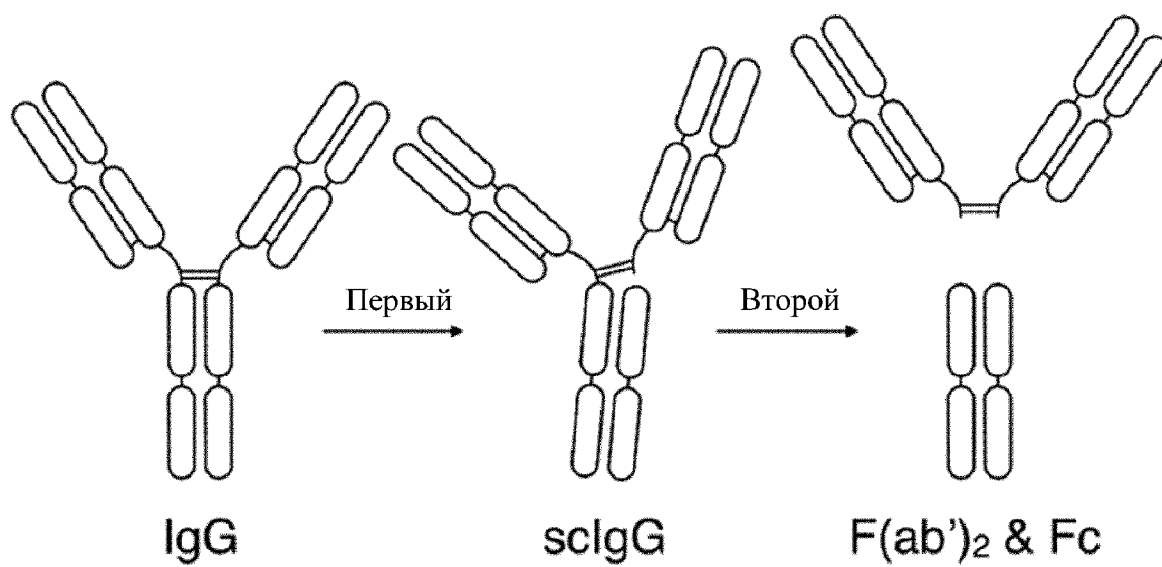
ФИГ. 10В



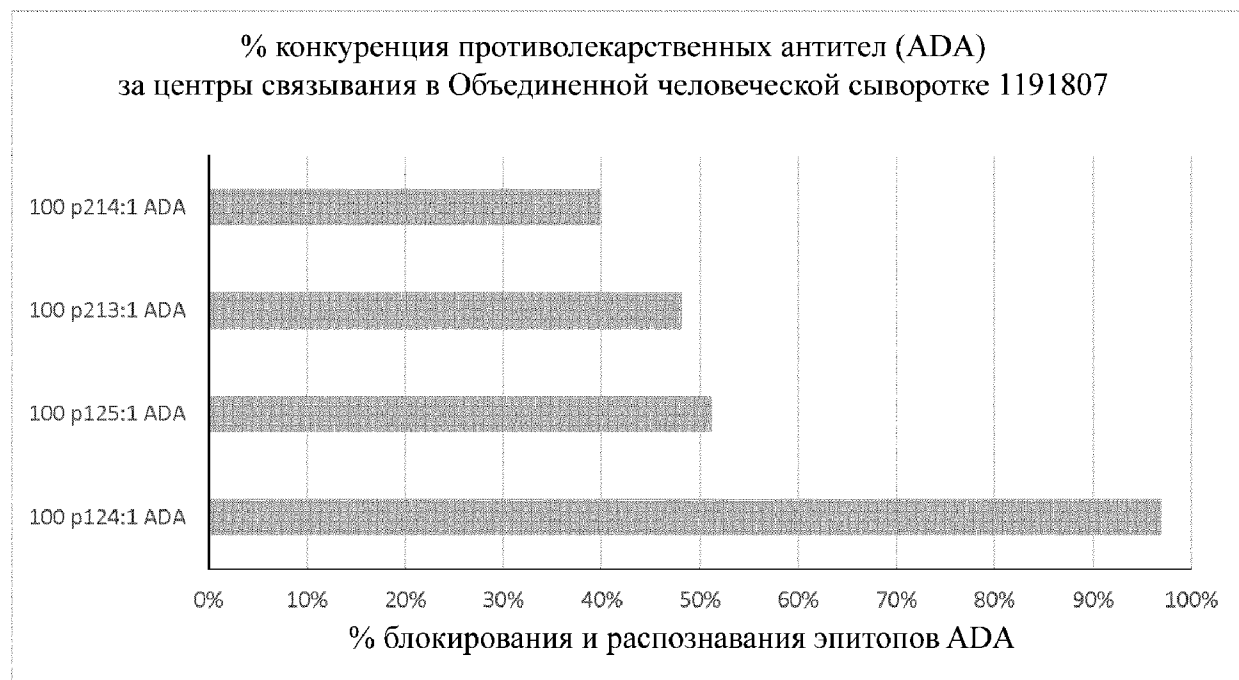
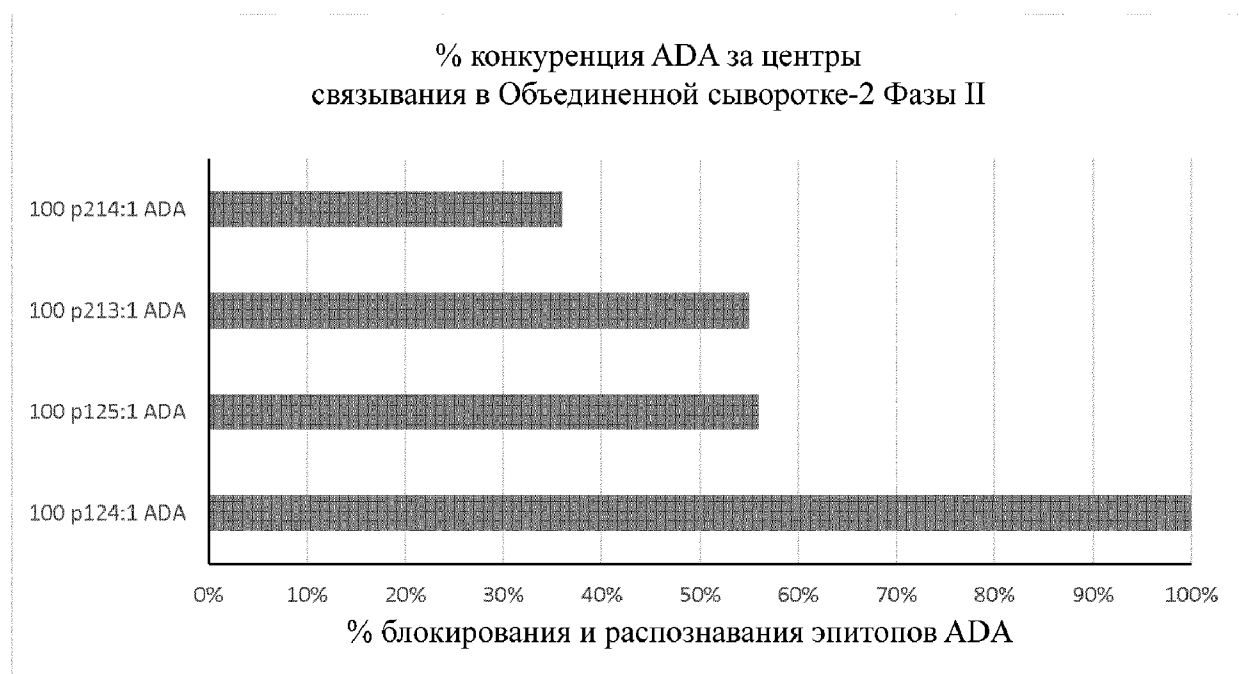
ФИГ. 11

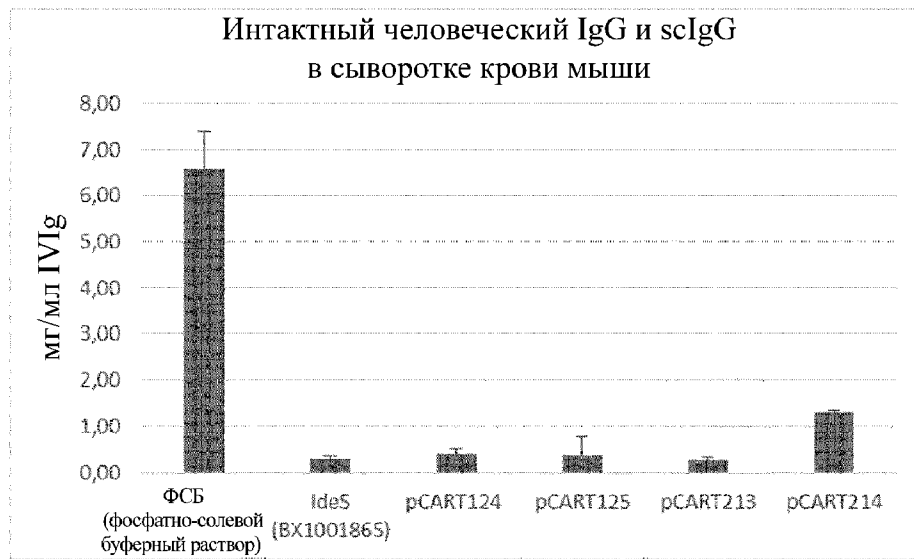


ФИГ. 12



ФИГ. 13

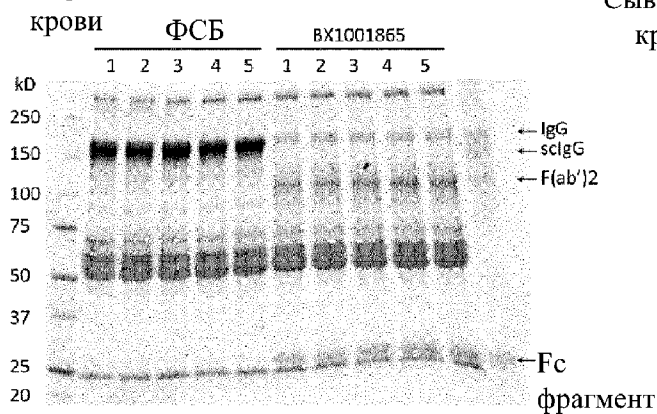
**ФИГ. 14**



ФИГ. 16

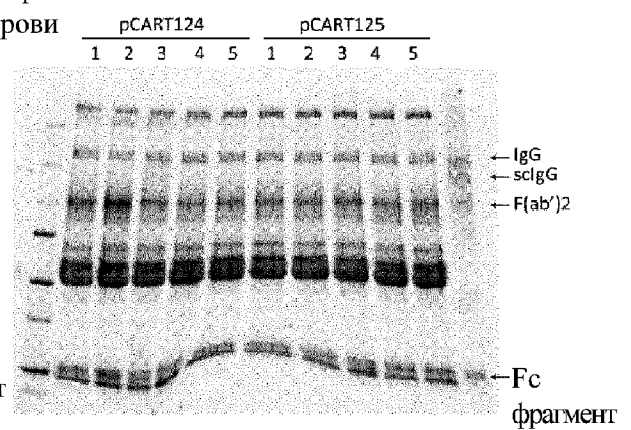
Сыворотка

крови



Сыворотка

крови



Сыворотка

крови

