

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201791775** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2018.02.28

(51) Int. Cl. **C12N 9/24 (2006.01)**

(22) Дата подачи заявки
2016.02.12

(54) ЦИСТЕИНОВАЯ ПРОТЕАЗА

(31) **1502305.4**

(32) **2015.02.12**

(33) **GB**

(86) **PCT/EP2016/053054**

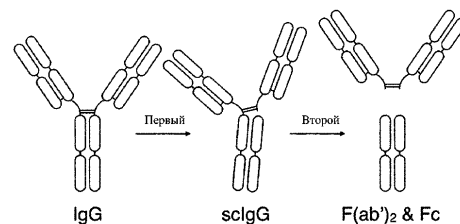
(87) **WO 2016/128559 2016.08.18**

(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., Дощечкина 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 *in vivo* и *ex vivo*. Применение полипептида включает способы профилактики или лечения заболеваний и состояний, опосредуемых IgG, и способы анализа IgG.



201791775 A1

201791775

A1

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 более высоких или повторных дозировок для достижения того же эффекта. ADA,
- 25 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-специфических молекул ADA в организме пациента может быть определено любым
- 30 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 IVlg (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 проанализировали последовательность IdeS и сравнили ее с последовательностью белка IdeZ, который приблизительно на 66% идентичен IdeS. IdeZ представляет собой IgG-цистеиновую протеазу, вырабатываемую *Streptococcus equi ssp. zooepidemicus*, бактериями, имеющимися в основном в организме
30 лошадей. Поскольку IdeZ не является человеческим патогенным микроорганизмом, в плазме крови людей обычно не имеется антител к этому белку. Однако, IdeZ имеет уровень активности IgG-цистеиновой протеазы по отношению к человеческому IgG, который значительно ниже уровня активности IdeS. Авторы настоящего изобретения исследовали те положения последовательности IdeZ, которые повышают его активность по отношению к человеческому IgG, но при этом
35

не приводят к значительному повышению иммуногенности. В качестве исходных веществ для настоящего исследования авторы изобретения использовали последовательность IdeZ и последовательность новой гибридной последовательности, сконструированной авторами изобретения, которая на 81,7% идентична последовательности IdeS и на 81% идентична последовательности IdeZ. Согласно настоящему изобретению, эта гибридная последовательность может быть обозначена IdeS/Z.

Полная последовательность IdeS имеется в открытом доступе в виде эталонной последовательности NCBI Reference Sequence No. WP_010922160.1 и в 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 открытом доступе в Genbank, номер доступа ADF13949.1, и в настоящем описании обозначена как SEQ ID NO: 2.

Полная последовательность IdeZ имеется в открытом доступе в виде эталонной последовательности NCBI Reference Sequence No. WP_014622780.1 и в настоящем описании обозначена как SEQ ID NO: 3. Эта последовательность включает N-терминальный метионин, за которым следует сигнальная последовательность секреции из 33 аминокислот. N-терминальный метионин и сигнальную последовательность (всего 34 аминокислоты на N-конце) обычно удаляют для образования зрелого белка IdeZ, последовательность которого в настоящем описании обозначена как SEQ ID NO: 4.

Гибридная последовательность IdeS/Z, созданная авторами изобретения, имеет N-терминальную часть, полученную на основе IdeZ, не содержащую N-терминального метионина и сигнальной последовательности (всего 34 аминокислоты на N-конце). В настоящем описании эта последовательность обозначена SEQ ID NO: 5.

Авторы настоящего изобретения смогли идентифицировать те положения в последовательностях IdeZ и гибридного IdeS/Z, которые в результате проведения модификации, рассмотренной в настоящем описании, позволяют получать новые полипептиды, обладающие более высокой активностью IgG-цистеиновой протеазы по отношению к человеческому IgG, чем IdeZ. Активность IgG-цистеиновой протеазы

по отношению к человеческому IgG, которой обладает полипептид согласно изобретению, предпочтительно по меньшей мере равна активности IgG-цистеиновой протеазы по отношению к человеческому IgG, которой обладает IdeS. Полипептид согласно изобретению может эффективнее расщеплять первую цепь молекулы IgG, чем вторую цепь (см. схему на Фиг. 18), в частности, если IgG представляет собой изотип IgG2. Полипептид согласно изобретению может эффективнее расщеплять IgG1, чем IgG2. Полипептид согласно изобретению обычно обладает меньшей иммуногенностью, чем IdeS, и предпочтительно может быть не более иммуногенным, чем IdeZ или IdeS/Z.

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: 3, начиная с N-конца. Таким образом, поскольку SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5 не имеют N-терминального метионина и сигнальной последовательности из 33 аминокислот, имеющих в SEQ ID NO: 3, остаток аспарагиновой кислоты (D) на N-конце SEQ ID NO: 4 и SEQ ID NO: 5 обозначен как положение 35, поскольку это положение соответствует положению в SEQ ID NO: 3. Согласно такой схеме нумерации, наиболее критичным для эффективности воздействия цистеиновой протеазы на IgG (далее называемой “активностью IgG-цистеиновой протеазы”) остатком в IdeS является цистеин (C) в положении 102 (68-ой остаток от N-конца SEQ ID NO: 4 и 5). Другими остатками, которые по всей вероятности будут важны для активности IgG-цистеиновой протеазы, являются лизин (K) в положении 92, гистидин (H) в положении 272 и аспарагиновая кислота (D) в каждом из положений 294 и 296. Эти остатки занимают 58-е, 238-е, 260-е и 262-ое положения от N-конца в SEQ ID NO: 4 и 58-е, 236-е, 258-е и 260-е положения от N-конца SEQ ID NO: 5, соответственно.

Таким образом, согласно настоящему изобретению предложен полипептид, обладающий активностью цистеиновой протеазы в отношении IgG и включающий вариант последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, причем этот вариант:

(a) по меньшей мере на 50% идентичен SEQ ID NO: 4 или 5;

(b) имеет цистеин (C) в том положении указанного варианта последовательности, которое соответствует положению 102 SEQ ID NO: 3; и необязательно

(с) имеет в тех положениях указанного варианта последовательности, которые соответствуют положениям 92, 272, 294 и 296 SEQ ID NO: 3, лизин (K), гистидин (H), аспарагиновую кислоту (D) и аспарагиновую кислоту (D), соответственно;

- 5 и при этом указанный полипептид более эффективно расщепляет человеческий IgG, чем IdeZ, и/или по меньшей мере расщепляет человеческий IgG с той же эффективностью, что и IdeS.

Предпочтительно указанный вариант SEQ ID NO: 4 или 5:

- 10 (1) имеет положительно заряженную аминокислоту в том положении варианта, которое соответствует положению 138 SEQ ID NO: 3, 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 139 SEQ ID NO: 3, и положительно заряженная аминокислота необязательно представляет собой аргинин (R) или лизин (K); и/или

(3) не включает непрерывной последовательности DDYQRNATEA YAKEVPHQIT; и/или

(4) имеет по меньшей мере одну из следующих модификаций:

- 20 i. удаление остатков лейцина (L) и треонина (T) в тех положениях варианта, которые соответствуют положениям 64 и 65 в SEQ ID NO: 3;

ii. треонин (T) вместо аргинина (R) в том положении варианта, которое соответствует положению 70 в SEQ ID NO: 3;

- 25 iii. удаление тирозина (Y) в том положении варианта, которое соответствует положению 71 в SEQ ID NO: 3;

iv. глутамин (Q) вместо аспарагина (N) в том положении варианта, которое соответствует положению 72 в SEQ ID NO: 3;

v. глицин (G) вместо аспарагина (N) в том положении варианта, которое соответствует положению 73 в SEQ ID NO: 3;

vi. аланин (A) вместо глутаминовой кислоты (E) в том положении варианта, которое соответствует положению 67 в SEQ ID NO: 3;

vii. аспарагин (N) вместо глутамина (Q) в том положении варианта, которое соответствует положению 68 в SEQ ID NO: 3.

5 По меньшей мере одна модификация (4) обычно выбрана из опций i.-vii., перечисленных выше. Полипептид согласно изобретению может включать вариант последовательности аминокислот SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, причем этот вариант включает по меньшей мере две, три, четыре, пять, шесть или все семь модификаций, описываемых опциями i.-vii.

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

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.

15

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.

20

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

25

- 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;

30

- 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.

10 Краткое описание графических материалов

На Фиг. 1 и 2 представлены результаты репрезентативного анализа определения активности (эффективности расщепления ими IgG) полипептидов согласно изобретению по сравнению с контрольными веществами.

15 На Фиг. 3 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.

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

25 На Фиг. 5 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. 6 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.

30 На Фиг. 7 представлены результаты репрезентативного SDS-PAGE анализа в геле, который применяли для визуализации продуктов расщепления, получаемых

при инкубации IVIg с полипептидами согласно изобретению или с контрольными веществами.

На Фиг. 8 и 9 представлены результаты репрезентативных анализов конкурентного связывания, проводимых для определения уровня распознавания полипептидов согласно изобретению IdeS-специфичными антителами в сравнении с контрольными веществами.

На Фиг. 10 и 11 представлены результаты репрезентативных анализов титрования, проводимых для определения уровня распознавания полипептидов согласно изобретению IdeS-специфичными антителами в сравнении с контрольными веществами.

На Фиг. 12 представлены репрезентативные кривые титрования при расщеплении IgG1 различными полипептидами IgG-цистеиновой протеазы.

На Фиг. 13 представлены репрезентативные кривые титрования при расщеплении IgG2 различными полипептидами IgG-цистеиновой протеазы.

На Фиг. 14 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. 15 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. 16 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. 17 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. 18 схематично представлено расщепление иммуноглобулинов полипептидами согласно изобретению.

На Фиг. 19 представлены результаты репрезентативного анализа % конкуренции за центры связывания ADA между полипептидами согласно изобретению и контрольными веществами.

На Фиг. 20 представлены результаты другого репрезентативного анализа % конкуренции за центры связывания ADA между полипептидами согласно изобретению и контрольными веществами.

На Фиг. 21 представлены репрезентативные результаты анализа эффективности ELISA, применяемого для определения эффективности расщепления IgG человека под действием полипептидов согласно изобретению *in vivo*.

На Фиг. 22 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 также называется Эталонной последовательностью NCBI No. WP_010922160.1

SEQ ID NO: 2 представляет собой зрелую последовательность IdeS, не включающую N-терминальный метионин и сигнальную последовательность. Она также имеется в Genbank, номер доступа ADF13949.1

SEQ ID NO: 3 представляет собой полную последовательность IdeZ, включающую N-терминальный метионин и сигнальную последовательность. Она также называется Эталонной последовательностью NCBI No. WP_014622780.1.

SEQ ID NO: 4 представляет собой зрелую последовательность IdeZ, не включающую N-терминальный метионин и сигнальную последовательность.

SEQ ID NO: 5 представляет собой последовательность гибридного белка IdeS/Z, сконструированного авторами изобретения. N-конец получен на основе IdeZ, не имеющей N-терминального метионина и сигнальной последовательности.

5 SEQ ID NO: 6-25 представляют собой последовательности примеров полипептидов согласно изобретению.

10 SEQ ID NO: 26 представляет собой последовательность полипептида IdeS, применяемого согласно настоящему изобретению в качестве контрольного вещества. Включает последовательность SEQ ID NO: 2, содержащую дополнительный N-терминальный метионин и гистидиновую метку (внутренняя ссылка pCART124).

15 SEQ ID NO: 27 представляет собой последовательность полипептида IdeZ, применяемого согласно настоящему изобретению в качестве контрольного вещества. Включает последовательность SEQ ID NO: 4, содержащую дополнительный N-терминальный метионин и гистидиновую метку (внутренняя ссылка pCART144).

20 SEQ ID NO: 28 представляет собой последовательность полипептида IdeS/Z, применяемого согласно настоящему изобретению в качестве контрольного вещества. Включает последовательность SEQ ID NO: 5, содержащую дополнительный N-терминальный метионин и гистидиновую метку (внутренняя ссылка pCART145).

SEQ ID NO: 29 представляет собой непрерывную последовательность PLTPEQFRYNN, которая соответствует положениям 63-73 в SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 30 представляет собой непрерывную последовательность PPANFTQG, которая соответствует положениям 58-65 в SEQ ID NO: 1.

25 SEQ ID NO: 31 представляет собой непрерывную последовательность DDYQRNATEAYAKEVPHQIT, которая соответствует положениям 35-54 в SEQ ID NO: 3.

30 SEQ ID NO: 32 представляет собой непрерывную последовательность DSFSANQEIRYSEVTPYHVT, которая соответствует положениям 30-49 в SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 33-55 представляют собой нуклеотидные последовательности, кодирующие полипептиды, рассматриваемые в настоящем описании.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

5 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.

10 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.

15 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
20 встречающимся в природе и/или не встречающимся в природе или синтетическим аминокислотам, включающим оптические изомеры D или L, к аналогам аминокислот и к пептидомиметикам.

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

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

Функциональные признаки полипептида

30 Настоящее изобретение относится к новому полипептиду, обладающему активностью цистеиновой протеазы в отношении IgG (т.е. активностью IgG-

цистеиновой протеазы), и при этом указанный полипептид проявляет большую эффективность при расщеплении IgG, чем IdeZ. Активность IgG-цистеиновой протеазы по отношению к человеческому IgG, которой обладает полипептид согласно изобретению, предпочтительно по меньшей мере равна активности IgG-цистеиновой протеазы по отношению к человеческому IgG, которой обладает IdeS. Кроме того, полипептид согласно изобретению обычно обладает более низкой иммуногенностью, чем IdeS, и предпочтительно может быть не более иммуногенным, чем IdeZ или IdeS/Z. При рассмотрении контроля или сравнения с полипептидом согласно изобретению, "IdeS", "IdeZ" и "IdeS/Z" означают полипептиды, состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 2, 4 и 5, соответственно. В альтернативном варианте или дополнительно "IdeS", "IdeZ" и "IdeS/Z", если их применяют в качестве вещества для контроля или сравнения, могут означать полипептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 4 и 5, соответственно, 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 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 IdeS полипептида, применяемого согласно настоящему изобретению в качестве контрольного, приведена под обозначением SEQ ID NO: 22. Этот полипептид включает последовательность SEQ ID NO: 2, а также дополнительный N-терминальный метионин и гистидиновую метку, и в настоящем описании он может быть обозначен pCART124. Последовательность примера полипептида IdeZ, используемого согласно настоящему изобретению в качестве контроля, обозначена SEQ ID NO: 23. Этот полипептид включает последовательность SEQ ID NO: 4, содержащую дополнительный N-терминальный метионин и гистидиновую метку, и в настоящем описании он может быть обозначен pCART144. Последовательность примера полипептида IdeS/Z, используемого согласно настоящему изобретению в качестве контроля, обозначена SEQ ID NO: 24. Этот полипептид включает последовательность SEQ ID NO: 5, содержащую дополнительный N-терминальный метионин и гистидиновую метку, и в настоящем описании он может быть обозначен pCART145.

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 предпочтительно по меньшей мере в 2,0 раза превышает активность IdeZ, определяемую с помощью того же анализа. В альтернативном варианте активность полипептида согласно изобретению предпочтительно по меньшей мере эквивалентна активности IdeS, определяемой с помощью того же анализа. Активность полипептида согласно изобретению может 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, 7,5 раз или 8,0 раз превышать активность IdeS, определяемую с помощью того же анализа. Активность полипептида согласно изобретению предпочтительно по меньшей мере в 2,0 раза, более предпочтительно по меньшей мере в 3,0 или 4,0 раза и наиболее предпочтительно по меньшей мере в 8,0 раз превышает активность IdeS, определяемую с помощью того же анализа.

Полипептид согласно изобретению обычно обладает меньшей иммуногенностью, чем IdeS, и, таким образом, более высокой активностью, чем IdeZ, и/или активностью, эквивалентной активности IdeS, которая представляет собой приемлемый минимальный стандарт активности цистеиновой протеазы по отношению к человеческому IgG. Однако, более высокая активность, чем у IdeS, является желательным усовершенствованием. Такая повышенная активность обычно 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.

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 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 представляет собой антитело, специфическое для BSA. 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. 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 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 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. Для сравнения также могут быть включены IdeZ и IdeS/Z.

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 с одним или более из следующих полипептидов: IdeS, IdeZ и IdeS/Z, применяемых 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
5 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 IdeZ и/или IdeS (при более низких значениях в серии
титрования), обычно приводит к образованию обнаруживаемого количества
10 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.
Полипептид согласно изобретению может более эффективно расщеплять первую
15 цепь молекулы IgG, чем ее вторую цепь (см. схему на Фиг. 18), в частности, если IgG
представляет собой изотип IgG2. Полипептид согласно изобретению может более
эффективно расщеплять IgG1, чем IgG2.

Этот анализ также может быть адаптирован для определения степени
снижения активности полипептида согласно изобретению в присутствии IdeS-
20 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 IVIg, содержащий IdeS-специфические
ADA, включают реакционную среду. Предпочтительно, на активность полипептида
согласно изобретению не влияет присутствие ADA, или в присутствии ADA его
25 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 обычно обладает
30 меньшей иммуногенностью, чем IdeS. Таким образом, полипептид согласно
изобретению может вызывать такую же или предпочтительно более слабую
ответную реакцию иммунной системы, чем IdeS, определяемую с помощью того же
анализа, при нахождении в эквивалентной дозировке или концентрации.
Иммуногенность полипептида согласно изобретению обычно составляет не более
35 50%, не более 45%, не более 40%, не более 35%, не более 30% или не более 25%

от иммуногенности IdeS, определяемой с помощью того же анализа. Предпочтительно иммуногенность полипептида согласно изобретению составляет не более 25% от иммуногенности IdeS, определяемой с помощью того же анализа.

Анализы для определения иммуногенности полипептида также хорошо 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 на 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; в качестве дополнительных контрольных полипептидов также могут быть применены IdeZ и/или IdeS/Z.

Другой подходящий анализ включает определение степени связывания серии титрования различных концентраций IdeS-специфических ADA, например, препарата IVlg, с испытуемым полипептидом в сравнении с IdeS и/или IdeZ, применяемыми в качестве контроля. 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 контрольного соединения 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 контрольным соединением. 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 лунок.

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, 300 или 310 аминокислот. Полипептид согласно изобретению обычно содержит не более 400, 350, 340, 330, 320 или 315

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 315 аминокислот.

Первичная структура (последовательность аминокислот) полипептида согласно изобретению основана на первичной структуре IdeZ или IdeS/Z, а именно, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, соответственно. Последовательность полипептида согласно изобретению включает вариант последовательности аминокислот SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, который по меньшей мере на 50% идентичен последовательности аминокислот SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. 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: 4 или SEQ ID NO: 5. Вариант может быть идентичен последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 за исключением того, что он включает одну или более специфических модификаций, указанных в настоящем описании. Идентичность последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 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: 4 или SEQ ID NO: 5, или более предпочтительно по всей длине SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

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) 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). 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 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, 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. 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 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 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: 4 или 5, в которую внесены изменения, такие как добавление, изъятие или замена аминокислот по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. 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,	Val (V)	алифатическая, гидрофобная,

	нейтральная		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: 4 или 5. Однако, в таком варианте последовательности предпочтительно остаются определенные остатки аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. Например, в таком варианте последовательности обычно остаются определенные
- 10 остатки, которые, как известно, необходимы для обеспечения активности IgG-цистеиновой протеазы. Таким образом, в аминокислотной последовательности полипептида согласно изобретению должен оставаться цистеин в положении 102 SEQ ID NO: 3 (68-ой остаток SEQ ID NO: 4 или 5). Необязательно также остаются лизин в положении 92, гистидин в положении 272 и аспарагиновая кислота в

положениях 294 и 296 SEQ ID NO: 3. Они представляют собой 58-ой, 238-ой, 260-ый и 262-ой остатки от N-конца SEQ ID NO: 4 и 58-ой, 236-й, 258-й и 260-й остатки от N-конца SEQ ID NO: 5, 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 102 SEQ ID NO: 3; и необязательно имеет в тех положениях указанного варианта последовательности, которые соответствуют положениям 92, 272, 294 и 296 SEQ ID NO: 3, 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, что:

(1) Замена аспарагина (N) в положении 138 SEQ ID NO: 3 положительно заряженной аминокислотой усиливает активность полипептида, который включает это изменение. Таким образом, полипептид согласно изобретению может включать вариант последовательности аминокислот SEQ ID NO: 4 или 5, который имеет положительно заряженную аминокислоту в том положении варианта, которое соответствует положению 138 SEQ ID NO: 3. Обычные положительно заряженные аминокислоты перечислены выше в Таблице А. Положительно заряженная аминокислота предпочтительно представляет собой аргинин (R) или лизин (K). Соответственно, согласно настоящему изобретению, эта конкретная модификация может быть обозначена "N138R/K".

(2) Замена аспарагина (N) в положении 139 SEQ ID NO: 3 положительно заряженной аминокислотой усиливает активность полипептида, который включает это изменение. Таким образом, полипептид согласно изобретению может включать вариант последовательности аминокислот SEQ ID NO: 4 или 5, который имеет положительно заряженную аминокислоту в том положении варианта, которое соответствует положению 139 SEQ ID NO: 3. Обычные положительно заряженные аминокислоты перечислены выше в Таблице А1. Положительно заряженная аминокислота предпочтительно представляет собой аргинин (R) или лизин (K).

Соответственно, согласно настоящему изобретению, эта конкретная модификация может быть обозначена "N139R/K".

(3) Удаление первых двадцати остатков на N-конце SEQ ID NO: 3 может повысить активность полипептида, который включает это изменение, и/или может
 5 снизить его иммуногенность, не оказывая негативного влияния на активность. Первые двадцать остатков на N-конце SEQ ID NO: 3 составляют непрерывную последовательность DDYQRNATEAYAKEVPHQIT. Таким образом, полипептид согласно изобретению может включать вариант последовательности аминокислот
 10 SEQ ID NO: 4 или 5, который не включает непрерывной последовательности DDYQRNATEAYAKEVPHQIT. Таким образом, в указанном варианте SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 могут отсутствовать первые двадцать остатков, находящихся на N-конце SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. Первые двадцать остатков в SEQ ID NO: 4 и в SEQ ID NO: 5 соответствуют положениям 35-54 SEQ в ID NO: 3. Соответственно, согласно настоящему изобретению, эта конкретная модификация может быть
 15 обозначена "D35_T54del".

Область, которая соответствует положениям 63 – 73 в SEQ ID NO: 3, играет важную роль для активности IgG-цистеиновой протеазы, оказываемой полипептидом согласно изобретению. Модификации в этой области, главным образом, повышают способность полипептида расщеплять вторую тяжелую цепь
 20 IgG, но они также усиливают его способность расщеплять первую тяжелую цепь IgG. В частности, замена одного или более остатков в этой области на соответствующие остатки (или аминокислоты с аналогичными характеристиками на соответствующий остаток), находящиеся в эквивалентной области IdeS, повышает активность полипептида согласно изобретению. Эквивалентная область в IdeS соответствует
 25 положениям 58 – 65 в SEQ ID NO: 1. Ниже представлено сопоставление, показывающее соответствие положений 63-73 в SEQ ID NO: 3 положениям 58-65 в SEQ ID NO: 1.

⁶³PLTPEQFRYNN⁷³ (область IdeZ, SEQ ID NO: 3)

⁵⁸P--PANFT-QG⁶⁵ (область IdeS, SEQ ID NO: 1)

30 “-“ указывает на отсутствующий остаток

Таким образом, полипептид согласно изобретению может включать вариант последовательности аминокислот SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, и этот вариант может содержать по меньшей мере одну из следующих модификаций:

i. удаление остатков лейцина (L) и треонина (T) в тех положениях варианта, которые соответствуют положениям 64 и 65 в SEQ ID NO: 3;

ii. треонин (T) вместо аргинина (R) в том положении варианта, которое соответствует положению 70 в SEQ ID NO: 3;

5 iii. удаление тирозина (Y) в том положении варианта, которое соответствует положению 71 в SEQ ID NO: 3;

iv. глутамин (Q) вместо аспарагина (N) в том положении варианта, которое соответствует положению 72 в SEQ ID NO: 3;

10 v. глицин (G) вместо аспарагина (N) в том положении варианта, которое соответствует положению 73 в SEQ ID NO: 3;

vi. аланин (A) вместо глутаминовой кислоты (E) в том положении варианта, которое соответствует положению 67 в SEQ ID NO: 3;

vii. аспарагин (N) вместо глутамина (Q) в том положении варианта, которое соответствует положению 68 в SEQ ID NO: 3.

15 По меньшей мере одна модификация из перечисленных выше опций i.-vii. обычно выбрана из опций i.-v. Полипептид согласно изобретению может включать вариант последовательности аминокислот SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, который содержит по меньшей мере две, три, четыре или все пять модификаций i.-v. Предпочтительно указанный вариант содержит по меньшей мере одну, две, три или
20 все четыре модификации ii.-v., и необязательно также имеется модификация i. В особенно предпочтительном варианте присутствуют все модификации i.-v.

В общем, таким образом, полипептид согласно изобретению включает вариант последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, где вариант:

(a) по меньшей мере на 50% идентичен SEQ ID NO: 4 или 5;

25 (b) имеет цистеин (C) в том положении указанного варианта последовательности, которое соответствует положению 102 в SEQ ID NO: 3; и необязательно

(c) имеет в тех положениях указанного варианта последовательности, которые соответствуют положениям 92, 272, 294 и 296 в SEQ ID NO: 3, лизин (K),

гистидин (H), аспарагиновую кислоту (D) и аспарагиновую кислоту (D), соответственно.

Предпочтительно указанный вариант SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5:

5 (1) имеет положительно заряженную аминокислоту в том положении варианта, которое соответствует положению 138 в SEQ ID NO: 3, и положительно заряженная аминокислота необязательно представляет собой аргинин (R) или лизин (K); и/или

10 (2) имеет положительно заряженную аминокислоту в том положении варианта, которое соответствует положению 139 в SEQ ID NO: 3, и положительно заряженная аминокислота необязательно представляет собой аргинин (R) или лизин (K); и/или

(3) не включает непрерывной последовательности DDYQRNATEA YAKEVPHQIT; и/или

(4) имеет по меньшей мере одну из следующих модификаций:

15 i. удаление остатков лейцина (L) и треонина (T) в тех положениях варианта, которые соответствуют положениям 64 и 65 в SEQ ID NO: 3;

ii. треонин (T) вместо аргинина (R) в том положении варианта, которое соответствует положению 70 в SEQ ID NO: 3;

20 iii. удаление тирозина (Y) в том положении варианта, которое соответствует положению 71 в SEQ ID NO: 3;

iv. глутамин (Q) вместо аспарагина (N) в том положении варианта, которое соответствует положению 72 в SEQ ID NO: 3;

v. глицин (G) вместо аспарагина (N) в том положении варианта, которое соответствует положению 73 в SEQ ID NO: 3;

25 vi. аланин (A) вместо глутаминовой кислоты (E) в том положении варианта, которое соответствует положению 67 в SEQ ID NO: 3;

vii. аспарагин (N) вместо глутамина (Q) в том положении варианта, которое соответствует положению 68 в SEQ ID NO: 3,

и по меньшей мере одна модификация (4) обычно выбрана из опций i.-v., и предпочтительно присутствуют все опции ii.-v., а также необязательно опция i.

Полипептид согласно изобретению обычно включает вариант последовательности аминокислот SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, где вариант
5 включает по меньшей мере одну, две, три или все четыре модификации (1)-(4), перечисленные выше. Указанный вариант может включать любую комбинацию из двух или трех модификаций (1)-(4). Предпочтительный вариант включает модификацию (3) и по меньшей мере одну из модификаций (1) и (2). В альтернативном варианте вариант может не включать ни одной из модификаций (1)-
10 (3), перечисленных выше.

Авторами изобретения также было показано, что некоторые другие модификации последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, которые могут быть применены в альтернативном варианте или дополнительно к любой из комбинаций модификаций, рассмотренных выше, могут повышать активность
15 полипептида согласно изобретению и/или могут ухудшать распознавание полипептида согласно изобретению IdeS-специфичными ADA. Таким образом, в альтернативном варианте или дополнительно к модификациям, перечисленным выше, полипептид согласно изобретению может включать:

(A) вариант последовательности SEQ ID NO: 4, в которой произведена замена в одном или более положениях, соответствующих положениям 84, 93, 95, 97, 137, 140, 147, 150, 162, 165, 166, 171, 174, 205, 226, 237, 239, 243, 250, 251, 254, 255, 282, 288, 312, 315, 347, 349 в SEQ ID NO: 3, и/или в которой непрерывная последовательность, соответствующая положениям с 36 по 53 в SEQ ID NO: 3
20 заменена непрерывной последовательностью, соответствующей положениям с 31 по 48 в SEQ ID NO: 2 (эта модификация может быть названа "D36_I53замещениеS31_V48 SEQ 2");
25

или

(B) вариант последовательности SEQ ID NO: 5 в которой произведена замена в одном или более положениях, соответствующих положениям 77, 93, 95, 99, 140, 141, 147, 150, 162, 171, 174, 175, 176, 177, 206, 224, 237, 241, 242, 245, 246, 249, 253, 267, 280, 286, 310, 311, 313, 344, 345, 346, 347.
30

Указанный вариант (A) может включать замену в одном из перечисленных положений или в любой комбинации одного или более из перечисленных

положений, но обычно включает замену не более чем в двенадцати, одиннадцати или десяти из указанных положений.

Указанный вариант (B) может включать замену в одном из перечисленных положений или в любой комбинации одного или более из перечисленных положений, но обычно включает замену не более чем в тридцати из указанных положений.

Замены (замещения) 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 Таблицах B1 и B2 с помощью однобуквенного кода.

Таблица B1 – вариант A

Существующая аминокислота в SEQ ID NO: 4	Положение в SEQ ID NO: 3	Предпочтительная замена
H	84	N
A	93	T
D	95	N
K	97	A
F	137	I
Q	140	E
A	147	E
D	150	R
N	162	E
R	165	K
D	166	E
N	171	Y
A	174	T
N	205	K
D	226	N
L	237	F
N	239	E
N	243	K
K	250	S
Q	251	E
T	254	E
E	255	K
N	282	D
E	288	K
A	312	K
H	315	K
K	347	Q

S	349	N
---	-----	---

Таблица В2 – вариант В

Существующая аминокислота в SEQ ID NO: 4	Положение в SEQ ID NO: 3	Предпочтительная замена
F	77	I
A	93	T
D	95	N
N	99	D
D	140	E
N	141	Q
K	147	E
D	150	R
N	162	E
G	171	Y
A	174	T
R	175	K
R	176	H
I	177	L
E	206	K
D	224	N
N	237	E
N	241	K
D	242	E
T	245	D
I	246	L
Q	249	E
K	253	E
S	267	R
N	280	D
E	286	K
A	310	K
H	311	A
H	313	K
Q	344	N
K	345	Q
L	346	T
S	347	N

5 Каждое из замещений, указанных в Таблицах В1 и В2, 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 Таблицы В1 может быть обозначено "H84N", замещение во втором ряду может быть обозначено "A93T" и т.д. Конкретные модификации: "D226N", приведенная в

Таблице В1, и “D224N”, приведенная в Таблице В2, предназначены для разрушения известного мотива клеточной адгезии в последовательности IdeZ и IdeS/Z, который представляет собой непрерывную RGD последовательность в положениях 224-226 в SEQ ID NO: 3.

- 5 В приведенных ниже Таблицах С1 и С2 представлены модификации, применяемые для получения аминокислотных последовательностей некоторых примеров полипептидов согласно изобретению.

Таблица С1

Внутренняя ссылка	Модификации по сравнению с IdeZ (SEQ ID NO: 4) (положения соответствуют SEQ ID NO: 3)	SEQ ID NO полной последовательности
pCART197	H84N, N138R, A147E, D150R, N162E, N171Y, N205K, D226N, Q251E, E255K, A312K, S349N	6
pCART198	A93T, D95N, Q140E, R165K, D166E, A174T, D226N, L237F, N239E, N243K, N282D, E288K, H315K, K347Q	7
pCART200	D36_I53замещениеS31_V48 SEQ 2 т.е. SFSANQEI RYSEVTPYHV замещает DYQRNATE AYAKEVPHQI	8
pCART201	D35_T54del	9
pCART202	R70T, Y71del, N72Q, N73G	10
pCART203	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G	11
pCART204	R70T, Y71del	12
pCART206	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, F137I	13
pCART207	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, N138R	14
pCART208	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, F137I, N138R	15
pCART210	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, H84N, N138R, N162E, N205K, D226N	16
pCART217	D35_T54del, L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, N138R, D226N	17
pCART219	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, K97A, N138R, D226N	18
pCART226	D35_T54del, L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, K97A,	19

	N138R, D226N	
pCART229	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, N138R, D226N	20

Таблица C2

Внутренняя ссылка	Модификации по сравнению с IdeZ (SEQ ID NO: 4) (положения соответствуют SEQ ID NO: 3)	SEQ ID NO полной последовательности
pCART19 1	R70T, Y71del, N72Q, N73G, D140E, G171Y, R175K, R176H, I177L, S267R	21
pCART19 2	R70T, Y71del, N72Q, N73G, N138R, D140E, K147E, D150R, N162E, G171Y, R175K, R176H, I177L, E206K, Q249S, K253N, S267R, A310K, S347N	22
pCART19 3	R70T, Y71del, N72Q, N73G, A93T, D95N, N99D, D140E, N141Q, K147E, N162E, G171Y, A174T, R175K, R176H, I177L, N237E, N241K, D242E, T245D, I246L, K253E, S267R, E286K, H311A, H313K, Q344N, K345Q, L346T	23
pCART19 4	R70T, Y71del, N72Q, N73G, A93T, D95N, N99D, N138R, D140E, N141Q, K147E, D150R, N162E, G171Y, A174T, R175K, R176H, I177L, E206K, N237E, N241K, D242E, T245D, I246L, Q249E, S267R, N280D, E286K, A310K, H311A, H313K, Q344N, K345Q, L346T, S347N	24
pCART20 5	L64_65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, F77I, N138R, D140E, N141Q	25

Ниже полностью представлены аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-5, а также аминокислотные последовательности каждого из примеров полипептидов согласно изобретению, указанных в Таблицах C1 и C2:

SEQ ID NO: 1

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIA DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPA
NFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNGKDDLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKDQIKRY

LEEHPKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVID
MFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLI
KKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDSSNGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVG
VNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

5

SEQ ID NO: 2

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNG
KDDLCCGAATAGHMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNH
QLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGG
10 IFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWG
ADFDSSNGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVG VNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLS
TGQDSWNQTN

SEQ ID NO: 3

15 MKTIAYPNKPHSLSAGLLTAIAIFSLASSNITYADDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVT
PLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKA FDGKDNLLCGAAMETKHMLHWWFDQNK
TEIEAYLSKHPEKQKIIFFNNQELFDLKA AIDTKDSQTNSQLFNFRDKAFP NLSARQLGVM
PDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGDQTLLTARHDLKNK
GLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGADFN AEGNLEAIYVTDSDANASIG
20 MKKYFVG INAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 4

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKA
FDGKDNLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFFNNQELFDLKA AIDTK
25 DSQTNSQLFNFRDKAFP NLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDK
DKRGGIFDAVFTRGDQTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHV
INLWGADFN AEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVG INAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLG
LFTLSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 5

30 DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVFHAPYVANQGWDITKA
FDGKDNLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPKQKINFNGDHMFVKK AID
TKNHQLDSKLFN YFKEKAFPGLSARRIGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKD

PRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKNKNLNDISTIIKQELTKGKALGLSHTYANVSINHVI
NLWGADFNAEGNLEAIYVTDSDSNASIGMKKYFVG VNAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLG
LFTLSTGQDSWQKLS

SEQ ID NO: 6 (pCART197)

5 DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLANQGWDITKA
FDGKDNLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLKEAIRTK
DSQTNSQLFEYFRDKAFPYLSARQLGVMPDLVLD MFINGYYLNVFKTQSTDV KRPYQDK
DKRGGIFDAVFTRGNQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKEELTKGRALALSHTYANVSISHVI
NLWGADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINKHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGL
10 FTLSSGKDIWQKLN

SEQ ID NO: 7 (pCART198)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKT
FNGKDNLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNEELFDLKAAIDTK
DSQTNSQLFN YFKEKAFP NLSTRQLGVMPDLVLD MFINGYYLNVFKTQSTDV NRPYQDK
15 DKRGGIFDAVFTRGNQTTLLTARHDFKEKGLKDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHV
INLWGADFNAEGNLKAIYVTDSDANASIGMKKYFVG INAHGKVAISAKKIEGENIGAQVLG
LFTLSSGKDIWQQLS

SEQ ID NO: 8 (pCART200)

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKAF
20 DGKDNLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAAIDTKD
SQTNSQLFN YFRDKAFP NLSARQLGVMPDLVLD MFINGYYLNVFKTQSTDV NRPYQDKD
KRGGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVI
NLWGADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVG INAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGL
FTLSSGKDIWQKLS

25 SEQ ID NO: 9 (pCART201)

SVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKA FDGKDNLLCGAAMETKHMLH
WWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAAIDTKDSQTNSQLFN YFRDKAFP NLS
ARQLGVMPDLVLD MFINGYYLNVFKTQSTDV NRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGDQTTLLT
ARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGADFNAEGNLEAIYVTD
30 SDANASIGMKKYFVG INAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 10 (pCART202)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPTPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKAF
 DGKDNLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFFNNQELFDLKAAIDTKD
 SQTNSQLFNYFRDKAFPNSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKD
 KRGGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVI
 5 NLWGADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGL
 FTLSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 11 (pCART203)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFDG
 KDNLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFFNNQELFDLKAAIDTKDSQ
 10 TNSQLFNYFRDKAFPNSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKR
 GGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINL
 WGADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFT
 LSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 12 (pCART204)

15 DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFFD
 GKDNLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFFNNQELFDLKAAIDTKDS
 QTNSQLFNYFRDKAFPNSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDK
 RGGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINL
 20 WGADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFT
 LSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 13 (pCART 206)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFDG
 KDNLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIINNQELFDLKAAIDTKDSQT
 25 NSQLFNYFRDKAFPNSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRG
 GIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLW
 GADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTL
 SSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 14 (pCART207)

30 DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFDG
 KDNLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFFNNQELFDLKAAIDTKDSQ
 TNSQLFNYFRDKAFPNSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKR

GGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINL
WGADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFT
LSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 15 (pCART208)

5 DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFDG
KDNLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIIRNQELFDLKAAIDTKDSQT
NSQLFNYFRDKAFPNSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRG
GIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLW
GADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTL
10 SSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 16 (pCART210)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYLANQGWYDITKAFDG
KDNLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLKEAIRTKDSQ
TNSQLFEYFRDKAFPYLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVVKRPYQDKDKR
15 GGIFDAVFTRGNQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKEELTKGRALALSHTYANVSISHVINL
WGADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINKHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFT
LSSGKDIWQKLN

SEQ ID NO: 17 (pCART217)

20 SVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFDGKDNLLCGAAMETKHMLHWW
FDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLKAAIDTKDSQTNSQLFNYFRDKAFPNSAR
QLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGNQTTLLTAR
HDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGADFNAEGNLEAIYVTDSD
ANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS
25

SEQ ID NO: 18 (pCART219)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFDG
ADNLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLKAAIDTKDSQ
30 TNSQLFNYFRDKAFPNSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKR
GGIFDAVFTRGNQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINL
WGADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFT
LSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 19 (pCART226)

SVWTKGVTPPEQFTQGEDIHAPYLAHQGWYDITKAFDGNLLCGAAMETKHMLHWW
FDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLKAIDTKDSQTNSQLFNYFRDKAFPNSAR
5 QLGVMPLDLVDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGNQTLLTAR
HDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGADFNAEGNLEAIYVTDSD
ANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 20 (pCART229)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDIHAPYLAHQGWYDITKAFDG
10 KDNLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLKAIDTKDSQ
TNSQLFNYFRDKAFPNSARQLGVMPDLVDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKR
GGIFDAVFTRGNQTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINL
WGADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFT
LSSGKDIWQKLS

15 SEQ ID NO: 21 (pCART191)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPTPEQFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKAF
DGKDNLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPKQKINFNGEHMFDVKKAITD
KNHQLDSKLFNYFKEKAFPYLSAKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDP
RGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKNKNLNDISTIIKQELTKGKALGLSHTYANVRINHVIN
20 LWGADFNAEGNLEAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGL
FTLSTGQDSWQKLS

SEQ ID NO: 22 (pCART192)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPTPEQFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKAF
DGKDNLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPKQKINFRGEHMFDVKEAIRT
25 KNHQLDSKLFYFKEKAFPYLSAKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKKGSKDP
RGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKNKNLNDISTIIKSELTKGKALGLSHTYANVRINHVIN
LWGADFNAEGNLEAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGL
FTLSTGQDSWQKLN

SEQ ID NO: 23 (pCART193)

30 DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPTPEQFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTF
NGKDDLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPKQKINFNGEQMFDVKEAIDT
KNHQLDSKLFYFKEKAFPYLSKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDP

RGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKQELTEGKALGLSHTYANVRINHVIN
LWGADFDAEGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNAGKVAISAKKIEGENIGAQVLGL
FTLSTGQDSWNQTS

SEQ ID NO: 24 (pCART194)

5 DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTF
NGKDDLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFRGEQMFDVKEAIRT
KNHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKKGSKDP
RGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKEELTKGKALGLSHTYANVRINHVIN
LWGADFDAEGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNKAGKVAISAKKIEGENIGAQVLGL
10 FTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO: 25 (pCART205)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYVANQGWDITKAFDG
KDNLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFRGEQMFDVKKAITKN
HQLDSKLFNYFKEKAFPGLSARRIGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRG
15 GIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKNKNLNDISTIIKQELTKGKALGLSHTYANVSINHVINLW
GADFNAEGNLEAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNANHGVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTL
STGQDSWQKLS

Полипептид согласно изобретению может включать, по существу состоять
или состоять из последовательности, имеющейся в любой из последовательностей
20 SEQ ID NO: с 6 по 25. Каждая из последовательностей SEQ ID NO: с 6 по 25
необязательно может включать дополнительный метионин на N-конце и/или
гистидиновую метку на C-конце. Гистидиновая метка предпочтительно состоит из
шести гистидиновых остатков. Гистидиновая метка предпочтительно связана с C-
концом линкером, состоящим из 3 глициновых или 5 глициновых остатков.

25 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
30 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: 33-55.

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.

5 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
10 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
15 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.

20 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,
25 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.*

30 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 C-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, включать 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 C

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, тиоредукцин, 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.

20 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 проявляться 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. Вводимое количество полипептида может составлять от 0,01 мг/кг МТ (массы тела) до 2 мг/кг МТ, от 0,04 до 2 мг/кг МТ, от 0,12 мг/кг МТ до 2 мг/кг МТ, предпочтительно от 0,24 мг/кг до 2 мг/кг МТ и наиболее предпочтительно от 1 мг/кг до 2 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
5 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
10 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
15 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, в частности, аутоиммунного заболевания, полностью или частично 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
20 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 (P450scs), 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). Пузырчатка листовидная (англ. pemphigus foliaceus, сокращенно PF), fogo selvagem (FS) (эндемическая форма), пузырчатка обыкновенная (англ. pemphigus vulgaris, сокращенно PV)	IgG к кератиноцитам. Специфичной мишенью является десмоглеин (Dsg) 1 (десмосомальные кадгеринины)
Аутоиммунная гемолитическая анемия (англ. autoimmune hemolytic anemia, сокращенно AIHA)	Собственные антигены на красных кровяных клетках
Аутоиммунный гепатит (англ. Autoimmune hepatitis, сокращенно AIH)	Актин, антиядерное 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)	FcgRIIIb
Буллезный пемфигоид (англ. bullous pemphigoid, сокращенно BP)	Полудесмосомальные белки BP230 и BP180 (коллаген типа XVII), ламинин 5, альфа-6 субъединица интегрина 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 инсулиномой 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 ЕВА)	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-	Потенциалозависимые кальциевые каналы

Ламберта (англ. Lambert-Eaton myasthenic syndrome, сокр. LEMS)	
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 оксалоокислотных 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 (Scl-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, M3-мускариновый рецептор
Отторжение трансплантата	Антигены отторжения трансплантата
Тромбоцитопенический акроангиотромбоз (англ. thrombotic)	ADAMTS13

thrombocytopenic purpura, сокр. ТТП)	
--------------------------------------	--

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 (a) 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 (a) 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, аденокортикальную карциному, 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

5 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 нейрозктодермальные опухоли, опухоль

10 головного мозга глиому зрительных путей и глиому гипоталамуса, рак груди, аденомы/карциномы 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

15 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

20 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, желудочно-кишечную стромальную опухоль (стромальную опухоль ЖКТ), эмбрионально-клеточную опухоль: экстракраниальную, экстрагонадную или

25 яичников, гестационную трофобластическую опухоль, глиому ствола головного мозга, глиому, детскую церебральную астроцитому, глиому детскую зрительных путей и гипоталамуса, желудочный карциноид, волосатоклеточный лейкоз, рак головы и шеи, рак сердца, печеночно-клеточный рак (рак печени), лимфому Ходжкина, гипотарингальный рак, глиому гипоталамуса и зрительных путей,

30 внутриглазную меланому, карциному островковых клеток (эндокринной ткани поджелудочной железы), саркому Капоши, рак почки (рак почечных клеток), рак гортани, лейкемии, лейкемию острую лимфобластическую (также называемую острой лимфоцитарной лейкемией), лейкемию острую миелоидную (также называемую острой миелогенной лейкемией), лейкемию хроническую

35 лимфоцитарную (также называемую хронической лимфоцитарной лейкемией), лейкемию хроническую миелогенную (также называемую хронической миелоидной

лейкемией), лейкоз ворсистых клеток, рак губ и ротовой полости, липосаркому, рак 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, 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 миелому/плазмноклеточную 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 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 поджелудочной железы, рак околоносовой пазухи и носовой полости, рак паращитовидных желез, рак полового члена, фарингеальный рак, феохромоцитому, астроцитому шишковидного тела, герминому шишковидного тела, пинеобластому и супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, аденому гипофиза, плазмноклеточную опухоль/множественную миелому, плеврорлегочную 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 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 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, 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, 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, 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, $\alpha 4\beta 7$ 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. GM-CSF). См. публикацию Human Cytokines: Handbook for Basic & Clinical Research (Цитокины человека: Руководство по базовым и клиническим исследованиям) (Aggarwal 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.

- 5 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"
- 10 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
- 15 перитуморальное, околоопухолевое, внутриопухолевое, внутриочаговое введение, введение вблизи от очага поражения, внутримолостное вливание, внутримпузырное введение и ингаляционное введение.

- Подходящая дозировка антитела согласно изобретению может быть определена опытным практикующим врачом. Реальные уровни дозирования
- 20 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
- 25 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,
- 30 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, Актоксумаб, 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 тетраксетан, Конатумумаб, Концизумаб, Кренезумаб, CR6261, Дацетузумаб, Даклизумаб, Далотузумаб, Даратумумаб, Демцизумаб, Деносумаб, Детумомаб, Дорлимомаб аритокс,
- 5 Дроцитумаб, Дулиготумаб, Дупилумаб, Дусигитумаб, Экромексимаб, Экулизумаб, Эдобакомаб, Эдреколомаб, Эфализумаб, Эфунгумаб, Эллотузумаб Элсилимомаб, Энаватузумаб, Энлимомаб пегол, Энокизумаб, Энотикумаб, Энситуксимаб, Эпитумомаб цитуксетан, Эпратузумаб, Эрлизумаб, Эртумамаксомаб, Этаракизумаб, Этролизумаб, Эволокумаб, Эксбивирумаб, Фанолесомаб, Фаралимомаб,
- 10 Фарлетузумаб, Фасимумаб, FBTA05, 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,
- 15 Ибритумомаб тиуксетан, Икрукумаб, Иговомаб, Имциромаб, Имгатузумаб, Инклакумаб, Индатуксимаб равтанзин, Инфликсимаб, Интетумумаб, Инолимомаб, Инотузумаб озогамидин, Ипилимумаб, Иратумумаб, Итолизумаб, Иксекизумаб, Келиксимаб, Лабетузумаб, Лампализумаб, Лебрикизумаб, Лемалесомаб, Лерделимумаб, Лексатумумаб, Либивирумаб, Лигелизумаб, Линтузумаб, Лирилумаб,
- 20 Лоделцизумаб, Лорвотузумаб мертанзин, Лукатумумаб, Лумиликсимаб, Маратумумаб, Маслимомаб, Маврилимумаб, Матузумаб, Меролизумаб, Метелимумаб, Милатузумаб, Минретумомаб, Митумомаб, Могамулизумаб, Моролимумаб, Мотавизумаб, Моксетумомаб пазудотокс, Муромонаб-CD3, Наколомаб тафенатокс, Намилумаб, Наптумомаб эстафенатокс, Нарнатумаб,
- 25 Натализумаб, Небакумаб, Нецитумумаб, Нерелимомаб, Несвакумаб, Нимотузумаб, Ниволумаб, Нифетумомаб мерпантин, Обинутузумаб, Окаратузумаб, Октелизумаб, Одулимомаб, Офатумумаб, Оларатумаб, Олокизумаб, Омализумаб, Онартузумаб, Опортузумаб монатокс, Ореговомаб, Ортикумаб, Отеликсизумаб, Окселумаб, Озанезумаб, Озорализумаб, Пагибаксимаб, Паливизумаб, Панитумумаб,
- 30 Панобакумаб, Парсатузумаб, Пасколизумаб, Патеклизумаб, Патритумаб, Пемтумомаб, Перакизумаб, Пертузумаб, Пекселизумаб, Пидилизумаб, Пинатузумаб ведотин, Пинтумомаб, Плакулумаб, Полатузумаб ведотин, Понезумаб, Приликсимаб, Притоксаксимаб, Притумумаб, PRO 140, Квилизумаб, Ракотумомаб, Радретумаб, Рафивирумаб, Рамуцирумаб, Ранибизумаб, Раксикакумаб,
- 35 Регавирумаб, Резлизумаб, Рилотумумаб, Ритуксимаб, Робатумумаб, Роледумаб, Ромосозумаб, Ронтализумаб, Ровелизумаб, Руплизумаб, Самализумаб, Сарилумаб,

Сатумомаб пендетид, Секукинумаб, Серибантумаб, Сетоксаксимаб, Севирумаб, Сибротузумаб, Сифалимумаб, Силтуксимаб, Симтузумаб, Сиплизумаб, Сирукумаб, 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 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, Затуксимаб, Зиралимумаб или Золимумаб аритокс.

Предпочтительные антитела включают Натализумаб, Ведолизумаб, Белимумаб, Атацисепт, Алефасепт, Отеликсизумаб, Теплизумаб, Ритуксимаб, Офатумумаб, Окрелизумаб, Эпратузумаб, Алемтузумаб, Абатасепт, Экулизамаб, Омализумаб, Канакинумаб, Меплизумаб, Реслизумаб, Тоцилизумаб, Устекинумаб, Бриакинумаб, Этанерсепт, Инфликсимаб, 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 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 выработаны антитела к антигенам главного комплекса гистосовместимости (англ. human major histocompatibility, сокращенно МНС) 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 (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-реактивные антитела (англ. Panel Reactive Antibody, сокр. PRA). Обычно, если PRA
5 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
10 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.

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
20 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
25 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
30 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
35 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

- этапы (а) 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 профилактике 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

5 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,

10 который убивает или ингибирует В-клетки. Агенты, которые убивают или ингибируют Т-клетки, включают Муромонаб, Базиликсимаб, Даслизумаб, антитело к антитимоцитарному глобулину (англ. antithymocyte globulin, сокращенно ATG) и лимфоцитарный иммуноглобулин, препарат антитимоцитарного глобулина ATGAM® (от англ. anti-thymocyte globulin preparation). Известно, что Ритуксимаб

15 убивает или ингибирует В-клетки.

Описание примеров осуществления изобретения

Если не указано иное, применяемые способы представляют собой стандартные биохимические методики и методики молекулярной биологии.

20 Примеры подходящих руководств, содержащих описание методологии, включают Sambrook с соавт., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (1989); Ausubel с соавт., Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley and Sons, Inc.

Пример 1

Конструирование, получение и очистка полипептидов

25 Производили анализ зрелой молекулы IdeS и идентифицировали области, подходящие для мутации. В некоторых случаях для оценки вероятного исхода 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

30 последовательности, либо синтезом, зависящим от количества вводимых мутаций. кДНК были секвенированы и перенесены в экспрессионный вектор pET9a (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 агарозой LB (Luria-Bertani), содержащей 30 мг/мл канамицина. Отбирали отдельные колонии, и в течение ночи производили культивирование (3 мл среды LB) при 37°C, 250 об./мин. На следующий день готовили глицериновые 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 OD (optical density) 0,6-0,8 (37°C, 300 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 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 (дитиотреитол), и затем производили обмен буфера (3 объема ФСБ в MWCO 9K Millipore cfg 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).

В приведенной ниже Таблице указаны изменения, внесенные в каждый испытуемый полипептид по сравнению со зрелым IdeZ или IdeS/Z, не включающие 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 С-терминальному концу через короткий глициновый линкер.

Внутренняя ссылка	Модификации по сравнению с IdeZ (SEQ ID NO: 4) (положения соответствуют SEQ ID NO: 3)	SEQ ID NO
pCART19 7	H84N, N138R, A147E, D150R, N162E, N171Y, N205K, D226N, Q251E, E255K, A312K, S349N	6

pCART19 8	A93T, D95N, Q140E, R165K, D166E, A174T, D226N, L237F, N239E, N243K, N282D, E288K, H315K, K347Q	7
pCART20 0	D36_I53замещениеS31_V48 SEQ 2 т.е. SFSANQEI RYSEVTPYHV замещает DYQRNATE AYAKEVPHQI	8
pCART20 1	D35_T54del	9
pCART20 2	R70T, Y71del, N72Q, N73G	10
pCART20 3	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G	11
pCART20 4	R70T, Y71del	12
pCART20 6	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, F137I	13
pCART20 7	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, N138R	14
pCART20 8	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, F137I, N138R	15
pCART21 0	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, H84N, N138R, N162E, N205K, D226N	16
pCART21 7	D35_T54del, L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, N138R, D226N	17
pCART21 9	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, K97A, N138R, D226N	18
pCART22 6	D35_T54del, L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, K97A, N138R, D226N	19
pCART22 9	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, N138R, D226N	20

Внутренняя ссылка	Модификации по сравнению с IdeS/Z (SEQ ID NO: 5) (положения соответствуют SEQ ID NO: 3)	SEQ ID NO
pCART19 1	R70T, Y71del, N72Q, N73G, D140E, G171Y, R175K, R176H, I177L, S267R	21
pCART19	R70T, Y71del, N72Q, N73G, N138R, D140E, K147E, D150R,	22

2	N162E, G171Y, R175K, R176H, I177L, E206K, Q249S, K253N, S267R, A310K, S347N	
pCART19 3	R70T, Y71del, N72Q, N73G, A93T, D95N, N99D, D140E, N141Q, K147E, N162E, G171Y, A174T, R175K, R176H, I177L, N237E, N241K, D242E, T245D, I246L, K253E, S267R, E286K, H311A, H313K, Q344N, K345Q, L346T	23
pCART19 4	R70T, Y71del, N72Q, N73G, A93T, D95N, N99D, N138R, D140E, N141Q, K147E, D150R, N162E, G171Y, A174T, R175K, R176H, I177L, E206K, N237E, N241K, D242E, T245D, I246L, Q249E, S267R, N280D, E286K, A310K, H311A, H313K, Q344N, K345Q, L346T, S347N	24
pCART20 5	L64_65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, F77I, N138R, D140E, N141Q	25

В качестве контрольных веществ применяли варианты IdeS, IdeZ и IdeS/Z, которые были получены в соответствии с методикой, рассмотренной выше. Согласно настоящему изобретению, эти варианты были обозначены pCART124, pCART144 и pCART145, соответственно.

pCART124 включает последовательность SEQ ID NO: 2 плюс дополнительный N-терминальный метионин и his метку, присоединенную к С-концу через короткий глициновый линкер.

Последовательность pCART124 приведена ниже:

10 MDSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFN
GKDDLCLCGAAMETKHMHLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTK
NHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHDVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPR
GGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINL
WGADFDSDNGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLF
15 TLSTGQDSWNQTNNGGGHHHHHH (SEQ ID NO: 26)

pCART144 включает последовательность SEQ ID NO: 4 плюс дополнительный N-терминальный метионин и his метку, присоединенную к С-концу через короткий глициновый линкер.

Последовательность pCART144 приведена ниже:

MDDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITK
AFDGKDNLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAADIT
KDSQTNSQLFNYFRDKAFPNLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQD
KDKRGGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISH
5 VINLWGADFNAEAGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVL
GLFTLSSGKDIWQKLSGGGHHHHHH (SEQ ID NO: 27)

pCART145 включает последовательность SEQ ID NO: 5 плюс дополнительный N-терминальный метионин и his метку, присоединенную к С-концу через короткий глициновый линкер.

10 Последовательность pCART145 приведена ниже:

MDDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVFHAPYVANQGWYDIT
KAFDGKDNLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGDHMFVDVKA
IDTKNHQLDSKLFNYFKEKAFPGLSARRIGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSK
DPRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKNKNLNDISTIIKQELTKGKALGLSHTYANVSINH
15 VINLWGADFNAEAGNLEAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVNANAHGHVAISAKKIEGENIGAQVL
GLFTLSTGQDSWQKLSGGGHHHHHH (SEQ ID NO: 28)

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

Последовательность кДНК, используемая для получения каждого из испытуемых полипептидов, а также pCART124, pCART144 и pCART145, приведена ниже. Каждая кДНК последовательность имеет на 3' конце кодон для N-
25 терминального метионина (ATG) и на 5' конце перед терминирующим кодоном (TAA) имеет кодоны для глицинового линкера и гистидиновой метки.

pCART124 (IdeS; SEQ ID NO: 33)

ATGGAMETKTTTTCTGCTAATCAAGAGATMETKATATTCGGAAGTAACACCTTATCAC
GTTACTTCCGTTTGGACCAAAGGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAA
30 GATGTTTTTACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTATGATATTACCAAAACATT
CAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTG
GTGGTTTCGATCAAACAAAGACCAAAATTAACGTTATTTGGAAGAGCATCCAGAAAAG

CAAAAAATAAACTTCAATGGCGAACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCGACACTA
 AAAACCACCAGCMETKAMETKTAAATTATTTGAATATTTTAAAGAAAAAGCTTTCCCTT
 ATCTATCTACTAAACACCMETKGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTCAATTA
 CGGCTACCGCCTMETKTCTAACTAACACGGTCCAACGCCAGTAAAAGAAGGMETKT
 5 AAAGATCCCCGAGGTGGTATTTTTGACGCCGTATTTACAAGAGGTGATCAAAGTAAG
 CTATTGACAAGTCGTCATGATTTTAAAGAAAAAATCTCAAAGAAATCAGTGATCTCAT
 TAAGAAAGAGTTAACCGAAGGCAAGGCTCMETKGCCTATCACACACCTACGCTAACG
 TACGCATCAACCATGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAACC
 TTAAAGCTATTTATGTAACAGACTCTGAMETKTAATGCATCTATTGGTATGAAGAAATA
 10 CTTTGTTGGTGTTAATTCCGCTGGAAAAGMETKCTATTTCTGCTAAAGAAATAAAGA
 AGATAATAMETKGTGCTCAAGTACMETKGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAGAME
 TKTTGGAATCAGACCAATGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART144 (IdeZ; SEQ ID NO: 34)

ATGGACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAAGCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAG
 15 ATCACTTCTGTATGGACCAAAGGTGTTACACCACTAACACCCGAGCAGTTTCGATATA
 ATAACGAAGATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAGGCTGGTACGATATCA
 CCAAGGCCTTCGATGGGAAGGATAATCTCTTGTTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAAT
 ATGCTGCATTGGTGGTTTGATCAAAATAAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAAC
 ACCCTGAAAAGCAAAAAATCATTTTTAACAACCAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGC
 20 TATCGATACCAAGGACAGTCAAACCAAMETKTCAGCTTTTTAATTATTTMETKAGATAA
 AGCCTTTCCAAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTTGTTTCMETKA
 TATGTTTATCAATGGTTACTACTTAAATGTGTTTAAACACAGTCTACTGATGTCAATC
 GACCTTATCAGGACAAGGACAAACGAGGTGGTATTTTCGATGCTGTTTTACCAGAG
 GAGATCAGACAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAAATGA
 25 CATCAGCACCATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACAT
 ACCTACGCCAATGTMETKCATMETKCCATGTGATTAACCTTGTTGGGGAGCTGATTTTAA
 TGCTGAAGGAAACCTTGAGGCCATCTATGTACAGACTCAGATGCTAATGCGTCTAT
 TGGTATGAAAAAATATTTTGTGCGCATTAATGCTCATGGACATGTCGCCATTTCTGCC
 AAGAAAAMETKAAGGAGAAAACATTGGCGCTCAAGTATMETKGCTTATTTACGCTTTC
 30 CAGTGGCAAGGACATTTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACC
 ACTAA

pCART145 (IdeS/Z; SEQ ID NO: 35)

ATGGATGATTATCAGCGCAACGCGACCGAAGCGTATGCGAAAGAAGTGCCGCATCA
 GATTACCAGCGTGTGGACCAAAGGCGTGACCCCGCTGACCCCGGAACAGTTTCGCT

ATAACAACGAAGATGTGTTTCATGCGCCGTATGTGGCGAACCAGGGCTGGTATGATA
 TTACCAAAGCGTTTGATGGCAAAGATAACCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGGGC
 AACATGCTGCATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAGATCAGATTAAACGCTATCTGGAAG
 AACATCCGGAAAAACAGAAAATTAACCTTTAACGGCGATAACATGTTTGATGTGAAAAA
 5 AGCGATTGATACCAAAAACCATCAGCTGGAMETKCAAACTGTTTAACTATTTTAAAGA
 AAAAGCGTTTCCGGGCCTGAGCGCGCGCCGCATTGGCGTGTTTCCGGATCATGTGA
 TTGATATGTTTATTAACGGCTATCGCCTGAGCCTGACCAACCATGGCCCGACCCCGG
 TGAAAGAAGGCAGCAAAGATCCGCGCGGCGGCATTTTTTGATGCGGTGTTTACCCGC
 GGCAACCAGAGCAAACCTGCTGACCAGCCGCCATGATTTTAAAAACAAAACCTGAAC
 10 GATATMETKCACCATTATTAACAGGAACTGACCAAAGGCAAAGCGCTGGGCCTGAG
 CCATACCTATGCGAACGTGAGCATTAAACCATGTGATTAACTGTGGGGCGCGGATTT
 TAACGCGGAAGGCAACCTGGAAGCGATTTATGTGACCGAMETKCGAMETKCAACGC
 GAGCATTGGCATGAAAAAATATTTTGTGGGCGTGAACGCGCATGGCCATGTGGCGAT
 METKCGCGAAAAAATTGAAGGCGAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGCCTGTTTA
 15 CCCTGAGCACCGGCCAGGAMETKCTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCA
 CCATCACCCTAA

pCART197 (SEQ ID NO: 36)

ATGGATGATTATCAGCGCAACGCGACCGAAGCGTATGCGAAAGAAGTGCCGCATCA
 GATTACCAGCGTGTGGACCAAAGGCGTGACCCCGCTGACCCCGGAACAGTTTCGCT
 20 ATAACAACGAAGATGTGATTCATGCGCCGTATCTGGCGAACCAGGGCTGGTATGATA
 TTACCAAAGCGTTTGATGGCAAAGATAACCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGGGC
 AACATGCTGCATTGGTGGTTTGATCAGAACAAACCGAAATTGAAGCGTATCTGAGC
 AAACATCCGGAAAAACAGAAAATTATTTTTTCGCAACCAGGAACTGTTTGATCTGAAAG
 AAGCGATTTCGCACCAAAGAMETKCCAGACCAACAGCCAGCTGTTTGAATATTTTCGC
 25 GATAAAGCGTTTCCGTATCTGAGCGCGCGCCAGCTGGGCGTGATGCCGGATCTGGT
 GCTGGATATGTTTATTAACGGCTATTATCTGAACGTGTTTAAACCCAGAGCACCGAT
 GTGAAACGCCCGTATCAGGATAAAGATAAACGCGGCGGCATTTTTGATGCGGTGTTT
 ACCCGCGGCAACCAGACCACCCTGCTGACCGCGCGCCATGATCTGAAAAACAAAGG
 CCTGAACGATATMETKCACCATTATTAAGAAGAAGTACCAAAGGCCGCGCGCTGG
 30 CGCTGAGCCATACCTATGCGAACGTGAGCATMETKCCATGTGATTAACTGTGGGGC
 GCGGATTTTAACGCGGAAGGCAACCTGGAAGCGATTTATGTGACCGAMETKCGATGC
 GAACGCGAGCATTGGCATGAAAAAATATTTTGTGGGCATTAACAAACATGGCCATGT
 GGCGATMETKCGCGAAAAAATTGAAGGCGAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGC
 CTGTTTACCCTGAGCAGCGGCAAAGATATTTGGCAGAACTGAACGGCGGTGGCCA
 35 TCATCACCCTCACCCTAA

pCART198 (SEQ ID NO: 37)

ATGGATGATTATCAGCGCAACGCGACCGAAGCGTATGCGAAAGAAGTGCCGCATCA
 GATTACCAGCGTGTGGACCAAAGGCGTGACCCCGCTGACCCCGGAACAGTTTCGCT
 ATAACAACGAAGATGTGATTCATGCGCCGTATCTGGCGCATCAGGGCTGGTATGATA
 5 TTACCAAACCTTTAACGGCAAAGATAACCTGCTGTGCGGCGCGGGCGACCGCGGGC
 AACATGCTGCATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAACCGAAATTGAAGCGTATCTGAGC
 AAACATCCGGAAAAACAGAAAATTATTTTTAACAAACGAAGAACTGTTTGATCTGAAAG
 CGGCGATTGATACCAAAGAMETKCCAGACCAACAGCCAGCTGTTTAACTATTTTAAAG
 AAAAAGCGTTTCCGAACCTGAGCACCCGCCAGCTGGGCGTGATGCCGGATCTGGTG
 10 CTGGATATGTTTATTAACGGCTATTATCTGAACGTGTTTAAAACCCAGAGCACCGATG
 TGAACCGCCCGTATCAGGATAAAGATAAACGCGGGCGGCATTTTTGATGCGGTGTTTA
 CCCGCGGCAACCAGACCACCCTGCTGACCGCGCGCCATGATTTTAAAGAAAAAGGC
 CTGAAAGATATMETKCACCATTATTAACAGGAACTGACCGAAGGCCGCGCGCTGGC
 GCTGAGCCATACCTATGCGAACGTGAGCATMETKCCATGTGATTAACCTGTGGGGCG
 15 CGGATTTTGATGCGGAAGGCAACCTGAAAGCGATTTATGTGACCGAMETKCGATGCG
 AACGCGAGCATTGGCATGAAAAAATATTTTGTGGGCATTAACGCGCATGGCAAAGTG
 GCGATMETKCGCGAAAAAAATTGAAGGCGAAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGGC
 TGTTTACCCTGAGCAGCGGCAAAGATATTTGGCAGCAGCTGAGCGGCGGTGGCCAT
 CATCACCATCACCCTAA

20 pCART200 (SEQ ID NO: 38)

ATGGAMETKCTTMETKCGCGAACCAGGAAATTCGCTAMETKCGAAGTGACCCCGTAT
 CATGTGACCAGCGTGTGGACCAAAGGCGTGACCCCGCTGACCCCGGAACAGTTTCG
 CTATAACAACGAAGATGTGATTCATGCGCCGTATCTGGCGCATCAGGGCTGGTATGA
 TATTACCAAAGCGTTTGATGGCAAAGATAACCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGG
 25 GCAACATGCTGCATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAACCGAAATTGAAGCGTATCTGA
 GCAAACATCCGGAAAAACAGAAAATTATTTTTAACAAACCAGGAACTGTTTGATCTGAA
 AGCGGCGATTGATACCAAAGAMETKCCAGACCAACAGCCAGCTGTTTAACTATTTTC
 GCGATAAAGCGTTTCCGAACCTGAGCGCGCGCCAGCTGGGCGTGATGCCGGATCTG
 GTGCTGGATATGTTTATTAACGGCTATTATCTGAACGTGTTTAAAACCCAGAGCACCG
 30 ATGTGAACCGCCCGTATCAGGATAAAGATAAACGCGGCGGCATTTTTGATGCGGTGT
 TTACCCGCGGCGATCAGACCACCCTGCTGACCGCGCGCCATGATCTGAAAAACAAA
 GGCCTGAACGATATMETKCACCATTATTAACAGGAACTGACCGAAGGCCGCGCGCT
 GCGCTGAGCCATACCTATGCGAACGTGAGCATMETKCCATGTGATTAACCTGTGGG
 GCGCGGATTTTAAACGCGGAAGGCAACCTGGAAGCGATTTATGTGACCGAMETKCGAT

GCGAACGCGAGCATTGGCATGAAAAAATATTTTGTGGGCATTAACGCGCATGGCCAT
 GTGGCGATMETKCGCGAAAAAAATTGAAGGCGAAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGG
 GCCTGTTTACCCTGAGCAGCGGCAAAGATATTTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGC
 CATCATCACCATCACCCTAA

5 pCART201 (SEQ ID NO: 39)

ATGAGCGTGTGGACCAAAGGCGTGACCCCGCTGACCCCGGAACAGTTTCGCTATAA
 CAACGAAGATGTGATTCATGCGCCGTATCTGGCGCATCAGGGCTGGTATGATATTAC
 CAAAGCGTTTGATGGCAAAGATAACCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGGGCAACA
 TGCTGCATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAACCGAAATTGAAGCGTATCTGAGCAAAC
 10 ATCCGGAAAAACAGAAAATTATTTTAAACAACCAGGAACTGTTTGATCTGAAAGCGGC
 GATTGATACCAAAGAMETKCCAGACCAACAGCCAGCTGTTTAACTATTTTCGCGATAA
 AGCGTTTCCGAACCTGAGCGCGCGCCAGCTGGGCGTGATGCCGGATCTGGTGCTG
 GATATGTTTATTAACGGCTATTATCTGAACGTGTTTAAAACCCAGAGCACCGATGTGA
 ACCGCCCCGTATCAGGATAAAGATAAACGCGGCGGCATTTTTGATGCGGTGTTTACCC
 15 GCGGCGATCAGACCACCCTGCTGACCGCGCGCCATGATCTGAAAAACAAAGGCCTG
 AACGATATMETKCACCATTATTAACAGGAACTGACCGAAGGCCGCGCGCTGGCGCT
 GAGCCATACCTATGCGAACGTGAGCATMETKCCATGTGATTAACCTGTGGGGCGCG
 GATTTTAAACGCGGAAGGCAACCTGGAAGCGATTTATGTGACCGAMETKCGATGCGAA
 CGCGAGCATTGGCATGAAAAAATATTTTGTGGGCATTAACGCGCATGGCCATGTGGC
 20 GATMETKCGCGAAAAAAATTGAAGGCGAAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGCCTG
 TTTACCCTGAGCAGCGGCAAAGATATTTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCA
 TCACCATCACCCTAA

pCART202 (SEQ ID NO: 40)

ATGGACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAAGCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAG
 25 ATCACTTCTGTATGGACCAAAGGTGTTACACCACTAACACCCGAGCAGTTTACTCAAG
 GTGAAGATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAGGCTGGTACGATATCACCA
 AGGCCTTCGATGGGAAGGATAATCTCTTGTTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAATATG
 CTGCATTGGTGGTTTGATCAAAATAAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACC
 CTGAAAAGCAAAAAATCATTTTTAACAACCAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATC
 30 GATACCAAGGACAGTCAAACCAAMETKTCAGCTTTTTAATTATTTMETKAGATAAAGC
 CTTTCCAAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTTGTTTCMETKATAT
 GTTTATCAATGGTTACTACTTAAATGTGTTTAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGAC
 CTTATCAGGACAAGGACAAACGAGGTGGTATTTTCGATGCTGTTTTACCAGAGGAG
 ATCAGACAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAAATGACAT

CAGCACCATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATAC
 CTACGCCAATGTMETKCATMETKCCATGTGATTAAGTTGTGGGGAGCTGATTTTAATG
 CTGAAGGAAACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACTCAGATGCTAATGCGTCTATTG
 GTATGAAAAAATATTTTGTGCGGCATTAATGCTCATGGACATGTCGCCATTTCTGCCAA
 5 GAAAAMETKAAGGAGAAAAACATTGGCGCTCAAGTATMETKGCTTATTTACGCTTTCCA
 GTGGCAAGGACATTTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCAC
 TAA

pCART203 (SEQ ID NO: 41)

ATGGACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAAGCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAG
 10 ATCACTTCTGTATGGACCAAAGGTGTTACACCACCCGAGCAGTTTACTCAAGGTGAA
 GATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAGGCTGGTACGATATCACCAGGCC
 TTCGATGGGAAGGATAATCTCTTGTTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAATATGCTGCAT
 TGGTGGTTTGATCAAAATAAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAA
 AGCAAAAAATCATTTTTTAACAACCAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATCGATACC
 15 AAGGACAGTCAAACCAAMETKTCAGCTTTTTTAATTATTTMETKAGATAAAGCCTTTCCA
 AATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTTGTTCMETKATATGTTTATC
 AATGGTTACTACTTAAATGTGTTTAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGACCTTATCA
 GGACAAGGACAAACGAGGTGGTATTTTCGATGCTGTTTTACCAGAGGAGATCAGAC
 AACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAAATGACATCAGCACC
 20 ATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATACCTACGCCA
 ATGTMETKCATMETKCCATGTGATTAAGTTGTGGGGAGCTGATTTTAATGCTGAAGGA
 AACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACTCAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATGAAAA
 AATATTTTGTGCGGCATTAATGCTCATGGACATGTCGCCATTTCTGCCAAGAAAAMETK
 AAGGAGAAAACATTGGCGCTCAAGTATMETKGCTTATTTACGCTTTCCAGTGGCAAG
 25 GACATTTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART204 (SEQ ID NO: 42)

ATGGACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAAGCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAG
 ATCACTTCTGTATGGACCAAAGGTGTTACACCACCCGAGCAGTTTCGATATAATAACG
 AAGATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAGGCTGGTACGATATCACCAGG
 30 CCTTCGATGGGAAGGATAATCTCTTGTTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAATATGCTGC
 ATTGGTGGTTTGATCAAAATAAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACCCTGA
 AAAGCAAAAAATCATTTTTTAACAACCAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATCGATA
 CCAAGGACAGTCAAACCAAMETKTCAGCTTTTTTAATTATTTMETKAGATAAAGCCTTTC
 CAAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTTGTTCMETKATATGTTTA

TCAATGGTTACTACTTAAATGTGTTTAAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGACCTTAT
 CAGGACAAGGACAAACGAGGTGGTATTTTCGATGCTGTTTTACCAGAGGAGATCAG
 ACAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAAATGACATCAGCA
 CCATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATACCTACG
 5 CCAATGTMETKCATMETKCCATGTGATTAACCTTGTGGGGAGCTGATTTTAATGCTGAA
 GGAAACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACTCAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATG
 AAAAAATATTTTGTGCGCATTAATGCTCATGGACATGTCGCCATTTCTGCCAAGAAAA
 METKAAGGAGAAAACATTGGCGCTCAAGTATMETKGCTTATTTACGCTTTCCAGTGGC
 AAGGACATTTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

10 pCART206 (SEQ ID NO: 43)

ATGGACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAAGCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAG
 ATCACTTCTGTATGGACCAAAGGTGTTACACCACCCGAGCAGTTTACTCAAGGTGAA
 GATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAGGCTGGTACGATATCACCAGGCC
 TTCGATGGGAAGGATAATCTCTTGCTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAATATGCTGCAT
 15 TGGTGGTTTGATCAAAATAAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAA
 AGCAAAAAATCATTATTAACAACCAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATCGATAC
 CAAGGACAGTCAAACCAAMETKTCAGCTTTTTAATTATTTMETKAGATAAAGCCTTTCC
 AAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTTGTTMETKATATGTTTAT
 CAATGGTTACTACTTAAATGTGTTTAAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGACCTTATC
 20 AGGACAAGGACAAACGAGGTGGTATTTTCGATGCTGTTTTACCAGAGGAGATCAGA
 CAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAAATGACATCAGCAC
 CATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATACCTACGC
 CAATGTMETKCATMETKCCATGTGATTAACCTTGTGGGGAGCTGATTTTAATGCTGAAG
 GAAACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACTCAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATGAA
 25 AAAATATTTTGTGCGCATTAATGCTCATGGACATGTCGCCATTTCTGCCAAGAAAAAME
 TKAAGGAGAAAACATTGGCGCTCAAGTATMETKGCTTATTTACGCTTTCCAGTGGCAA
 GGACATTTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART207 (SEQ ID NO: 44)

ATGGACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAAGCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAG
 30 ATCACTTCTGTATGGACCAAAGGTGTTACACCACCCGAGCAGTTTACTCAAGGTGAA
 GATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAGGCTGGTACGATATCACCAGGCC
 TTCGATGGGAAGGATAATCTCTTGCTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAATATGCTGCAT
 TGGTGGTTTGATCAAAATAAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAA
 AGCAAAAAATCATTTTTTCGTAACCAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATCGATAC

CAAGGACAGTCAAACCAAMETKTCAGCTTTTTTAATTATTTMETKAGATAAAGCCTTTCC
 AAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTTGTTCMETKATATGTTTAT
 CAATGGTTACTACTTAAATGTGTTTAAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGACCTTATC
 AGGACAAGGACAAACGAGGTGGTATTTTCGATGCTGTTTTACCAGAGGAGATCAGA
 5 CAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAAATGACATCAGCAC
 CATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATACCTACGC
 CAATGTMETKCATMETKCCATGTGATTAAGTTGTGGGGAGCTGATTTTAATGCTGAAG
 GAAACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACTCAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATGAA
 AAAATATTTTGTGCGCATTAAATGCTCATGGACATGTCGCCATTTCTGCCAAGAAAAME
 10 TKAAGGAGAAAACATTGGCGCTCAAGTATMETKGCTTATTTACGCTTTCCAGTGGCAA
 GGACATTTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART208 (SEQ ID NO: 45)

ATGGACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAAGCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAG
 ATCACTTCTGTATGGACCAAAGGTGTTACACCACCCGAGCAGTTTACTCAAGGTGAA
 15 GATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAGGCTGGTACGATATCACCAGGCC
 TTCGATGGGAAGGATAATCTCTTGTTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAATATGCTGCAT
 TGGTGGTTTGATCAAAATAAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAA
 AGCAAAAAATCATTATTCGTAACCAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATCGATAC
 CAAGGACAGTCAAACCAAMETKTCAGCTTTTTTAATTATTTMETKAGATAAAGCCTTTCC
 20 AAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTTGTTCMETKATATGTTTAT
 CAATGGTTACTACTTAAATGTGTTTAAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGACCTTATC
 AGGACAAGGACAAACGAGGTGGTATTTTCGATGCTGTTTTACCAGAGGAGATCAGA
 CAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAAATGACATCAGCAC
 CATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATACCTACGC
 25 CAATGTMETKCATMETKCCATGTGATTAAGTTGTGGGGAGCTGATTTTAATGCTGAAG
 GAAACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACTCAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATGAA
 AAAATATTTTGTGCGCATTAAATGCTCATGGACATGTCGCCATTTCTGCCAAGAAAAME
 TKAAGGAGAAAACATTGGCGCTCAAGTATMETKGCTTATTTACGCTTTCCAGTGGCAA
 GGACATTTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

30 pCART210 (SEQ ID NO: 46)

ATGGATGATTATCAGCGCAACGCGACCGAAGCGTATGCGAAAGAAGTGCCGCATCA
 GATTACCAGCGTGTGGACCAAAGGCGTGACCCCGCCGGAACAGTTTACTCAAGGTG
 AAGATGTGATTCATGCGCCGTATCTGGCGAACCAGGGCTGGTATGATATTACCAAAG
 CGTTTGATGGCAAAGATAACCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGGGCAACATGCTG

CATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAACCGAAATTGAAGCGTATCTGAGCAAACATCCG
 GAAAAACAGAAAATTATTTTTTCGAACCAGGAACTGTTTGATCTGAAAGAAGCGATTG
 GCACCAAAGAMETKCCAGACCAACAGCCAGCTGTTTGAATATTTTCGCGATAAAGCG
 TTTCCGTATCTGAGCGCGCGCCAGCTGGGCGTGATGCCGGATCTGGTGCTGGATAT
 5 GTTTATTAACGGCTATTATCTGAACGTGTTTAAAACCCAGAGCACCGATGTGAAACGC
 CCGTATCAGGATAAAGATAAACGCGGCGGCATTGTTTATGCGGTGTTTACCCGCGGC
 AACCAGACCACCCTGCTGACCGCGCGCCATGATCTGAAAAACAAAGGCCTGAACGA
 TATMETKCAACATTATTAAGAAGAACTGACCAAAGGCCGCGCGCTGGCGCTGAGCC
 ATACCTATGCGAACGTGAGCATMETKCCATGTGATTAACCTGTGGGGCGCGGATTTT
 10 AACGCGGAAGGCAACCTGGAAGCGATTTATGTGACCGAMETKCGATGCGAACGCGA
 GCATTGGCATGAAAAAATATTTTGTGGGCATTAACAAACATGGCCATGTGGCGATME
 TKCGCGAAAAAAATTGAAGGCGAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGCCTGTTTACC
 CTGAGCAGCGGCAAAGATATTTGGCAGAACTGAACGGCGGTGGCCATCATCACCA
 TCACCACTAA

15 pCART217 (SEQ ID NO: 47)

ATGTCTGTATGGACCAAAGGTGTTACACCACCCGAGCAGTTTACTCAAGGTGAAGAT
 GTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAGGCTGGTACGATATACCAAGGCCTTC
 GATGGGAAGGATAATCTCTTGTTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAATATGCTGCATTG
 GTGGTTTGATCAAAATAAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAAAG
 20 CAAAAAATCATTTTTTCGTAACCAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATCGATACCAA
 GGACAGTCAAACCAAMETKTCAGCTTTTTAATTATTTMETKAGATAAAGCCTTTCCAAA
 TCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTTGTTTCMETKATATGTTTATCAA
 TGGTTACTACTTAAATGTGTTTAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGACCTTATCAG
 GACAAGGACAAACGAGGTGGTATTTTCGATGCTGTTTTACCAGAGGAAACCAGACA
 25 ACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAAATGACATCAGCACCA
 TTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATACCTACGCCAA
 TGTMETKCATMETKCCATGTGATTAACCTTGTGGGGAGCTGATTTTAATGCTGAAGGAA
 ACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACTCAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATGAAAAA
 ATATTTTGTGCGCATTAATGCTCATGGACATGTCGCCATTTCTGCCAAGAAAAMETKA
 30 AGGAGAAAACATTGGCGCTCAAGTATMETKGCTTATTTACGCTTTCCAGTGGCAAGG
 ACATTTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCACTAA

pCART219 (SEQ ID NO: 48)

ATGGACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAAGCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAG
 ATCACTTCTGTATGGACCAAAGGTGTTACACCACCCGAGCAGTTTACTCAAGGTGAA

GATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAGGCTGGTACGATATCACCAAGGCC
 TTCGATGGGGCGGATAATCTCTTGTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAATATGCTGCAT
 TGGTGGTTTGATCAAAATAAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAA
 AGCAAAAAATCATTTTTTCGTAACCAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATCGATAC
 5 CAAGGACAGTCAAACCAAMETKTCAGCTTTTTTAATTATTTMETKAGATAAAGCCTTTCC
 AAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTTGTTCMETKATATGTTTAT
 CAATGGTTACTACTTAAATGTGTTTAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGACCTTATC
 AGGACAAGGACAAACGAGGTGGTATTTTTCGATGCTGTTTTCCACCAGAGGAAATCAGA
 CAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAAATGACATCAGCAC
 10 CATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATACCTACGC
 CAATGTMETKCATMETKCCATGTGATTAACCTTGTGGGGAGCTGATTTTAATGCTGAAG
 GAAACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACTCAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATGAA
 AAAATATTTTGTGCGCATTAAATGCTCATGGACATGTCGCCATTTCTGCCAAGAAAAME
 TKAAGGAGAAAACATTGGCGCTCAAGTATMETKGCTTATTTACGCTTTCCAGTGGCAA
 15 GGACATTTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART226 (SEQ ID NO: 49)

ATGTCTGTATGGACCAAAGGTGTTACACCACCCGAGCAGTTTACTCAAGGTGAAGAT
 GTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAGGCTGGTACGATATCACCAAGGCCTTC
 GATGGGGCGGATAATCTCTTGTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAATATGCTGCATTG
 20 GTGGTTTGATCAAAATAAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAAAG
 CAAAAAATCATTTTTTCGTAACCAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATCGATACCAA
 GGACAGTCAAACCAAMETKTCAGCTTTTTTAATTATTTMETKAGATAAAGCCTTTCCAAA
 TCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTTGTTCMETKATATGTTTATCAA
 TGGTTACTACTTAAATGTGTTTAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGACCTTATCAG
 25 GACAAGGACAAACGAGGTGGTATTTTCGATGCTGTTTTCCACCAGAGGAAATCAGACA
 ACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAAATGACATCAGCACCA
 TTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATACCTACGCCAA
 TGTMETKCATMETKCCATGTGATTAACCTTGTGGGGAGCTGATTTTAATGCTGAAGGAA
 ACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACTCAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATGAAAAA
 30 ATATTTTGTGCGCATTAAATGCTCATGGACATGTCGCCATTTCTGCCAAGAAAAMETKA
 AGGAGAAAACATTGGCGCTCAAGTATMETKGCTTATTTACGCTTTCCAGTGGCAAGG
 ACATTTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART229 (SEQ ID NO: 50)

ATGGACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAAGCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAG
 ATCACTTCTGTATGGACCAAAGGTGTTACACCACCCGAGCAGTTTACTCAAGGTGAA
 GATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAGGCTGGTACGATATCACCAAGGCC
 TTCGATGGGAAGGATAATCTCTTGTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAATATGCTGCAT
 5 TGGTGGTTTGATCAAAATAAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAA
 AGCAAAAAATCATTTTTTCGTAACCAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATCGATAC
 CAAGGACAGTCAAACCAAMETKTCAGCTTTTTTAATTATTTMETKAGATAAAGCCTTTCC
 AAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTTGTTCMETKATATGTTTAT
 CAATGGTTACTACTTAAATGTGTTTAAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGACCTTATC
 10 AGGACAAGGACAAACGAGGTGGTATTTTCGATGCTGTTTTACCAGAGGAAACCAGA
 CAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAAATGACATCAGCAC
 CATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATACCTACGC
 CAATGTMETKCATMETKCCATGTGATTAAGTGTGGGGAGCTGATTTTAATGCTGAAG
 GAAACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACTCAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATGAA
 15 AAAATATTTTGTGCGCATTAAATGCTCATGGACATGTCGCCATTTCTGCCAAGAAAAAME
 TKAAGGAGAAAACATTGGCGCTCAAGTATMETKGCTTATTTACGCTTTCCAGTGGCAA
 GGACATTTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART191 (SEQ ID NO: 51)

ATGGATGATTATCAGCGCAACGCGACCGAAGCGTATGCGAAAGAAGTGCCGCATCA
 20 GATTACCAGCGTGTGGACCAAAGGCGTGACCCCGCTGACCCCGGAACAGTTTACCC
 AGGGCGAAGATGTGTTTCATGCGCCGTATGTGGCGAACCAGGGCTGGTATGATATTA
 CCAAAGCGTTTGATGGCAAAGATAACCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGGGCAAC
 ATGCTGCATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAGATCAGATTAAACGCTATCTGGAAGAAC
 ATCCGGAAAAACAGAAAATTAACCTTTAACGGCGAAAAACATGTTTGATGTGAAAAAAGC
 25 GATTGATACCAAAAACCATCAGCTGGAMETKCAAACTGTTTAACTATTTTAAAGAAAAA
 GCGTTTCCGTATCTGAGCGCGAAACATCTGGGCGTGTTTCCGGATCATGTGATTGAT
 ATGTTTATTAACGGCTATCGCCTGAGCCTGACCAACCATGGCCCGACCCCGGTGAAA
 GAAGGCAGCAAAGATCCGCGCGGCGGCATTTTTGATGCGGTGTTTACCCGCGGCAA
 CCAGAGCAAACCTGCTGACCAGCCGCCATGATTTTAAAAACAAAAACCTGAACGATAT
 30 METKCACCATTATTAACAGGAACTGACCAAAGGCAAAGCGCTGGGCCTGAGCCATA
 CCTATGCGAACGTGCGCATTAAACCATGTGATTAACTGTGGGGCGCGGATTTTAAACG
 CGGAAGGCAACCTGGAAGCGATTTATGTGACCGAMETKCGAMETKCAACGCGAGCA
 TTGGCATGAAAAAATATTTTGTGGGCGTGAACGCGCATGGCCATGTGGCGATMETKC
 GCGAAAAAAATTGAAGGCGAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGCCTGTTTACCCT

GAGCACCGGCCAGGAMETKCTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCAT
CACCCTAA

pCART192 (SEQ ID NO: 52)

ATGGATGATTATCAGCGCAACGCGACCGAAGCGTATGCGAAAGAAGTGCCGCATCA
5 GATTACCAGCGTGTGGACCAAAGGCGTGACCCCGCTGACCCCGGAACAGTTTACCC
AGGGCGAAGATGTGTTTCATGCGCCGTATGTGGCGAACCAGGGCTGGTATGATATTA
CCAAAGCGTTTGATGGCAAAGATAACCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGGGCAAC
ATGCTGCATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAGATCAGATTAAACGCTATCTGGAAGAAC
ATCCGGAAAAACAGAAAATTAACCTTTCGCGGCGAAAACATGTTTGATGTGAAAGAAG
10 CGATTTCGCACCAAAAACCATCAGCTGGAMETKCAAACCTGTTTGAATATTTTAAAGAAA
AAGCGTTTCCGTATCTGAGCGCGAAACATCTGGGCGTGTTTCCGGATCATGTGATTG
ATATGTTTATTAACGGCTATCGCCTGAGCCTGACCAACCATGGCCCGACCCCGGTGA
AAAAAGGCAGCAAAGATCCGCGCGGCGGCATTTTTGATGCGGTGTTTACCCGCGGC
AACCAGAGCAAACCTGCTGACCAGCCGCCATGATTTTAAAAACAAAACCTGAACGAT
15 ATMETKCAACATTATTAAGCGAACTGACCAACGGCAAAGCGCTGGGCCTGAGCCA
TACCTATGCGAACGTGCGCATTAACCATGTGATTAACTGTGGGGCGCGGATTTTAA
CGCGGAAGGCAACCTGGAAGCGATTTATGTGACCGAMETKCGAMETKCAACGCGAG
CATTGGCATGAAAAAATATTTTGTGGGCGTGAACAAACATGGCCATGTGGCGATMET
KCGCGAAAAAATTGAAGGCGAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGCCTGTTTACC
20 CTGAGCACCGGCCAGGAMETKCTGGCAGAACTGAACGGCGGTGGCCATCATCACC
ATCACCCTAA

pCART193 (SEQ ID NO: 53)

ATGGATGATTATCAGCGCAACGCGACCGAAGCGTATGCGAAAGAAGTGCCGCATCA
GATTACCAGCGTGTGGACCAAAGGCGTGACCCCGCTGACCCCGGAACAGTTTACCC
25 AGGGCGAAGATGTGTTTCATGCGCCGTATGTGGCGAACCAGGGCTGGTATGATATTA
CCAAAACCTTTAACGGCAAAGATGATCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGGGCAAC
ATGCTGCATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAGATCAGATTAAACGCTATCTGGAAGAAC
ATCCGGAAAAACAGAAAATTAACCTTTAACGGCGAACAGATGTTTGATGTGAAAGAAGC
GATTGATACCAAAAACCATCAGCTGGAMETKCAAACCTGTTTGAATATTTTAAAGAAAAA
30 GCGTTTCCGTATCTGAGCACCAACATCTGGGCGTGTTTCCGGATCATGTGATTGAT
ATGTTTATTAACGGCTATCGCCTGAGCCTGACCAACCATGGCCCGACCCCGGTGAAA
GAAGGCAGCAAAGATCCGCGCGGCGGCATTTTTGATGCGGTGTTTACCCGCGGCAA
CCAGAGCAAACCTGCTGACCAGCCGCCATGATTTTAAAGAAAAAAACCTGAAAGAAAT
METKCGATCTGATTAAACAGGAACTGACCGAAGGCAAAGCGCTGGGCCTGAGCCAT

ACCTATGCGAACGTGCGCATTAACCATGTGATTAACCTGTGGGGCGCGGATTTTGAT
 GCGGAAGGCAACCTGAAAGCGATTTATGTGACCGAMETKCGAMETKCAACGCGAGC
 ATTGGCATGAAAAAATATTTTGTGGGCGTGAACGCGGCGGGCAAAGTGGCGATMETK
 CGCGAAAAAAATTGAAGGCGAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGCCTGTTTACCC
 5 TGAGCACCGGCCAGGAMETKCTGGAACCAGACCAGCGGCGGTGGCCATCATCACCA
 TCACCACTAA

pCART194 (SEQ ID NO: 54)

ATGGATGATTATCAGCGCAACGCGACCGAAGCGTATGCGAAAGAAGTGCCGCATCA
 GATTACCAGCGTGTGGACCAAAGGCGTGACCCCGCTGACCCCGGAACAGTTTACCC
 10 AGGGCGAAGATGTGTTTCATGCGCCGTATGTGGCGAACCAGGGCTGGTATGATATTA
 CAAAAACCTTTAACGGCAAAGATGATCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGGGCAAC
 ATGCTGCATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAGATCAGATTAAACGCTATCTGGAAGAAC
 ATCCGGAAAAACAGAAAATTAACCTTTCGCGGCGAACAGATGTTTGATGTGAAAGAAG
 CGATTTCGCACCAAAAACCATCAGCTGGAMETKCAAACCTGTTTGAATATTTTAAAGAAA
 15 AAGCGTTTCCGTATCTGAGCACCAACATCTGGGCGTGTTTCCGGATCATGTGATTG
 ATATGTTTATTAACGGCTATCGCCTGAGCCTGACCAACCATGGCCCGACCCCGGTGA
 AAAAAGGCAGCAAAGATCCGCGCGGCGGCATTGTTTATGATGCGGTGTTTACCCGCGGC
 AACCAGAGCAAACCTGCTGACCAGCCGCCATGATTTTAAAGAAAAAACCTGAAAGAA
 ATMETKCGATCTGATTAAAGAAGAACTGACCAAAGGCAAAGCGCTGGGCCTGAGCCA
 20 TACCTATGCGAACGTGCGCATTAACCATGTGATTAACCTGTGGGGCGCGGATTTTGA
 TGCGGAAGGCAACCTGAAAGCGATTTATGTGACCGAMETKCGAMETKCAACGCGAG
 CATTGGCATGAAAAAATATTTTGTGGGCGTGAACAAAGCGGGCAAAGTGGCGATMET
 KCGCGAAAAAAATTGAAGGCGAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGCCTGTTTACC
 CTGAGCACCGGCCAGGAMETKCTGGAACCAGACCAACGGCGGTGGCCATCATCACC
 25 ATCACCACTAA

pCART205 (SEQ ID NO: 55)

ATGGATGATTATCAGCGCAACGCGACCGAAGCGTATGCGAAAGAAGTGCCGCATCA
 GATTACCAGCGTGTGGACCAAAGGCGTGACCCCGCCGGAACAGTTTACTCAAGGTG
 AAGATGTGATTCATGCGCCGTATGTGGCGAACCAGGGCTGGTATGATATTACCAAAG
 30 CGTTTGATGGCAAAGATAACCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGGGCAACATGCTG
 CATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAGATCAGATTAAACGCTATCTGGAAGAACATCCG
 GAAAAACAGAAAATTAACCTTTCGCGGCGAACAGATGTTTGATGTGAAAAAAGCGATTG
 ATACCAAAAACCATCAGCTGGAMETKCAAACCTGTTTAACTATTTTAAAGAAAAAGCGTT
 TCCGGGCCTGAGCGCGCGCCGCATTGGCGTGTTTCCGGATCATGTGATTGATATGT

TTATTAACGGCTATCGCCTGAGCCTGACCAACCATGGCCCGACCCCGGTGAAAGAA
 GGCAGCAAAGATCCGCGCGGGCGGCATTTTTGATGCGGTGTTTACCCGCGGCAACCA
 GAGCAAACCTGCTGACCAGCCGCCATGATTTTAAAAACAAAACCTGAACGATATMETK
 CACCATTATTAACAGGAACTGACCAAAGGCAAAGCGCTGGGCCTGAGCCATACCTA
 5 TGCGAACGTGAGCATTAACCATGTGATTAACCTGTGGGGCGCGGATTTTAACGCGGA
 AGGCAACCTGGAAGCGATTTATGTGACCGAMETKCGAMETKCAACGCGAGCATTGG
 CATGAAAAAATATTTTGTGGGCGTGAACGCGCATGGCCATGTGGCGATMETKCGCGA
 AAAAAATTGAAGGCGAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGCCTGTTTACCCTGAGC
 ACCGGCCAGGAMETKCTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACC
 10 ACTAA

Пример 2

Оценка активности (эффективности расщепления IgG)

ELISA

Ферментативную активность определяли с помощью анализа активности,
 15 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 полипептидной IgG-
 цистеиновой протеазы (испытуемой или контрольной) с анти-BSA антителом, после
 чего с помощью идентифицирующего антитела определяют количество анти-BSA
 20 антитела, связанного с лунками. Чем выше концентрация заданной полипептидной
 IgG-цистеиновой протеазы в лунке, тем меньше интактного анти-BSA полипептида
 будет закреплено в лунке, что приводит к получению более низкого уровня сигнала.
 Аналогично, полипептидная IgG-цистеиновая протеаза с более высокой
 эффективностью дает более низкий уровень сигнала, чем менее эффективная
 25 полипептидная IgG-цистеиновая протеаза 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
 30 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

5 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

10 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 отношение

15 активности каждого полипептида к активности IdeS. Отношение рCART124 затем может быть визуальное 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

20 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%

25 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

30 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

35 М H_2SO_4 . 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”.

5 Величины “отношения pCART124” для pCART191, 192, 193, 194, 197, 198, 200 и 201 представлены на Фиг. 1 вместе с результатом для pCART124. Все примеры представленных полипептидов согласно изобретению показывают активность, по меньшей мере эквивалентную активности контрольного IdeS (pCART124). pCART194, 197, 200 и 201 проявляют более высокую активность; так, активность
10 pCART197 и pCART201 в 8,0 раз превышает активность контрольного вещества.

Интересно отметить, что pCART200 и pCART201 включают модификации на N-конце последовательности. Кроме того, pCART194 и pCART197 содержат модификацию N138R/K. Ожидается, что замена на положительно заряженную аминокислоту в положении, соответствующем положению 139 в SEQ ID NO: 3, даст
15 результаты, аналогичные замещению N138R/K. Положения 138 и 139 находятся в петле бета-“шпильчатой” структуры, занимающей положения со 134 по 144 в SEQ ID NO: 3. На основании результатов, полученных согласно настоящему изобретению, ожидается, что замена на положительные аминокислоты в любом из положений 138 и 139 или в обоих этих положениях повышает активность IgG-цистеиновой
20 протеазы.

Результаты, полученные при исследовании pCART202, 203 и 204, представлены на Фиг. 2. В частности, активность pCART203 приблизительно в 3,5 раза превышает активность IdeS. Активность pCART202 превышает активность IdeS таким образом, что отношение их активностей составляет от 1 до 1,5. pCART204
25 имеет активность, сравнимую с активностью pCART144.

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
30 определения эффективности в чистом IgG субстрате, в качестве IgG1 применяли Адалимуаб (Humira), и в качестве 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 картинами расщепления, полученными при использовании IdeS (BX1001865 и pCART124) на том же субстрате. Применяли следующий протокол:

- 5 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 множественного титрования, и начинали реакцию расщепления, добавляя 25 мкл
- 10 либо препарата Humira, 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.

- 15 Для испытаний с IVIg каждый испытуемый полипептид или контрольное 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 разбавляли в отношении 1:2, получая титруемую серию концентраций от 15 мг/мл
- 20 до 0,0075 нг/мл.

- 25 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 считывали согласно стандартным протоколам.

- 30 На Фиг. 3 представлены картины расщепления, полученные на субстрате IgG1 при использовании pCART202, 203 и 204 в сравнении с обоими контрольными веществами IdeS (pCART124 и BX1001865) и IdeZ (pCART144). Концентрации ферментов составляли от 3,33 мг/мл (дорожка 1) до 0,02 нг/мл (дорожка 12) при поэтапном серийном разведении в отношении 1:3. Действие интактного адалимумаба (без фермента) показано дорожкой 13. Стрелками справа показаны различные продукты расщепления, получаемые из IgG. Стрелка 1: Интактный IgG; стрелка 2: scIgG (однократно расщепленный (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 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).

Фермент IdeZ (pCART144) проявляет более низкую эффективность расщепления и первой, и второй тяжелых цепей IgG. Эффективность IdeS (BX1001865 и pCART124) приблизительно в 3 раза превышает эффективность (т.е. на один этап титрования) pCART144 при расщеплении обеих тяжелых цепей. Эффективность расщепления при концентрации IdeS (BX1001865 и pCART124) 1,5 нг/мл (дорожка 8) равна эффективности расщепления при концентрации pCART144 (IdeZ), составляющей 4,6 нг/мл (дорожка 7). При действии BX1001865 и pCART124 в концентрации 4,6 нг/мл выявляются интенсивные полосы sclgG (стрелка 2) (дорожка 7), в то время как действие pCART144 в этой концентрации приводит к получению лишь слабой полосы sclgG (стрелка 2) (дорожка 7).

Важно отметить, что как pCART202, так и pCART203 проявляют более высокую активность при расщеплении IgG (дорожка 7 и дорожка 3) по сравнению с IdeZ (pCART144), что приводит к образованию более интенсивных полос sclgG (стрелка 2) и более интенсивных полос F(ab')₂ (стрелка 3). При действии фермента pCART204 не было отмечено повышенной эффективности. Было показано, что эффективность pCART202 при расщеплении второй тяжелой цепи IgG приблизительно равна эффективности IdeS (BX1001865 и pCART124) (сравнить с дорожкой 3). При расщеплении первой тяжелой цепи IgG pCART202 проявляет меньшую эффективность, чем IdeS, но более высокую эффективность, чем pCART144 (сравнить с дорожкой 7). Фермент pCART203 обладает еще более высокой эффективностью, чем IdeS при расщеплении, главным образом, второй тяжелой цепи IgG, что приводит к образованию более интенсивной полосы F(ab')₂ (стрелка 3) и менее выраженной полосы sclgG (стрелка 2) по сравнению с действием BX1001865 и pCART124 (стрелка 3 и 2) в концентрации 0,37 мг/мл (дорожка 3).

Таким образом, в целом, на Фиг. 3 показано, что внесение в последовательность IdeZ следующих изменений: R70T, Y71del, N72Q, N73G, которые имеются в pCART202 и pCART203, повышает эффективность расщепления второй тяжелой цепи IgG по сравнению с pCART144 (IdeZ). Кроме того, как видно из

действия pCART203, введение L64_T65del модификации также повышает эффективность расщепления первой тяжелой цепи.

На Фиг. 4 представлены картины расщепления, полученные на субстрате IVIg при использовании pCART202, 203 и 204 в сравнении с обоими контрольными веществами IdeS (pCART124 и BX1001865) и IdeZ (pCART144). Концентрации ферментов составляют от 30 мг/мл (дорожка 1) до 0,015 нг/мл (дорожка 12) при поэтапном серийном разведении в отношении 1:2. Стрелками справа показаны различные продукты расщепления, получаемые из IgG. Интактный IVIg (в отсутствии фермента) представлен на дорожке 13, за исключением изображения для pCART203, на котором указанная дорожка отсутствует. Стрелками справа показаны различные продукты расщепления, получаемые из IgG. Стрелка 1: Интактный IgG; стрелка 2: sIgG (однократно расщепленный 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 sIgG (между дорожками 6 и 7), и при проведении расщепления второй тяжелой цепи IgG, при котором sIgG превращается во фрагмент F(ab')₂ (между дорожками 2 и 3).

Фермент pCART144 (IdeZ) проявляет более высокую эффективность расщепления первой тяжелой цепи IgG (дорожка 6) по сравнению с IdeS (BX1001865 и pCART124), что приводит к образованию более интенсивной полосы sIgG (стрелка 2) и менее выраженной полосы интактного IgG (стрелка 1). Это, вероятно, объясняется более низкой степенью связывания нейтрализующих анти-IdeS антител с pCART144 (IdeZ) по сравнению с их распознаванием IdeS. Как показано на примере pCART202, pCART203 и pCART204, все полученные из IdeZ ферменты проявляют повышенную эффективность в реакции расщепления первой тяжелой цепи (дорожка 6). При концентрации 0,94 нг/мл (дорожка 6) действие pCART202, pCART203 и pCART204 приводит к образованию интенсивной полосы sIgG (стрелка 2), причем большая часть IgG оказывается однократно расщепленной, в то время как при той же концентрации IdeS было обнаружено менее 50% sIgG (дорожка 6).

Однако, pCART144 (IdeZ) хуже расщепляет вторую тяжелую цепь IgG по сравнению с IdeS (BX1001865 и pCART124). Это приводит к образованию более интенсивной полосы sIgG (стрелка 2) на дорожке 5 (1,9 нг/мл фермента), а также на дорожках 4 и 3 по сравнению с действием IdeS, в результате которого

расщепление продолжается до появления полос $F(ab')_2$ (стрелка 3) уже на следующем этапе титрования (дорожка 4, 3,75 мг/мл). Следует отметить, что при расщеплении на втором участке эффективность pCART203 сравнима с эффективностью IdeS (BX1001865 и pCART124) (дорожки 2, 3 и 4), и превышает

5 эффективность расщепления под действием IdeS и IdeZ (pCART144) на первом участке расщепления (дорожка 7).

Фермент pCART203 демонстрирует расщепление IgG при концентрации 0,5 нг/мл (дорожка 7), а при концентрации приблизительно 0,9 нг/мл в основном образуется sclgG (стрелка 2) (дорожка 6). Это соответствует 2-кратной

10 эффективности по сравнению с IdeS, под действием которого расщепление начинается при его концентрации, составляющей 0,9 нг/мл (дорожка 6), и полоса sclgG становится доминирующей при концентрации 1,9 нг/мл (дорожка 5). В целом, на Фиг. 4 показано, что внесение в структуру IdeZ модификаций L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q и N73G повышает эффективность расщепления человеческого IgG

15 даже в присутствии нейтрализующих ADA. Это видно при сравнении действия pCART203 с действием IdeS.

На Фиг. 5 представлены картины расщепления, полученные на субстрате IgG1 при использовании pCART205, 206, 207, 208 и 210, в сравнении с обоими контрольными IdeS (pCART124 и BX1001865) и IdeZ (pCART144). Концентрации

20 ферментов снижали при поэтапном серийном разведении в отношении 1:3 от 3,33 мг/мл (дорожка 1) до 0,02 нг/мл (дорожка 12). 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

25 тяжелой цепи IgG). 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).

30 Фермент pCART205 проявляет повышенную активность по сравнению с pCART144 (IdeZ) в расщеплении обеих тяжелых цепей IgG (дорожки 6 и 3), что приводит к образованию более интенсивной полосы sclgG (стрелка 2, дорожка 6), очень слабой полосы интактного IgG (стрелка 1, дорожка 6) и более интенсивной полосы $F(ab')_2$ (стрелка 3, дорожка 3) по сравнению с действием pCART144 (IdeZ)

(дорожка 6 и 3). Однако, в этом эксперименте в отсутствии нейтрализующих ADA (в отличие от ситуации, показанной на Фиг. 4), активность IdeS (pCART124) при расщеплении чистого IgG1 оказывается более высокой, чем активность pCART205.

Оба полипептида pCART207 и pCART210 проявляют повышенную IgG
 5 эффективность при расщеплении по сравнению с обоими IdeS (pCART124) и IdeZ (pCART144) (первое расщепление – дорожка 7 и второе расщепление – дорожка 3). Наибольшей эффективностью обладает фермент pCART207 – его эффективность расщепления обеих тяжелых цепей IgG приблизительно в 3 раза превышает эффективность IdeS (pCART124). Полное превращение в sclgG (стрелка 2) под
 10 действием pCART124 происходит при его концентрации, составляющей 14 нг/мл (дорожка 6), в то время как в присутствии pCART207 единственная полоса sclgG (стрелка 2) появляется уже при концентрации 4,6 нг/мл (дорожка 7). Повышение эффективности pCART207 по сравнению с pCART124 наблюдается при расщеплении второй тяжелой цепи IgG. Полоса F(ab')₂ (стрелка 3) более интенсивно
 15 проявляется при концентрации pCART207, составляющей 41 нг/мл (дорожка 4), чем в присутствии pCART124 в концентрации 0,37 мг/мл (дорожка 3).

В pCART207 и pCART210 имеются следующие модификации по сравнению с последовательностью IdeZ: L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, N138R. Таким образом, в целом из данных, представленных на Фиг. 5, видно, что эти изменения
 20 повышают эффективность расщепления человеческого IgG1.

На Фиг. 6 представлены картины расщепления, полученные на субстрате IgG2 при использовании pCART203, 205, 206, 207, 208 и 210 в сравнении с обоими контрольными IdeS (pCART124 и BX1001865) и IdeZ (pCART144). Концентрации ферментов изменяли в диапазоне от 3,33 мг/мл (дорожка 1) до 0,02 нг/мл (дорожка
 25 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). Вертикальные линии были добавлены для
 30 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).

Эффективность обоих ферментов pCART203 и pCART207 приблизительно в 3 раза превышает эффективность расщепления под действием pCART144 (IdeZ). При действии pCART144 наблюдали одну интенсивную полосу sclgG (стрелка 2) при концентрации 0,12 мг/мл (дорожка 4), которую можно сравнить с доминирующей

5 полосой sclgG (стрелка 2), получаемой под действием pCART203 и pCART207 при более низкой концентрации, составляющей 41 нг/мл (дорожка 5). Эффективность расщепления и первой, и второй тяжелых цепей IgG под действием pCART203 и pCART207 сравнима с действием IdeS (BX1001865 и pCART124) (дорожка 6 и дорожка 2). Однако, в отсутствии нейтрализующих ADA в этом эксперименте (в

10 отличие от эксперимента, показанного на Фиг. 4), активность IdeS (pCART124) в расщеплении обеих тяжелых цепей чистого IgG2 превышает активности pCART206, pCART208 и pCART210 в этих реакциях. Это показывает наличие одной интенсивной полосы sclgG (стрелка 2), присутствующей даже при самой высокой концентрации ферментов pCART206 и pCART208, составляющей 3,3 мг/мл (дорожка

15 1). Эффективность pCART205, полученного из гибридного IdeS/Z (pCART145), в реакции расщепления чистого человеческого IgG2 приблизительно равна эффективности IdeZ (pCART144) (дорожка 5 – участок первого расщепления и дорожка 2 – участок второго расщепления); при этом образуется единственная полоса sclgG (стрелка 2) при концентрации 0,12 мг/мл (дорожка 4) и доминирующая

20 полоса F(ab')₂ при самой высокой концентрации, составляющей 3,3 мг/мл (дорожка 1).

В целом, на Фиг. 6 показано, что наилучшие модификации IdeZ, т.е. те модификации, которые приводят к наибольшему повышению эффективности расщепления IgG2 – это модификации, имеющиеся в pCART203 и pCART207. В этих

25 ферментах имеются модификации L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, причем pCART207 дополнительно имеет еще и модификацию N138R.

На Фиг. 7 представлены картины расщепления, полученные на субстрате IVIg при действии pCART207, 208 и 210 в сравнении с контрольным IdeS (BX1001865). Концентрации ферментов изменяли в диапазоне от 30 мг/мл (дорожка 1) до 0,015

30 нг/мл (дорожка 12) при поэтапном серийном разведении в отношении 1:2. Интактный IVIg (в отсутствии фермента) представлен на дорожке 13. 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

35 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 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).

- 5 pCART207, pCART208 и pCART210 проявляют повышенную эффективность расщепления первой тяжелой цепи IgG (дорожка 6) по сравнению с IdeS (BX1001865). Действие IdeS (BX1001865) в концентрации 1,9 нг/мл в основном приводит к образованию sclgG (стрелка 2) (дорожка 5). Аналогичные результаты были получены при концентрации pCART207 и pCART210, в обоих случаях
- 10 составляющей 0,9 нг/мл (дорожка 6), и при концентрации pCART208, составляющей лишь 0,5 нг/мл (дорожка 7). В случае pCART208 эффективность расщепления первой тяжелой цепи повышается приблизительно в 4 раза. pCART208 проявляет повышенную эффективность расщепления второй тяжелой цепи IgG, которое приводит к появлению доминирующей полосы F(ab')₂ (стрелка 3) при концентрации
- 15 фермента 1,9 нг/мл (дорожка 5), в то время как под действием IdeS (BX1001865) в той же концентрации образуется только sclgG (стрелка 2).

В целом, На Фиг. 7 показано, что pCART207, pCART208 и pCART210 проявляют более высокую эффективность расщепления человеческого IgG в присутствии анти-IdeS нейтрализующих антител (ADA), чем IdeS. Аналогичный

20 результат был получен при действии pCART206 (данные не показаны). В последовательностях pCART206, 207, 208 и 210 имеются следующие модификации по сравнению с последовательностью IdeZ: L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q и N73G. Кроме того, pCART207, 208 и 210 также имеют модификацию N138R. Таким образом, данные, представленные на Фиг. 7, также подтверждают, что указанные

25 модификации повышают эффективность расщепления человеческого IgG в присутствии нейтрализующих ADA.

Пример 3

Оценка иммуногенности

Анализ конкурентного связывания анти-IdeS антител

- 30 Этот анализ основан на конкуренции между испытуемым полипептидом и IdeS за связывание с анти-IdeS антителом. Предварительная инкубация 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, после чего любое анти-IdeS антитело, не связанное с испытуемым полипептидом, будет связываться с IdeS, иммобилизованным на планшете. Для ингибирования расщепления IgG, все инкубации связывания были произведены в присутствии 2 мМ йодуксусной кислоты (ИАс) 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, 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.

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 ИАс и 1 М NaCl. С помощью поэтапных разбавлений испытуемого полипептида и 20 мг/мл IVIg в ФСБ, дополненном 0,1% BSA, 2 мМ ИАс и 1 М NaCl, был подготовлен 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 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 H_2SO_4 . Поглощение (OD) измеряли при λ равном 450 нм. Результаты инвертировали (получая значение $1/OD$) и представляли в виде отношения в сравнении с pCART124 ($1/(\text{испытуемый полипептид}/pCART124)$) для визуальной демонстрации на гистограммах.

Результаты, полученные при действии pCART191, 192, 193, 194, 197, 198, 200 и 201, представлены на Фиг. 8. Результаты, полученные при действии

pCART202, 203 и 204, представлены на Фиг. 9. Все испытуемые полипептиды проявляют значительное снижение распознавания анти-IdeS антителами по сравнению с IdeS. Самая низкая степень распознавания полипептида (pCART193) была приблизительно на 60% ниже, чем у IdeS. Уровни распознавания оставшихся
 5 испытуемых полипептидов были снижены на 70 или даже 80% по сравнению с IdeS.

Анти-IdeS анализ с определением титров

Этот анализ основан на сравнении IVIg титров при разбавлении. Различные испытуемые полипептиды и контрольные IdeS (BX10018865 и pCART124) наносили на планшеты для микротитрования. Связывание анти-IdeS антител с испытуемыми
 10 полипептидами или контрольными веществами оценивали, добавляя в планшеты титруемые количества IVIg (серия поэтапного разведения в отношении 1:2 от 40 до 0,625 мг/мл, т.е. титры соответствуют разведению сыворотки крови от 1:250 до 1:16000). Буфер разбавления содержал высокую концентрацию соли, в результате чего происходило связывание только при высокой степени аффинности (сродства),
 15 а также включал 2 мМ ИАс для ингибирования расщепления IgG. Пороговые значения OD (optical density, оптическая плотность) в каждом эксперименте устанавливали на уровне, приблизительно в 3 раза превышающем величину OD холостого опыта. В качестве документируемого результата для каждого испытуемого полипептида записывали титр разведения IVIg, при котором получали
 20 наименьшие значения OD (наименьшее связывание анти-IdeS антитела), превышающие пороговое значение. Другими словами, для полипептидов с низким распознаванием анти-IdeS антителами (ADA) требовался менее разбавленный IVIg, в то время как более разбавленный IVIg требовался для ферментов, хорошо распознаваемых антителами ADA. Вкратце, протокол состоял в следующем.

Эталонный IdeS и каждый из испытуемых ферментов наносили на планшеты для множественного титрования (2 мг/мл) и выдерживали в течение ночи, промывали ФСБ-Т и блокировали в течение 1 часа добавлением 2% BSA в ФСБ, дополненном 2 мМ ИАс. Блокирующий раствор удаляли, добавляли 50 мкл IVIg, полученного в поэтапном разбавлении (буфер разбавления: ФСБ 1М NaCl плюс
 30 0,1%BSA плюс 2 мМ ИАс), и инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре на устройстве для встряхивания. Планшеты промывали ФСБ-Т, добавляли детектор, биотинилированное козье антитело к человеческому F(ab')₂—специфическому фрагменту F(ab')₂ (20000-кратное разбавление), и инкубировали в течение 30 минут. Планшеты промывали, добавляли 40000-кратно разбавленную

SA-HRP (Pierce) и инкубировали в течение 30 минут. Планшеты промывали и проявляли с помощью ТМБ однокомпонентного хромогенного субстрата для HRP в течение 7 минут, и реакцию останавливали добавлением 0,5 М H₂SO₄. Поглощение (OD) измеряли при λ равном 450 нм.

5 Результаты взаимодействия с pCART202, 203 и 204 представлены на Фиг. 10. Разбавление всех трех испытуемых полипептидов в реакции распознавания с анти-IdeS антителами оказалось в 3 раза ниже, чем разбавление IdeS.

10 Результаты взаимодействия с pCART205, 206, 207, 208 и 210 представлены на Фиг. 11. Разбавление всех этих полипептидов, за исключением pCART206, в реакции распознавания с анти-IdeS антителами оказалось на 3 разбавления ниже, чем разбавление IdeS. Показатель pCART206 составил на 2 разбавления меньше. В целом, очевидно, что испытуемые полипептиды менее иммуногенны, чем IdeS.

Краткие выводы

15 Испытуемые полипептиды в целом более эффективно расщепляют человеческий IgG, чем IdeZ, и/или по меньшей мере расщепляют человеческий IgG с той же эффективностью, что и IdeS, а также обычно менее иммуногенны, чем IdeS.

Пример 4

Оценка активности

Активность в испытании ELISA

20 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
25 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
30 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 расщеплении второй тяжелой цепи молекулы IgG, т.е. концентрации, при которых половина молекул IgG расщеплена один раз и половина молекул IgG полностью расщеплена. 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. 18).

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% рыбьем желатине в ФСБ-Т (фосфатно-солевом буферном растворе с добавлением Твин (Tween)) (блокирующий буфер) в течение 45-120 минут при комнатной температуре. Контрольный IdeS (pCART124) и испытуемые полипептидные IgG-цистеиновые 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 полипептидной 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 со Strep-sulfo (стрептавидином-сульфо) (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.

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

Полученные в анализах активности испытуемых IgG цистеиновых протеаз кривые дозировка-ответ представлены на Фиг. 12 (расщепление IgG1) и Фиг. 13 (расщепление IgG2). Примеры полипептидов согласно изобретению pCART207, 217, 219, эффективность которых была исследована, проявляли более высокую активность (пониженные значения EC50) расщепления обеих тяжелых цепей IgG1 (Фиг. 12) по сравнению с контрольным IdeS полипептидом pCART124 (Таблица 1), причем кратность повышения активности составила 1,4 для pCART219, 3,2 для pCART217 и 4,0 для pCART207. pCART226 проявлял несколько более низкую активность по сравнению с IdeS (pCART124) – отношение их EC50 составило 0,6 (Таблица 1). В расщеплении IgG2 (на Фиг. 13) все испытуемые полипептиды проявляли более низкую активность, чем исходный IdeS (pCART124), имея более высокие значения EC50 (Таблица 1) и отношение активностей менее 1 при расщеплении второй тяжелой цепи IgG. Однако, все испытуемые полипептиды обладали более высокой активностью, чем pCART144 (SEQ ID NO: 27) (данные не показаны), который представляет собой последовательность, из которой были получены полипептидные IgG цистеиновые протеазы согласно изобретению.

Визуализация результатов анализов эффективности на геле

Визуализация результатов расщепления IgG1 (Фиг. 14A) и IgG2 (Фиг. 14B) на геле ясно показывает расщепление первой и второй тяжелых цепей (вертикальными линиями на фигурах отмечено расщепление первой и второй 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 (sclgG) и 50% полностью расщеплено (F(ab')₂).

Данные, полученные на геле, представлены в Таблице 2 (расщепление IgG1) и Таблице 3 (расщепление IgG2). Расщепление первой тяжелой цепи IgG1 (Humira) происходит приблизительно при одинаковой концентрации, 1,5 нг/мл IdeS (pCART124 и BX1001865), pCART207 и 217, но для получения доминирующей

5 полосы scIgG требуется несколько более высокая концентрация pCART219 и 226, составляющая приблизительно 4,6 (Таблица 2). Однако, pCART207, 217 и 219 демонстрируют более высокую, чем IdeS (pCART124 и BX1001864), эффективность в расщеплении второй тяжелой цепи IgG1 (Таблица 2); их эффективность в реакции расщеплении приблизительно в 3 раза выше (один этап титрования), причем

10 концентрации составляют приблизительно 370 нг/мл для IdeS и приблизительно 120 нг/мл для pCART207, 217 и 219. Эффективность pCART207, 217, 219 в расщеплении IgG2 (XGEVA) (Фиг. 14B) снижена на один этап титрования (1:3) относительно эффективности IdeS, и эффективность pCART226 снижена приблизительно на два этапа титрования (1:6) относительно эффективности IdeS в расщеплении первой и

15 второй тяжелых цепей IgG (Таблица 3). Эффективность pCART229 приблизительно равна эффективности IdeS (BX1001865 и pCART124) при расщеплении первой (4,6 нг/мл) и второй (370 нг/мл) тяжелых цепей IgG1 (Humira) (Фиг. 15A и Таблица 4), в то время как в расщеплении IgG2 (XGEVA) pCART229 приблизительно на один этап титрования (1:3) менее эффективен, чем IdeS при расщеплении первой и второй

20 тяжелых цепей IgG (Фиг. 15B и Таблица 4).

Полипептидные IgG цистеиновые протеазы pCART207, 217, 219 и 226 также титровали в объединенном человеческом IgG, IVIg (Octagam), применяя в качестве контрольного вещества IdeS (BX1001865) (Фиг. 16). Все перечисленные протеазы проявляли более высокую эффективность расщепления первой тяжелой цепи IgG

25 препарата IVIg по сравнению с IdeS. Для протекания первого расщепления и образования scIgG, концентрации pCART207, 217, 219 и 226 должны были составлять 0,75 мг/мл, в то время как концентрация IdeS (BX1001865) должна были составлять 1,5 мг/мл (Фиг. 16 и Таблица 5). В реакции второго расщепления pCART207 и 217 были более эффективны, чем IdeS (BX1001865), и для

30 преимущественного образования фрагментов F(ab')₂ их концентрации должны были составлять 3 мг/мл, в то время как концентрация IdeS должна были составлять приблизительно 6 мг/мл (Фиг. 16 и Таблица 5). pCART219 и 226 были менее эффективны во втором расщеплении IgG в объединенном препарате IVIg по сравнению с IdeS. Расщепление IVIg под действием pCART229 анализировали в

35 более широком диапазоне титрования при поэтапном разбавлении 1:2, начиная с

концентрации 30 мг/мл (на Фиг. 17), по сравнению с полипептидами, результаты исследований которых представлены на Фиг. 16. Одинаковая эффективность была отмечена в опытах с IdeS (BX1001865 и pCART124) и pCART229 (Фиг. 17); так, при концентрации 1,9 мг/мл образовывались sIgG, и при концентрации 7,5 мг/мл образовывались фрагменты F(ab')₂ (Таблица 6).

Краткое описание графических материалов Примера 4

Фиг. 12: Кривые титрования при расщеплении IgG1 (Humira) различными полипептидами IgG-цистеиновой протеазы.

Фиг. 13: Кривые титрования при расщеплении IgG2 (XGEVA) различными полипептидами IgG-цистеиновой протеазы.

Фиг. 14: Анализ расщепления IgG способом SDS-PAGE с использованием титруемых (разбавление 1:3, начиная с концентрации 3300 нг/мл) количеств pCART207, 217, 219 и 226 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 отмечено приблизительное значение EC50 в этом эксперименте.

Фиг. 15: Анализ расщепления IgG способом SDS-PAGE с использованием титруемых (разбавление 1:3, начиная с концентрации 3300 нг/мл) количеств pCART229 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).

Фиг. 16: 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) в качестве контроля в том же эксперименте по расщеплению.

Фиг. 17: Анализ расщепления IVIg способом SDS-PAGE с использованием титруемых количеств (разбавление 1:2, начиная с концентрации 30 мг/мл) pCART228 с применением BX1001865 и pCART124 (исходный IdeS) в качестве контроля в том же эксперименте по расщеплению.

5 Фиг. 18: 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 расщепляется следующая тяжелая цепь, и высвобождается Fc-часть. Fc-часть все еще связана с Fab-частью молекулы sclgG, и поскольку в анализе активности ELISA идентифицирующее антитело
10 распознает Fc-часть молекулы IgG, то в этом анализе невозможно отличить целый IgG от sclgG.

Обсуждение и заключение

Более низкие значения EC50, полученные в опытах с pCART207, 217, 219 в
15 анализе ELISA определения активности с использованием Humira, свидетельствуют об их более высокой активности в процессе второго расщепления IgG1 (sclgG до F(ab')₂) по сравнению с pCART124 (исходный IdeS). Относительно более низкая активность pCART226 в расщеплении IgG1 наблюдалась как в анализе ELISA определения активности с использованием Humira, так и в анализе эффективности
20 с использованием Humira, проводимом способом SDS-PAGE.

В анализе ELISA определения активности с использованием XGEVA было показано, что все испытываемые полипептиды pCART207, 217, 219 и 226 имеют более низкую активность по сравнению с IdeS (pCART124) в процессе расщепления обеих IgG тяжелых цепей IgG2. Однако, при визуальном представлении расщепления на
25 геле становится ясно, что pCART207 имеет приблизительно такую же активность, что и IdeS (BX1001865 и pCART124) в процессе расщепления первой тяжелой цепи IgG, но при этом он приблизительно в 3 раза менее эффективен (один этап титрования), чем IdeS, в процессе расщепления второй тяжелой цепи. Такая же картина была обнаружена при действии pCART229, который проявлял высокую
30 эффективность при расщеплении IgG1, сравнимую с активностью IdeS, но при этом обладал меньшей эффективностью в расщеплении IgG2, то есть в разрезании второй тяжелой цепи IgG. При анализе расщепления IgG на геле хорошо прослеживается расщепление первой тяжелой цепи (от IgG до sclgG), но расщепление не отслеживается в анализе ELISA для определения активности с

использованием Fc-специфичного идентифицирующего антитела. Большая часть воздействий, которые опосредует Fc, недоступна для IgG после однократного расщепления молекулы (данные не показаны), что чрезвычайно важно для клинической ситуации, где главной задачей становится нейтрализация патогенных молекул IgG.

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, и некоторые из этих антител являются нейтрализующими, т.е. связывание этих IdeS-специфичных антител с IdeS будет снижать или полностью исключать активность IgG протеазы в IdeS. Таким образом, результаты расщепления IVIg под действием различных полипептидных IgG цистеиновых протеаз показывают общее расщепление всех четырех подклассов человеческого IgG приблизительно в соотношениях, обычно наблюдаемых в сыворотке крови человека, а также в присутствии нейтрализующих анти-IdeS антител.

В общем, все протестированные полипептидные IgG цистеиновые протеазы проявляли более низкую эффективность в процессе расщепления IgG2, чем при расщеплении IgG1. pCART207, 217 и 219 более эффективны, чем IdeS, в расщеплении IgG1, но менее эффективны, главным образом, в расщеплении второй тяжелой цепи IgG2. Полосы scIgG, видимые на Фиг. 16 при самой высокой дозировке (6 мг/мл) pCART207, 217, 219 и 226 и на Фиг. 17 для pCART229 вероятнее всего представляют молекулы IgG2 в объединенном препарате IgG, IVIg (сравним Фиг. 14А с Фиг. 14В и Фиг. 15А с Фиг. 15В).

Таблица 1

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

	EC50 (нг/мл) при расщеплении IgG1 (Humira)	Отношение активностей	EC50 (нг/мл) при расщеплении IgG2 (XGEVA)	Отношение активностей
PCART124	258	1	225	1
PCART207	64	4,0	444	0,5
pCART217	82	3,2	486	0,5

pCART219	183	1,4	1508	0,15
pCART226	433	0,6	3156	0,07

Таблица 2

- Данные расщепления IgG1 (Humira), полученные на геле (Фиг. 14А). 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. 14А).

ID	Первая тяжелая цепь IgG IgG до sclgG Конц. фермента (нг/мл)	Вторая тяжелая цепь IgG sclgG до F(ab') ₂ Конц. фермента (нг/мл)	Прибл. величина EC50, т.е. равные количества sclgG и F(ab') ₂ (*) Конц. фермента (нг/мл)
BX1001865	1,5	370	100
PCART124	1,5	370	100
PCART207	1,5	120	10-40
pCART217	1,5	120	40-100
pCART219	4,5	120	40-100
pCART226	4,5	370	100-400

Таблица 3

- Данные расщепления IgG2 (XGEVA), полученные на геле (Фиг. 14В). 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. 14В).

ID	Первая тяжелая цепь IgG IgG до sclgG Конц. фермента (нг/мл)	Вторая тяжелая цепь IgG sclgG до F(ab') ₂ Конц. фермента (нг/мл)	Прибл. величина EC50, т.е. равные количества sclgG и F(ab') ₂ (*) Конц. фермента (нг/мл)
BX1001865	14	370	100-400
PCART124	14	370	100-400
PCART207	41	1100	400-1100
pCART217	41	1100	400-1100
pCART219	41	3300	1100
pCART226	120	3300	1100-3300

Таблица 4

Данные расщепления IgG1 (Humira) и IgG2 (XGEVA) под действием pCART229, полученные на геле (Фиг. 15). 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 sclgG Конц. фермента (нг/мл)	Вторая тяжелая цепь IgG (Humira) sclgG до F(ab') ₂ Конц. фермента (нг/мл)	Первая тяжелая цепь IgG (XGEVA) IgG до sclgG Конц. фермента (нг/мл)	Вторая тяжелая цепь IgG (XGEVA) sclgG до F(ab') ₂ Конц. фермента (нг/мл)
BX1001865	4,6	370	14	1100
PCART124	4,6	370	14	1100
pCART229	4,6	370	122	3300

Таблица 5

Данные расщепления IVIg под действием pCART207, 217, 219 и 226, полученные на геле (Фиг. 16). 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 sclgG Конц. фермента (нг/мл)	Вторая тяжелая цепь IgG sclgG до F(ab') ₂ Конц. фермента (нг/мл)
BX1001865	1500	6000
PCART124	1500	6000
PCART207	750	3000
pCART217	750	3000
pCART219	750	6000
pCART226	750	6000

Таблица 6

Данные расщепления IVIg под действием pCART229, полученные на геле (Фиг. 17).

- 5 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 sclgG Конц. фермента (нг/мл)	Вторая тяжелая цепь IgG sclgG 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

- 10 Конкуренцию за центры связывания между антителами к лекарственному средству (ADA) и IdeS определяли для “ADA”-модифицированных полипептидов согласно изобретению (pCART207, 217, 219 и 226) 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
- 15 (pCART124). Сыворотка крови большинства людей содержит антитела к IdeS, выработанные благодаря перенесенным ранее инфекциям, вызываемым *S. pyogenes*. 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 из объединенной сыворотки крови 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 испытуемым полипептидом для последующего определения центров распознавания ADA или с положительным контролем IdeS (pCART124) в молярном отношении 1:100 со 100-кратным избытком испытуемого полипептида. 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 полипептиды 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 полипептидных IgG цистеиновых протеаз в 100 раз превышала концентрацию ADA, с учетом разности в молярных массах между антителом, масса которого составляет 150 кДа, и IdeZ, 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 испытуемые полипептиды, 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 отсутствии IdeS (pCART124) или любой другой IgG цистеиновой протеазы, и полученную величину принимали за 80% от максимальной величины 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 полипептидной IgG цистеиновой протеазы 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 (IHAc) 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 IHAc в ФСБ при изменении концентрации от 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 контрольного IdeS (pCART124) или испытуемых полипептидных IgG цистеиновых протеаз.

Планшет, на который наносили pCART124, трижды промывали, и затем 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

10 Процентные доли (%) блокированных центров связывания IdeS-ADA в pCART207, 217, 219 и 226 представлены на Фиг. 19 и 20; исходный IdeS pCART124 применяют в качестве положительного контроля 100% схождения.

15 Все испытуемые полипептидные IgG цистеиновые протеазы, pCART207, 217, 219 и 226, занимают меньшее количество центров связывания ADA в сыворотке крови человека по сравнению с исходным IdeS (pCART124). У пациентов, которым один раз вводили IdeS (Объединенная сыворотка-2 Фазы II) вырабатывалось большее количество IdeS-специфичных ADA и наблюдалось минимальное распознавание pCART207, 217 и 219 (На Фиг. 20) по сравнению с объединенной сывороткой крови здоровых добровольцев (Объединенная человеческая сыворотка 20 1191807) (Фиг. 19).

Пример 6

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

25 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).

30 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 протеазы, pCART207, pCART217, pCART219 и pCART226. Спустя два часа отбирали образцы сыворотки крови, и мышей умерщвляли.

Анализ эффективности ELISA

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
 5 испытываемые 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
 10 должен обладать полипептид IgG-цистеиновой протеазы.

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)
 15 и производили блокировку выдерживанием в 2% BSA в ФСБ-Т (блокирующий 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 полипептидные IgG-
 20 цистеиновые протеазы размораживали и разбавляли блокирующим буфером в 100000 раз, после чего добавляли в аналитический планшет для множественного титрования. Планшет инкубировали 2 часа при встряхивании при КТ и затем промывали ФСБ-Т. Биотинилированное мышинное антитело, специфическое к человеческому Fc IgG (600 нг/мл) (Jackson #109-066-098) смешивали со Strep-sulfo
 25 (стрептавидином-сульфо) (200 нг/мл) (MSD #R32AD-1) и добавляли в планшет для множественного 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
 30 анализировали на считывателе планшетов MSD (Meso Scale Discovery) QuickPlex SQ 120, Модель 1300.

Визуальное представление эффективности на геле

Для визуального представления расщепления человеческого IgG *in vivo* в организме мышей 10 мкл сыворотки крови разбавляли 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, sIgG 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
 5 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.

Результаты и выводы

Расщепление человеческого IVIg (Octagam) *in vivo* под действием IdeS (BX1001865 и pCART124) и pCART207, 217, 219 и 226 сравнивали посредством
 10 определения уровня человеческого IgG в сыворотке крови с помощью анализа эффективности ELISA, а также анализировали разложение IgG способом SDS-PAGE.

Введение IVIg мышам IdeS (BX1001865 и pCART 124) и различных IgG
 15 цистеиновых протеаз pCART207, pCART217, pCART219 и pCART226 ясно показывает расщепление человеческого IgG *in vivo* в организме мышей (Таблица 7 и Фиг. 21).

Наблюдали полное расщепление контрольного IdeS (BX1001865), pCART207 и pCART217 при отсутствии на геле видимых полос sIgG и наличии значительных
 20 полос F(ab')₂ (Фиг. 22). В опытах с мышами pCART219 и pCART226 проявляли более низкую эффективность: спустя два часа молекулы sIgG все еще присутствовали в сыворотке крови мышей (Фиг. 22C). Однако, на геле не наблюдали полос интактного IVIg, что указывает на то, что более высокая концентрация IgG-Fc, обнаруживаемая
 25 идентифицирующим антителом (полоса выше) при действии pCART219 и pCART226, имеющаяся на Фиг. 21, получена из sIgG, а не интактного IgG. Мыши No. 2 в группе, получавшей pCART207, и мыши No. 4 в группе, получавшей pCART219, не делали инъекции IVIg (Фиг. 22B и C), и, таким образом, на геле не
 30 было обнаружено фрагментов расщепления IgG, полученных из организмов этих животных. Расположения полос белков показывает распределение фоновых белков в сыворотке крови мышей BALB/c. Это свидетельствует о том, 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/испытуемые IgG цистеиновые протеазы, проведенный с помощью исследования эффективности ELISA (среднее $\pm$ среднеквадратичное отклонение))

	Среднее (мг/мл)	Среднеквадратичное отклонение
Контроль (ФСБ)	6,58	0,80
PCART124	0,30	0,05
PCART207	0,39	0,12
pCART217	0,66	0,03
pCART219	0,78	0,05
pCART226	0,99	0,18
PCART124	1,80	0,85

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> HANSA MEDICAL AB

<120> ЦИСТЕИНОВАЯ ПРОТЕАЗА

<130> N404881WO

<160> 55

<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> 349
<212> белок
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 3

Met Lys Thr Ile Ala Tyr Pro Asn Lys Pro His Ser Leu Ser Ala Gly
1 5 10 15

Leu Leu Thr Ala Ile Ala Ile Phe Ser Leu Ala Ser Ser Asn Ile Thr
20 25 30

Tyr Ala Asp Asp Tyr Gln Arg Asn Ala Thr Glu Ala Tyr Ala Lys Glu
35 40 45

Val Pro His Gln Ile Thr Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Leu
50 55 60

Thr Pro Glu Gln Phe Arg Tyr Asn Asn Glu Asp Val Ile His Ala Pro
65 70 75 80

Tyr Leu Ala His Gln Gly Trp Tyr Asp Ile Thr Lys Ala Phe Asp Gly
85 90 95

Lys Asp Asn Leu Leu Cys Gly Ala Ala Thr Ala Gly Asn Met Leu His
100 105 110

Trp Trp Phe Asp Gln Asn Lys Thr Glu Ile Glu Ala Tyr Leu Ser Lys
115 120 125

His Pro Glu Lys Gln Lys Ile Ile Phe Asn Asn Gln Glu Leu Phe Asp
130 135 140

Leu Lys Ala Ala Ile Asp Thr Lys Asp Ser Gln Thr Asn Ser Gln Leu
145 150 155 160

Phe Asn Tyr Phe Arg Asp Lys Ala Phe Pro Asn Leu Ser Ala Arg Gln
165 170 175

Leu Gly Val Met Pro Asp Leu Val Leu Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr
180 185 190

Tyr Leu Asn Val Phe Lys Thr Gln Ser Thr Asp Val Asn Arg Pro Tyr
195 200 205

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

Gly Asp Gln Thr Thr Leu Leu Thr Ala Arg His Asp Leu Lys Asn Lys
225 230 235 240

Gly Leu Asn Asp Ile Ser Thr Ile Ile Lys Gln Glu Leu Thr Glu Gly
245 250 255

Arg Ala Leu Ala Leu Ser His Thr Tyr Ala Asn Val Ser Ile Ser His
260 265 270

Val Ile Asn Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asn Ala Glu Gly Asn Leu Glu
275 280 285

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

Lys Tyr Phe Val Gly Ile Asn Ala His Gly His Val Ala Ile Ser Ala
305 310 315 320

Lys Lys Ile Glu Gly Glu Asn Ile Gly Ala Gln Val Leu Gly Leu Phe
325 330 335

Thr Leu Ser Ser Gly Lys Asp Ile Trp Gln Lys Leu Ser
340 345

<210> 4
<211> 315
<212> белок
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 4

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 Leu Thr Pro
20 25 30

Glu Gln Phe Arg Tyr Asn Asn Glu Asp Val Ile His Ala Pro Tyr Leu
35 40 45

Ala His Gln Gly Trp Tyr Asp Ile Thr Lys Ala Phe Asp Gly Lys Asp
50 55 60

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

Phe Asp Gln Asn Lys Thr Glu Ile Glu Ala Tyr Leu Ser Lys His Pro
85 90 95

Glu Lys Gln Lys Ile Ile Phe Asn Asn Gln Glu Leu Phe Asp Leu Lys
100 105 110

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

Tyr Phe Arg Asp Lys Ala Phe Pro Asn Leu Ser Ala Arg Gln Leu Gly
130 135 140

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

Asn Val Phe Lys Thr Gln Ser Thr Asp Val Asn Arg Pro Tyr Gln Asp
165 170 175

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

Gln Thr Thr Leu Leu Thr Ala Arg His Asp Leu Lys Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Asn Asp Ile Ser Thr Ile Ile Lys Gln Glu Leu Thr Glu Gly Arg Ala
210 215 220

Leu Ala Leu Ser His Thr Tyr Ala Asn Val Ser Ile Ser His Val Ile
225 230 235 240

Asn Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asn Ala Glu Gly Asn Leu Glu Ala Ile
245 250 255

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

Phe Val Gly Ile Asn Ala His Gly His Val Ala Ile Ser Ala Lys Lys
275 280 285

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

Ser Ser Gly Lys Asp Ile Trp Gln Lys Leu Ser
305 310 315

<210> 5

<211> 313

<212> белок

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 5

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

260

265

270

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

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

Gly Gln Asp Ser Trp Gln Lys Leu Ser
 305 310

<210> 6

<211> 315

<212> белок

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 6

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 Leu Thr Pro
 20 25 30

Glu Gln Phe Arg Tyr Asn Asn Glu Asp Val Ile His Ala Pro Tyr Leu
 35 40 45

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

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

Phe Asp Gln Asn Lys Thr Glu Ile Glu Ala Tyr Leu Ser Lys His Pro
 85 90 95

Glu Lys Gln Lys Ile Ile Phe Arg Asn Gln Glu Leu Phe Asp Leu Lys
 100 105 110

Glu Ala Ile Arg Thr Lys Asp Ser Gln Thr Asn Ser Gln Leu Phe Glu
 115 120 125

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

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

Asn Val Phe Lys Thr Gln Ser Thr Asp Val Lys Arg Pro Tyr Gln Asp
 165 170 175

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

Gln Thr Thr Leu Leu Thr Ala Arg His Asp Leu Lys Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Asn Asp Ile Ser Thr Ile Ile Lys Glu Glu Leu Thr Lys Gly Arg Ala
210 215 220

Leu Ala Leu Ser His Thr Tyr Ala Asn Val Ser Ile Ser His Val Ile
225 230 235 240

Asn Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asn Ala Glu Gly Asn Leu Glu Ala Ile
245 250 255

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

Phe Val Gly Ile Asn Lys His Gly His Val Ala Ile Ser Ala Lys Lys
275 280 285

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

Ser Ser Gly Lys Asp Ile Trp Gln Lys Leu Asn
305 310 315

<210> 7

<211> 315

<212> белок

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 7

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 Leu Thr Pro
20 25 30

Glu Gln Phe Arg Tyr Asn Asn Glu Asp Val Ile His Ala Pro Tyr Leu
35 40 45

Ala His Gln Gly Trp Tyr Asp Ile Thr Lys Thr Phe Asn Gly Lys Asp
50 55 60

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

Phe Asp Gln Asn Lys Thr Glu Ile Glu Ala Tyr Leu Ser Lys His Pro
85 90 95

Glu Lys Gln Lys Ile Ile Phe Asn Asn Glu Glu Leu Phe Asp Leu Lys
100 105 110

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

Tyr Phe Lys Glu Lys Ala Phe Pro Asn Leu Ser Thr Arg Gln Leu Gly
130 135 140

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

Asn Val Phe Lys Thr Gln Ser Thr Asp Val Asn Arg Pro Tyr Gln Asp
165 170 175

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

Gln Thr Thr Leu Leu Thr Ala Arg His Asp Phe Lys Glu Lys Gly Leu
195 200 205

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

Leu Ala Leu Ser His Thr Tyr Ala Asn Val Ser Ile Ser His Val Ile
225 230 235 240

Asn Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asp Ala Glu Gly Asn Leu Lys Ala Ile
245 250 255

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

Phe Val Gly Ile Asn Ala His Gly Lys Val Ala Ile Ser Ala Lys Lys
275 280 285

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

Ser Ser Gly Lys Asp Ile Trp Gln Gln Leu Ser
305 310 315

<210> 8
<211> 315
<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 Leu Thr Pro
20 25 30

Glu Gln Phe Arg Tyr Asn Asn Glu Asp Val Ile His Ala Pro Tyr Leu
35 40 45

Ala His Gln Gly Trp Tyr Asp Ile Thr Lys Ala Phe Asp Gly Lys Asp
50 55 60

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

Phe Asp Gln Asn Lys Thr Glu Ile Glu Ala Tyr Leu Ser Lys His Pro
85 90 95

Glu Lys Gln Lys Ile Ile Phe Asn Asn Gln Glu Leu Phe Asp Leu Lys
100 105 110

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

Tyr Phe Arg Asp Lys Ala Phe Pro Asn Leu Ser Ala Arg Gln Leu Gly
130 135 140

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

Asn Val Phe Lys Thr Gln Ser Thr Asp Val Asn Arg Pro Tyr Gln Asp
165 170 175

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

Gln Thr Thr Leu Leu Thr Ala Arg His Asp Leu Lys Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Asn Asp Ile Ser Thr Ile Ile Lys Gln Glu Leu Thr Glu Gly Arg Ala
210 215 220

Leu Ala Leu Ser His Thr Tyr Ala Asn Val Ser Ile Ser His Val Ile
225 230 235 240

Asn Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asn Ala Glu Gly Asn Leu Glu Ala Ile
 245 250 255

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

Phe Val Gly Ile Asn Ala His Gly His Val Ala Ile Ser Ala Lys Lys
 275 280 285

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

Ser Ser Gly Lys Asp Ile Trp Gln Lys Leu Ser
 305 310 315

<210> 9
 <211> 295
 <212> белок
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 9

Ser Val Trp Thr Lys Gly Val Thr Pro Leu Thr Pro Glu Gln Phe Arg
 1 5 10 15

Tyr Asn Asn Glu Asp Val Ile His Ala Pro Tyr Leu Ala His Gln Gly
 20 25 30

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

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

Lys Thr Glu Ile Glu Ala Tyr Leu Ser Lys His Pro Glu Lys Gln Lys
 65 70 75 80

Ile Ile Phe Asn Asn Gln Glu Leu Phe Asp Leu Lys Ala Ala Ile Asp
 85 90 95

Thr Lys Asp Ser Gln Thr Asn Ser Gln Leu Phe Asn Tyr Phe Arg Asp
 100 105 110

Lys Ala Phe Pro Asn Leu Ser Ala Arg Gln Leu Gly Val Met Pro Asp
 115 120 125

Leu Val Leu Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Tyr Leu Asn Val Phe Lys
 130 135 140

Thr Gln Ser Thr Asp Val Asn Arg Pro Tyr Gln Asp Lys Asp Lys Arg

145 150 155 160
 Gly Gly Ile Phe Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asp Gln Thr Thr Leu
 165 170 175
 Leu Thr Ala Arg His Asp Leu Lys Asn Lys Gly Leu Asn Asp Ile Ser
 180 185 190
 Thr Ile Ile Lys Gln Glu Leu Thr Glu Gly Arg Ala Leu Ala Leu Ser
 195 200 205
 His Thr Tyr Ala Asn Val Ser Ile Ser His Val Ile Asn Leu Trp Gly
 210 215 220
 Ala Asp Phe Asn Ala Glu Gly Asn Leu Glu Ala Ile Tyr Val Thr Asp
 225 230 235 240
 Ser Asp Ala Asn Ala Ser Ile Gly Met Lys Lys Tyr Phe Val Gly Ile
 245 250 255
 Asn Ala His Gly His Val Ala Ile Ser Ala Lys Lys Ile Glu Gly Glu
 260 265 270
 Asn Ile Gly Ala Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Ser Gly Lys
 275 280 285
 Asp Ile Trp Gln Lys Leu Ser
 290 295

 <210> 10
 <211> 314
 <212> белок
 <213> Streptococcus pyogenes

 <400> 10

 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 Leu Thr Pro
 20 25 30

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

 His Gln Gly Trp Tyr Asp Ile Thr Lys Ala Phe Asp Gly Lys Asp Asn
 50 55 60

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

Asp Gln Asn Lys Thr Glu Ile Glu Ala Tyr Leu Ser Lys His Pro Glu
85 90 95

Lys Gln Lys Ile Ile Phe Asn Asn Gln Glu Leu Phe Asp Leu Lys Ala
100 105 110

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

Phe Arg Asp Lys Ala Phe Pro Asn Leu Ser Ala Arg Gln Leu Gly Val
130 135 140

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

Val Phe Lys Thr Gln Ser Thr Asp Val Asn Arg Pro Tyr Gln Asp Lys
165 170 175

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

Thr Thr Leu Leu Thr Ala Arg His Asp Leu Lys Asn Lys Gly Leu Asn
195 200 205

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

Ala Leu Ser His Thr Tyr Ala Asn Val Ser Ile Ser His Val Ile Asn
225 230 235 240

Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asn Ala Glu Gly Asn Leu Glu Ala Ile Tyr
245 250 255

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

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

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

Ser Gly Lys Asp Ile Trp Gln Lys Leu Ser
305 310

<210> 11
<211> 312

<212> белок
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 11

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 Glu Gln
20 25 30

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

Gly Trp Tyr Asp Ile Thr Lys Ala Phe Asp Gly Lys Asp Asn 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 Thr Glu Ile Glu Ala Tyr Leu Ser Lys His Pro Glu Lys Gln
85 90 95

Lys Ile Ile Phe Asn Asn Gln Glu Leu Phe Asp Leu Lys Ala Ala Ile
100 105 110

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

Asp Lys Ala Phe Pro Asn Leu Ser Ala Arg Gln Leu Gly Val Met Pro
130 135 140

Asp Leu Val Leu Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Tyr Leu Asn Val Phe
145 150 155 160

Lys Thr Gln Ser Thr Asp Val Asn Arg Pro Tyr Gln Asp Lys Asp Lys
165 170 175

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

Leu Leu Thr Ala Arg His Asp Leu Lys Asn Lys Gly Leu Asn Asp Ile
195 200 205

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

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

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

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

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

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

Lys Asp Ile Trp Gln Lys Leu Ser
305 310

<210> 12

<211> 313

<212> белок

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 12

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 Glu Gln
20 25 30

Phe Arg Tyr Asn Asn Glu Asp Val Ile His Ala Pro Tyr Leu Ala His
35 40 45

Gln Gly Trp Tyr Asp Ile Thr Lys Ala Phe Asp Gly Lys Asp Asn 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 Thr Glu Ile Glu Ala Tyr Leu Ser Lys His Pro Glu Lys
85 90 95

Gln Lys Ile Ile Phe Asn Asn Gln Glu Leu Phe Asp Leu Lys Ala Ala
100 105 110

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

Arg Asp Lys Ala Phe Pro Asn Leu Ser Ala Arg Gln Leu Gly Val Met
130 135 140

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

Phe Lys Thr Gln Ser Thr Asp Val Asn Arg Pro Tyr Gln Asp Lys Asp
165 170 175

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

Thr Leu Leu Thr Ala Arg His Asp Leu Lys Asn Lys Gly Leu Asn Asp
195 200 205

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

Leu Ser His Thr Tyr Ala Asn Val Ser Ile Ser His Val Ile Asn Leu
225 230 235 240

Trp Gly Ala Asp Phe Asn Ala Glu Gly Asn Leu Glu Ala Ile Tyr Val
245 250 255

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

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

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

Gly Lys Asp Ile Trp Gln Lys Leu Ser
305 310

<210> 13
<211> 312
<212> белок
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 13

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 Glu Gln
20 25 30

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

Gly Trp Tyr Asp Ile Thr Lys Ala Phe Asp Gly Lys Asp Asn 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 Thr Glu Ile Glu Ala Tyr Leu Ser Lys His Pro Glu Lys Gln
85 90 95

Lys Ile Ile Ile Asn Asn Gln Glu Leu Phe Asp Leu Lys Ala Ala Ile
100 105 110

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

Asp Lys Ala Phe Pro Asn Leu Ser Ala Arg Gln Leu Gly Val Met Pro
130 135 140

Asp Leu Val Leu Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Tyr Leu Asn Val Phe
145 150 155 160

Lys Thr Gln Ser Thr Asp Val Asn Arg Pro Tyr Gln Asp Lys Asp Lys
165 170 175

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

Leu Leu Thr Ala Arg His Asp Leu Lys Asn Lys Gly Leu Asn Asp Ile
195 200 205

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

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

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

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

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

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

Lys Asp Ile Trp Gln Lys Leu Ser

305

310

<210> 14

<211> 312

<212> белок

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 14

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 Glu Gln
20 25 30

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

Gly Trp Tyr Asp Ile Thr Lys Ala Phe Asp Gly Lys Asp Asn 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 Thr Glu Ile Glu Ala Tyr Leu Ser Lys His Pro Glu Lys Gln
85 90 95

Lys Ile Ile Phe Arg Asn Gln Glu Leu Phe Asp Leu Lys Ala Ala Ile
100 105 110

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

Asp Lys Ala Phe Pro Asn Leu Ser Ala Arg Gln Leu Gly Val Met Pro
130 135 140

Asp Leu Val Leu Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Tyr Leu Asn Val Phe
145 150 155 160

Lys Thr Gln Ser Thr Asp Val Asn Arg Pro Tyr Gln Asp Lys Asp Lys
165 170 175

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

Leu Leu Thr Ala Arg His Asp Leu Lys Asn Lys Gly Leu Asn Asp Ile
195 200 205

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

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

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

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

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

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

Lys Asp Ile Trp Gln Lys Leu Ser
305 310

<210> 15

<211> 312

<212> белок

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 15

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 Glu Gln
20 25 30

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

Gly Trp Tyr Asp Ile Thr Lys Ala Phe Asp Gly Lys Asp Asn 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 Thr Glu Ile Glu Ala Tyr Leu Ser Lys His Pro Glu Lys Gln
85 90 95

Lys Ile Ile Ile Arg Asn Gln Glu Leu Phe Asp Leu Lys Ala Ala Ile
100 105 110

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

Asp Lys Ala Phe Pro Asn Leu Ser Ala Arg Gln Leu Gly Val Met Pro
130 135 140

Asp Leu Val Leu Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Tyr Leu Asn Val Phe
145 150 155 160

Lys Thr Gln Ser Thr Asp Val Asn Arg Pro Tyr Gln Asp Lys Asp Lys
165 170 175

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

Leu Leu Thr Ala Arg His Asp Leu Lys Asn Lys Gly Leu Asn Asp Ile
195 200 205

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

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

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

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

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

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

Lys Asp Ile Trp Gln Lys Leu Ser
305 310

<210> 16

<211> 312

<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 Glu Gln
20 25 30

Phe	Thr	Gln	Gly	Glu	Asp	Val	Ile	His	Ala	Pro	Tyr	Leu	Ala	Asn	Gln	35	40	45
Gly	Trp	Tyr	Asp	Ile	Thr	Lys	Ala	Phe	Asp	Gly	Lys	Asp	Asn	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	Thr	Glu	Ile	Glu	Ala	Tyr	Leu	Ser	Lys	His	Pro	Glu	Lys	Gln	85	90	95
Lys	Ile	Ile	Phe	Arg	Asn	Gln	Glu	Leu	Phe	Asp	Leu	Lys	Glu	Ala	Ile	100	105	110
Arg	Thr	Lys	Asp	Ser	Gln	Thr	Asn	Ser	Gln	Leu	Phe	Glu	Tyr	Phe	Arg	115	120	125
Asp	Lys	Ala	Phe	Pro	Tyr	Leu	Ser	Ala	Arg	Gln	Leu	Gly	Val	Met	Pro	130	135	140
Asp	Leu	Val	Leu	Asp	Met	Phe	Ile	Asn	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Asn	Val	Phe	145	150	155
Lys	Thr	Gln	Ser	Thr	Asp	Val	Lys	Arg	Pro	Tyr	Gln	Asp	Lys	Asp	Lys	165	170	175
Arg	Gly	Gly	Ile	Phe	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Arg	Gly	Asn	Gln	Thr	Thr	180	185	190
Leu	Leu	Thr	Ala	Arg	His	Asp	Leu	Lys	Asn	Lys	Gly	Leu	Asn	Asp	Ile	195	200	205
Ser	Thr	Ile	Ile	Lys	Glu	Glu	Leu	Thr	Lys	Gly	Arg	Ala	Leu	Ala	Leu	210	215	220
Ser	His	Thr	Tyr	Ala	Asn	Val	Ser	Ile	Ser	His	Val	Ile	Asn	Leu	Trp	225	230	235
Gly	Ala	Asp	Phe	Asn	Ala	Glu	Gly	Asn	Leu	Glu	Ala	Ile	Tyr	Val	Thr	245	250	255
Asp	Ser	Asp	Ala	Asn	Ala	Ser	Ile	Gly	Met	Lys	Lys	Tyr	Phe	Val	Gly	260	265	270
Ile	Asn	Lys	His	Gly	His	Val	Ala	Ile	Ser	Ala	Lys	Lys	Ile	Glu	Gly	275	280	285

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

Lys Asp Ile Trp Gln Lys Leu Asn
305 310

<210> 17

<211> 292

<212> белок

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 17

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

Glu Asp Val Ile His Ala Pro Tyr Leu Ala His Gln Gly Trp Tyr Asp
20 25 30

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

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

Ile Glu Ala Tyr Leu Ser Lys His Pro Glu Lys Gln Lys Ile Ile Phe
65 70 75 80

Arg Asn Gln Glu Leu Phe Asp Leu Lys Ala Ala Ile Asp Thr Lys Asp
85 90 95

Ser Gln Thr Asn Ser Gln Leu Phe Asn Tyr Phe Arg Asp Lys Ala Phe
100 105 110

Pro Asn Leu Ser Ala Arg Gln Leu Gly Val Met Pro Asp Leu Val Leu
115 120 125

Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Tyr Leu Asn Val Phe Lys Thr Gln Ser
130 135 140

Thr Asp Val Asn Arg Pro Tyr Gln Asp Lys Asp Lys Arg Gly Gly Ile
145 150 155 160

Phe Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asn Gln Thr Thr Leu Leu Thr Ala
165 170 175

Arg His Asp Leu Lys Asn Lys Gly Leu Asn Asp Ile Ser Thr Ile Ile
180 185 190

Lys Gln Glu Leu Thr Glu Gly Arg Ala Leu Ala Leu Ser His Thr Tyr

195

200

205

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

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

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

Gly His Val Ala Ile Ser Ala Lys Lys Ile Glu Gly Glu Asn Ile Gly
 260 265 270

Ala Gln Val Leu Gly Leu Phe Thr Leu Ser Ser Gly Lys Asp Ile Trp
 275 280 285

Gln Lys Leu Ser
 290

<210> 18
 <211> 312
 <212> белок
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 18

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 Glu Gln
 20 25 30

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

Gly Trp Tyr Asp Ile Thr Lys Ala Phe Asp Gly Ala Asp Asn 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 Thr Glu Ile Glu Ala Tyr Leu Ser Lys His Pro Glu Lys Gln
 85 90 95

Lys Ile Ile Phe Arg Asn Gln Glu Leu Phe Asp Leu Lys Ala Ala Ile
 100 105 110

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

Asp Lys Ala Phe Pro Asn Leu Ser Ala Arg Gln Leu Gly Val Met Pro
130 135 140

Asp Leu Val Leu Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Tyr Leu Asn Val Phe
145 150 155 160

Lys Thr Gln Ser Thr Asp Val Asn Arg Pro Tyr Gln Asp Lys Asp Lys
165 170 175

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

Leu Leu Thr Ala Arg His Asp Leu Lys Asn Lys Gly Leu Asn Asp Ile
195 200 205

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

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

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

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

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

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

Lys Asp Ile Trp Gln Lys Leu Ser
305 310

<210> 19
<211> 292
<212> белок
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 19

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

Glu Asp Val Ile His Ala Pro Tyr Leu Ala His Gln Gly Trp Tyr Asp
20 25 30

Ile	Thr	Lys	Ala	Phe	Asp	Gly	Ala	Asp	Asn	Leu	Leu	Cys	Gly	Ala	Ala		
		35					40					45					
Thr	Ala	Gly	Asn	Met	Leu	His	Trp	Trp	Phe	Asp	Gln	Asn	Lys	Thr	Glu		
	50					55					60						
Ile	Glu	Ala	Tyr	Leu	Ser	Lys	His	Pro	Glu	Lys	Gln	Lys	Ile	Ile	Phe		
65					70					75					80		
Arg	Asn	Gln	Glu	Leu	Phe	Asp	Leu	Lys	Ala	Ala	Ile	Asp	Thr	Lys	Asp		
				85					90					95			
Ser	Gln	Thr	Asn	Ser	Gln	Leu	Phe	Asn	Tyr	Phe	Arg	Asp	Lys	Ala	Phe		
			100					105					110				
Pro	Asn	Leu	Ser	Ala	Arg	Gln	Leu	Gly	Val	Met	Pro	Asp	Leu	Val	Leu		
		115					120					125					
Asp	Met	Phe	Ile	Asn	Gly	Tyr	Tyr	Leu	Asn	Val	Phe	Lys	Thr	Gln	Ser		
	130					135					140						
Thr	Asp	Val	Asn	Arg	Pro	Tyr	Gln	Asp	Lys	Asp	Lys	Arg	Gly	Gly	Ile		
145					150					155					160		
Phe	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Arg	Gly	Asn	Gln	Thr	Thr	Leu	Leu	Thr	Ala		
				165					170						175		
Arg	His	Asp	Leu	Lys	Asn	Lys	Gly	Leu	Asn	Asp	Ile	Ser	Thr	Ile	Ile		
			180					185					190				
Lys	Gln	Glu	Leu	Thr	Glu	Gly	Arg	Ala	Leu	Ala	Leu	Ser	His	Thr	Tyr		
		195					200					205					
Ala	Asn	Val	Ser	Ile	Ser	His	Val	Ile	Asn	Leu	Trp	Gly	Ala	Asp	Phe		
	210					215					220						
Asn	Ala	Glu	Gly	Asn	Leu	Glu	Ala	Ile	Tyr	Val	Thr	Asp	Ser	Asp	Ala		
225					230					235					240		
Asn	Ala	Ser	Ile	Gly	Met	Lys	Lys	Tyr	Phe	Val	Gly	Ile	Asn	Ala	His		
				245					250					255			
Gly	His	Val	Ala	Ile	Ser	Ala	Lys	Lys	Ile	Glu	Gly	Glu	Asn	Ile	Gly		
			260					265					270				
Ala	Gln	Val	Leu	Gly	Leu	Phe	Thr	Leu	Ser	Ser	Gly	Lys	Asp	Ile	Trp		
		275					280					285					

Gln Lys Leu Ser
290

<210> 20
<211> 312
<212> белок
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 20

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 Glu Gln
20 25 30

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

Gly Trp Tyr Asp Ile Thr Lys Ala Phe Asp Gly Lys Asp Asn 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 Thr Glu Ile Glu Ala Tyr Leu Ser Lys His Pro Glu Lys Gln
85 90 95

Lys Ile Ile Phe Arg Asn Gln Glu Leu Phe Asp Leu Lys Ala Ala Ile
100 105 110

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

Asp Lys Ala Phe Pro Asn Leu Ser Ala Arg Gln Leu Gly Val Met Pro
130 135 140

Asp Leu Val Leu Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Tyr Leu Asn Val Phe
145 150 155 160

Lys Thr Gln Ser Thr Asp Val Asn Arg Pro Tyr Gln Asp Lys Asp Lys
165 170 175

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

Leu Leu Thr Ala Arg His Asp Leu Lys Asn Lys Gly Leu Asn Asp Ile
195 200 205

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

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

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

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

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

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

Lys Asp Ile Trp Gln Lys Leu Ser
305 310

<210> 21
<211> 312
<212> белок
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 21

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 Leu Thr Pro
20 25 30

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

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

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

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

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

Ala Ile Asp Thr Lys Asn His Gln Leu Asp Ser Lys Leu Phe Asn Tyr

115

120

125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Asp Ser Trp Gln Lys Leu Ser
 305 310

<210> 22

<211> 312

<212> белок

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 22

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 Leu Thr Pro
 20 25 30

Glu 35	Gln	Phe	Thr	Gln	Gly	Glu 40	Asp	Val	Phe	His	Ala 45	Pro	Tyr	Val	Ala
Asn 50	Gln	Gly	Trp	Tyr	Asp	Ile 55	Thr	Lys	Ala	Phe	Asp 60	Gly	Lys	Asp	Asn
Leu 65	Leu	Cys	Gly	Ala	Ala 70	Thr	Ala	Gly	Asn	Met 75	Leu	His	Trp	Trp	Phe 80
Asp	Gln	Asn	Lys	Asp 85	Gln	Ile	Lys	Arg	Tyr 90	Leu	Glu	Glu	His	Pro 95	Glu
Lys	Gln	Lys	Ile 100	Asn	Phe	Arg	Gly	Glu 105	Asn	Met	Phe	Asp	Val 110	Lys	Glu
Ala	Ile	Arg 115	Thr	Lys	Asn	His	Gln 120	Leu	Asp	Ser	Lys	Leu 125	Phe	Glu	Tyr
Phe	Lys 130	Glu	Lys	Ala	Phe	Pro 135	Tyr	Leu	Ser	Ala	Lys 140	His	Leu	Gly	Val
Phe 145	Pro	Asp	His	Val	Ile 150	Asp	Met	Phe	Ile	Asn 155	Gly	Tyr	Arg	Leu	Ser 160
Leu	Thr	Asn	His	Gly 165	Pro	Thr	Pro	Val	Lys 170	Lys	Gly	Ser	Lys	Asp 175	Pro
Arg	Gly	Gly	Ile 180	Phe	Asp	Ala	Val	Phe 185	Thr	Arg	Gly	Asn	Gln 190	Ser	Lys
Leu	Leu	Thr 195	Ser	Arg	His	Asp	Phe 200	Lys	Asn	Lys	Asn	Leu 205	Asn	Asp	Ile
Ser	Thr 210	Ile	Ile	Lys	Ser	Glu 215	Leu	Thr	Asn	Gly	Lys 220	Ala	Leu	Gly	Leu
Ser 225	His	Thr	Tyr	Ala	Asn 230	Val	Arg	Ile	Asn	His	Val 235	Ile	Asn	Leu	Trp 240
Gly	Ala	Asp	Phe	Asn 245	Ala	Glu	Gly	Asn	Leu 250	Glu	Ala	Ile	Tyr	Val 255	Thr
Asp	Ser	Asp	Ser	Asn 260	Ala	Ser	Ile	Gly 265	Met	Lys	Lys	Tyr	Phe	Val	Gly
Val	Asn	Lys 275	His	Gly	His	Val	Ala 280	Ile	Ser	Ala	Lys	Lys 285	Ile	Glu	Gly

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

Gln Asp Ser Trp Gln Lys Leu Asn
305 310

<210> 23

<211> 312

<212> белок

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 23

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 Leu Thr Pro
20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Asp Leu Ile Lys Gln Glu Leu Thr Glu Gly Lys Ala Leu Gly Leu
210 215 220

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

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

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

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

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

Gln Asp Ser Trp Asn Gln Thr Ser
305 310

<210> 24
<211> 312
<212> белок
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 24

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 Leu Thr Pro
20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Asp Ser Trp Asn Gln Thr Asn
305 310

<210> 25

<211> 310

<212> белок

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 25

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	Glu	Gln				
			20					25					30						
Phe	Thr	Gln	Gly	Glu	Asp	Val	Ile	His	Ala	Pro	Tyr	Val	Ala	Asn	Gln				
		35					40					45							
Gly	Trp	Tyr	Asp	Ile	Thr	Lys	Ala	Phe	Asp	Gly	Lys	Asp	Asn	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	Lys	Ala	Ile				
			100					105					110						
Asp	Thr	Lys	Asn	His	Gln	Leu	Asp	Ser	Lys	Leu	Phe	Asn	Tyr	Phe	Lys				
		115					120					125							
Glu	Lys	Ala	Phe	Pro	Gly	Leu	Ser	Ala	Arg	Arg	Ile	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	Asn	Lys	Asn	Leu	Asn	Asp	Ile	Ser	Thr				
		195					200					205							
Ile	Ile	Lys	Gln	Glu	Leu	Thr	Lys	Gly	Lys	Ala	Leu	Gly	Leu	Ser	His				
	210					215					220								
Thr	Tyr	Ala	Asn	Val	Ser	Ile	Asn	His	Val	Ile	Asn	Leu	Trp	Gly	Ala				
225					230					235					240				
Asp	Phe	Asn	Ala	Glu	Gly	Asn	Leu	Glu	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

Ala His Gly His Val Ala Ile Ser Ala Lys Lys Ile Glu Gly Glu 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 Gln Lys Leu Ser
 305 310

<210> 26

<211> 320

<212> белок

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 26

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> 27

<211> 325

<212> белок

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 27

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

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

Pro Glu Gln Phe Arg Tyr Asn Asn Glu Asp Val Ile His Ala Pro Tyr
35 40 45

Leu Ala His Gln Gly Trp Tyr Asp Ile Thr Lys Ala Phe Asp Gly Lys
50 55 60

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

Trp Phe Asp Gln Asn Lys Thr Glu Ile Glu Ala Tyr Leu Ser Lys His
85 90 95

Pro Glu Lys Gln Lys Ile Ile Phe Asn Asn Gln Glu Leu Phe Asp Leu
100 105 110

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

Asn Tyr Phe Arg Asp Lys Ala Phe Pro Asn Leu Ser Ala Arg Gln Leu
130 135 140

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

Leu Asn Val Phe Lys Thr Gln Ser Thr Asp Val Asn Arg Pro Tyr Gln
165 170 175

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

Asp Gln Thr Thr Leu Leu Thr Ala Arg His Asp Leu Lys Asn Lys Gly
195 200 205

Leu Asn Asp Ile Ser Thr Ile Ile Lys Gln Glu Leu Thr Glu Gly Arg
210 215 220

Ala Leu Ala Leu Ser His Thr Tyr Ala Asn Val Ser Ile Ser His Val
225 230 235 240

Ile Asn Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asn Ala Glu Gly Asn Leu Glu Ala
245 250 255

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

Tyr Phe Val Gly Ile Asn Ala His Gly His Val Ala Ile Ser Ala Lys
275 280 285

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

Leu Ser Ser Gly Lys Asp Ile Trp Gln Lys Leu Ser Gly Gly Gly His
305 310 315 320

His His His His His
325

<210> 28
<211> 323
<212> белок
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 28

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

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

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

Val Ala Asn Gln Gly Trp Tyr Asp Ile Thr Lys Ala Phe Asp Gly Lys
50 55 60

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

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

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

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

Asn Tyr Phe Lys Glu Lys Ala Phe Pro Gly Leu Ser Ala Arg Arg Ile
130 135 140

Gly Val Phe Pro Asp His Val Ile Asp Met Phe Ile Asn Gly Tyr Arg
145 150 155 160

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

Asp Pro Arg Gly Gly Ile Phe Asp Ala Val Phe Thr Arg Gly Asn Gln
180 185 190

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

Asp Ile Ser Thr Ile Ile Lys Gln Glu Leu Thr Lys Gly Lys Ala Leu
210 215 220

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

Leu Trp Gly Ala Asp Phe Asn Ala Glu Gly Asn Leu Glu Ala Ile Tyr
245 250 255

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

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

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

Thr Gly Gln Asp Ser Trp Gln Lys Leu Ser Gly Gly Gly His His His
305 310 315 320

His His His

<210> 29
<211> 11
<212> белок
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 29

Pro Leu Thr Pro Glu Gln Phe Arg Tyr Asn Asn
1 5 10

<210> 30
<211> 8
<212> белок
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 30

Pro Pro Ala Asn Phe Thr Gln Gly
1 5

<210> 31
<211> 20
<212> белок
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 31

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

<210> 32
 <211> 20
 <212> белок
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 32

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> 33
 <211> 963
 <212> ДНК
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 33
 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 tgcttcaact gtggttcgat 240
 caaaacaaag accaaattaa acgttatttg gaagagcatc cagaaaagca aaaaataaac 300
 ttcaatggcg 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 tgggtatttt 540
 gacgccgtat ttacaagagg tgatcaaagt aagctattga caagtcgtca tgattttaaa 600
 gaaaaaaatc tcaaagaaat cagtgatctc attaagaaag agttaaccga 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 aagatagttg gaatcagacc aatggcgggt gccatcatca ccatcaccac 960
 taa 963

<210> 34
 <211> 978
 <212> ДНК
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 34
 atggacgatt accaaaggaa tgctacggaa gcttatgcc aagaagtacc acatcagatc 60

acttctgtat ggaccaaagg tgttacacca ctaacacccg agcagtttcg atataataac	120
gaagatgtga tccatgcgcc atatcttgct catcaaggct ggtacgatat caccaaggcc	180
ttcgatggga aggataatct cttgtgtggc gcagcaacgg caggtaatat gctgcattgg	240
tggtttgatc aaaataaaac agagattgaa gcctatttaa gtaaaccacc tgaaaagcaa	300
aaaatcattt ttaacaacca agagctattt gatttgaaag ctgctatcga taccaaggac	360
agtcaaacca atagtcagct ttttaattat tttagagata aagcctttcc aaatctatca	420
gcacgtcaac tcgggggttat gcctgatctt gttctagata tgtttatcaa tggttactac	480
ttaaatgtgt ttaaaacaca gtctactgat gtcaatcgac cttatcagga caaggacaaa	540
cgagggtgga ttttcgatgc tgttttcacc agaggagatc agacaacgct cttgacagct	600
cgtcatgatt taaaaataa aggactaaat gacatcagca ccattatcaa gcaagaactg	660
actgaaggaa gagcccttgc tttatcacat acctacgcca atgttagcat tagccatgtg	720
attaacttgt ggggagctga ttttaatgct gaaggaaacc ttgaggccat ctatgtcaca	780
gactcagatg ctaatgcgtc tattgggatg aaaaaatatt ttgtcggcat taatgctcat	840
ggacatgtcg ccatttctgc caagaaaata gaaggagaaa acattggcgc tcaagtatta	900
ggcttattta cgctttccag tggcaaggac atttggcaga aactgagcgg cgggtggccat	960
catcaccatc accactaa	978

<210> 35
 <211> 972
 <212> ДНК
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 35	
atggatgatt atcagcgcaa cgcgaccgaa gcgtatgcga aagaagtgcc gcatcagatt	60
accagcgtgt ggaccaaagg cgtgaccccg ctgaccccg aacagtttcg ctataacaac	120
gaagatgtgt ttcatgcgcc gtatgtggcg aaccagggtt ggtatgatat taccaaagcg	180
tttgatggca aagataacct gctgtgcggc gcggcgaccg cgggcaacat gctgcattgg	240
tggtttgatc agaacaaga tcagattaaa cgctatcttg aagaacatcc ggaaaaacag	300
aaaattaact ttaacggcga taacatgttt gatgtgaaaa aagcgattga taccaaaaac	360
catcagctgg atagcaaact gtttaactat tttaaagaaa aagcgtttcc gggcctgagc	420
gcgcgccgca ttggcgtgtt tccggatcat gtgattgata tgtttattaa cggctatcgc	480
ctgagcctga ccaaccatgg cccgaccccg gtgaaagaag gcagcaaaga tccgcgcggc	540
ggcatttttg atgcggtgtt taccgcggc aaccagagca aactgctgac cagccgccat	600
gatttttaaaa acaaaaacct gaacgatatt agcaccatta ttaaacagga actgacaaaa	660
ggcaaagcgc tgggcctgag ccatacctat gcgaacgtga gcattaacca tgtgattaac	720

ctgtggggcg cggatttttaa cgcggaaggc aacctggaag cgatttatgt gaccgatagc	780
gatagcaacg cgagcattgg catgaaaaaa tattttgtgg gcgtgaacgc gcatggccat	840
gtggcgatta gcgcgaaaaa aattgaaggc gaaaacattg gcgcgcaggt gctgggcctg	900
tttaccctga gcaccggcca ggatagctgg cagaaactga gcggcggtgg ccatcatcac	960
catcaccact aa	972

<210> 36
 <211> 978
 <212> ДНК
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 36	
atggatgatt atcagcgcaa cgcgaccgaa gcgtatgcga aagaagtgcc gcatcagatt	60
accagcgtgt ggaccaaagg cgtgaccccg ctgaccccg aacagtttcg ctataacaac	120
gaagatgtga ttcatgcgcc gtatctggcg aaccagggct ggtatgatat taccaaagcg	180
tttgatggca aagataacct gctgtgcggc gcggcgaccg cgggcaacat gctgcattgg	240
tggtttgatc agaacaaaac cgaaattgaa gcgtatctga gcaaaccatcc ggaaaaacag	300
aaaattatatt ttgcgaacca ggaactgttt gatctgaaag aagcgattcg caccaaagat	360
agccagacca acagccagct gtttgaatat tttcgcgata aagcgtttcc gtatctgagc	420
gcgcgccagc tgggcgtgat gccggatctg gtgctggata tgtttattaa cggctattat	480
ctgaacgtgt ttaaaaccca gagcaccgat gtgaaacgcc cgtatcagga taaagataaa	540
cgcgggcgga tttttgatgc ggtgtttacc cgcggaacc agaccaccct gctgaccgcg	600
cgccatgatc tgaaaaacaa aggcctgaac gatattagca ccattattaa agaagaactg	660
accaaaggcc gcgcgctggc gctgagccat acctatgcga acgtgagcat tagccatgtg	720
attaacctgt ggggcgcgga ttttaacgcg gaaggcaacc tggaagcgat ttatgtgacc	780
gatagcgatg cgaacgcgag cattggcatg aaaaaatatt ttgtgggcat taacaaacat	840
ggccatgtgg cgattagcgc gaaaaaaatt gaaggcgaaa acattggcgc gcaggtgctg	900
ggcctgttta ccctgagcag cggcaaagat atttggcaga aactgaacgg cggtggccat	960
catcaccatc accactaa	978

<210> 37
 <211> 978
 <212> ДНК
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 37	
atggatgatt atcagcgcaa cgcgaccgaa gcgtatgcga aagaagtgcc gcatcagatt	60
accagcgtgt ggaccaaagg cgtgaccccg ctgaccccg aacagtttcg ctataacaac	120
gaagatgtga ttcatgcgcc gtatctggcg catcagggct ggtatgatat taccaaaacc	180

tttaacggca aagataacct gctgtgcggc gcggcgaccg cgggcaacat gctgcattgg	240
tggtttgatc agaacaaaac cgaaattgaa gcgtatctga gcaaacaacc ggaaaaacag	300
aaaattatatt ttaacaacga agaactgttt gatctgaaag cggcgattga taccaaagat	360
agccagacca acagccagct gtttaactat tttaaagaaa aagcgtttcc gaacctgagc	420
acccgccagc tgggctgat gccggatctg gtgctggata tgtttattaa cggctattat	480
ctgaacgtgt ttaaaaccca gagcaccgat gtgaaccgcc cgtatcagga taaagataaa	540
cgcgggcgca tttttgatgc ggtgtttacc cgcgggcaacc agaccaccct gctgaccgcg	600
cgccatgatt ttaaagaaaa aggcctgaaa gatattagca ccattattaa acaggaactg	660
accgaaggcc gcgcgctggc gctgagccat acctatgcga acgtgagcat tagccatgtg	720
attaacctgt ggggcgcgga ttttgatgcg gaaggcaacc tgaaagcgat ttatgtgacc	780
gatagcgatg cgaacgcgag cattggcatg aaaaaatatt ttgtgggcat taacgcgcat	840
ggcaaagtgg cgattagcgc gaaaaaatt gaaggcgaaa acattggcgc gcaggtgctg	900
ggcctgttta ccctgagcag cggcaaagat atttggcagc agctgagcgg cgggtggccat	960
catcaccatc accactaa	978

<210> 38

<211> 978

<212> ДНК

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 38

atggatagct ttagcgcgaa ccaggaaatt cgctatagcg aagtgacccc gtatcatgtg	60
accagcgtgt ggaccaaagg cgtgaccccg ctgaccccg aacagtttcg ctataacaac	120
gaagatgtga ttcatgcgcc gtatctggcg catcagggct ggtatgatat taccaaagcg	180
tttgatggca aagataacct gctgtgcggc gcggcgaccg cgggcaacat gctgcattgg	240
tggtttgatc agaacaaaac cgaaattgaa gcgtatctga gcaaacaacc ggaaaaacag	300
aaaattatatt ttaacaacca ggaactgttt gatctgaaag cggcgattga taccaaagat	360
agccagacca acagccagct gtttaactat tttcgcgata aagcgtttcc gaacctgagc	420
gcgcgccagc tgggctgat gccggatctg gtgctggata tgtttattaa cggctattat	480
ctgaacgtgt ttaaaaccca gagcaccgat gtgaaccgcc cgtatcagga taaagataaa	540
cgcgggcgca tttttgatgc ggtgtttacc cgcgggcgatc agaccaccct gctgaccgcg	600
cgccatgatc tgaaaaacaa aggcctgaac gatattagca ccattattaa acaggaactg	660
accgaaggcc gcgcgctggc gctgagccat acctatgcga acgtgagcat tagccatgtg	720
attaacctgt ggggcgcgga ttttaacgcg gaaggcaacc tggaagcgat ttatgtgacc	780
gatagcgatg cgaacgcgag cattggcatg aaaaaatatt ttgtgggcat taacgcgcat	840
ggccatgtgg cgattagcgc gaaaaaatt gaaggcgaaa acattggcgc gcaggtgctg	900

ggcctgttta ccctgagcag cggcaaagat atttggcaga aactgagcgg cgggtggccat	960
catcaccatc accactaa	978

<210> 39
 <211> 918
 <212> ДНК
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 39	
atgagcgtgt ggaccaaagg cgtgaccccg ctgaccccg aacagtttcg ctataacaac	60
gaagatgtga ttcatgcgcc gtatctggcg catcagggct ggtatgatat taccaaagcg	120
tttgatggca aagataacct gctgtgcggc gcggcgaccg cgggcaacat gctgcattgg	180
tggtttgatc agaacaaaac cgaaattgaa gcgtatctga gcaaaccatcc ggaaaaacag	240
aaaattatatt ttaacaacca ggaactgttt gatctgaaag cggcgattga taccaaagat	300
agccagacca acagccagct gtttaactat tttcgcgata aagcgtttcc gaacctgagc	360
gcgcgccagc tgggcgtgat gccggatctg gtgctggata tgtttattaa cggctattat	420
ctgaacgtgt ttaaaaccca gagcacccgat gtgaaccgcc cgtatcagga taaagataaa	480
cgcgggcgga tttttgatgc ggtgtttacc cgcgggcgatc agaccaccct gctgaccgcg	540
cgccatgatc tgaaaaacaa aggcctgaac gatattagca ccattattaa acaggaactg	600
accgaaggcc gcgcgctggc gctgagccat acctatgcga acgtgagcat tagccatgtg	660
attaacctgt ggggcgcgga ttttaacgcg gaaggcaacc tggaagcgat ttatgtgacc	720
gatagcgatg cgaacgcgag cattggcatg aaaaaatatt ttgtgggcat taacgcgcat	780
ggccatgtgg cgattagcgc gaaaaaaatt gaaggcgaaa acattggcgc gcaggtgctg	840
ggcctgttta ccctgagcag cggcaaagat atttggcaga aactgagcgg cgggtggccat	900
catcaccatc accactaa	918

<210> 40
 <211> 975
 <212> ДНК
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 40	
atggacgatt accaaaggaa tgctacggaa gcttatgcc aagaagtacc acatcagatc	60
acttctgtat ggaccaaagg tgttacacca ctaacacccg agcagtttac tcaaggtgaa	120
gatgtgatcc atgcgccata tcttgctcat caaggctggt acgatatcac caaggccttc	180
gatgggaagg ataatctctt gtgtggcgca gcaacggcag gtaatatgct gcattggtgg	240
tttgatcaaa ataaaacaga gattgaagcc tatttaagta aacaccctga aaagcaaaaa	300
atcatttttta acaaccaaga gctattttgat ttgaaagctg ctatcgatac caaggacagt	360
caaaccaata gtcagctttt taattatttt agagataaag cttttccaaa tctatcagca	420

cgtcaactcg gggttatgcc tgatcttggt ctagatatgt ttatcaatgg ttactactta	480
aatgtgttta aaacacagtc tactgatgtc aatcgacctt atcaggacaa ggacaaacga	540
ggtggtatth tcgatgctgt tttcaccaga ggagatcaga caacgctctt gacagctcgt	600
catgatttaa aaaataaagg actaaatgac atcagcacca ttatcaagca agaactgact	660
gaaggaagag cccttgcttt atcacatacc tacgccaatg ttagcattag ccatgtgatt	720
aacttggtgg gagctgattt taatgctgaa ggaaaccttg aggccatcta tgtcacagac	780
tcagatgcta atgctgttat tgggtatgaa aaatatthttg tcggcattaa tgctcatgga	840
catgtcgcca tttctgcca gaaaatagaa ggagaaaaca ttggcgctca agtattaggg	900
ttattttacgc tttccagtgg caaggacatt tggcagaaac tgagcggcgg tggccatcat	960
caccatcacc actaa	975

<210> 41
 <211> 969
 <212> ДНК
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 41	
atggacgatt accaaaggaa tgctacggaa gcttatgcc aagaagtacc acatcagatc	60
acttctgtat ggaccaaagg tgttacacca cccgagcagt ttactcaagg tgaagatgtg	120
atccatgctc catatcttgc tcatcaaggc tggtagata tcaccaaggc cttcgatggg	180
aaggataatc tcttggtgtg cgcagcaacg gcaggtaata tgctgcattg gtggthttgat	240
caaaataaaa cagagattga agcctattta agtaaacacc ctgaaaagca aaaaatcatt	300
tttaacaacc aagagctatt tgatttgaaa gctgctatcg ataccaagga cagtcaaacc	360
aatagtcagc thtttaatta thtttagagat aaagcctthc caaatctatc agcacgtcaa	420
ctcggggtht tgcttgatct tgttctagat atgtthtatca atggthtacta cthaaatgtg	480
thtaaaacac agtctactga tgtcaatcga ccttatcagg acaaggacaa acgaggtggg	540
atthtcgatg ctgtthttcac cagaggagat cagacaacgc tcttgacagc tcgtcatgat	600
thaaaaaata aaggactaaa tgacatcagc accattatca agcaagaact gactgaagga	660
agagcccttg cthttatcaca tacctacgcc aatgttagca ttagccatgt gattaacttg	720
tggggagctg atthtaatgc tgaaggaaac cttgaggcca tctatgtcac agactcagat	780
gctaatgctc ctattggtat gaaaaaatat thtgctggca thaatgctca tggacatgtc	840
gccattthctg ccaagaaaat agaaggagaa aacattggcg ctcaagtatt aggcctthtt	900
acgctthcca gtggcaagga catttggcag aaactgagcg gcggtggcca tcatcaccat	960
caccactaa	969

<210> 42

<211> 972
<212> ДНК
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 42
atggacgatt accaaaggaa tgctacggaa gcttatgcc aagaagtacc acatcagatc 60
acttctgtat ggaccaaagg tgttacacca cccgagcagt ttcgatataa taacgaagat 120
gtgatccatg cgccatatct tgctcatcaa ggctggtacg atatcaccaa ggccttcgat 180
gggaaggata atctcttgtg tggcgcagca acggcaggta atatgctgca ttggtggttt 240
gatcaaaata aaacagagat tgaagcctat ttaagtaaac accctgaaaa gcaaaaaatc 300
atttttaaca accaagagct atttgatttg aaagctgcta tcgataccaa ggacagtcaa 360
accaatagtc agcttttttaa ttattttaga gataaagcct ttccaaatct atcagcacgt 420
caactcgggg ttatgcctga tcttgttcta gatatgttta tcaatggtta ctacttaaat 480
gtgttttaaaa cacagtctac tgatgtcaat cgaccttatt aggacaagga caaacgaggt 540
ggtatttttcg atgctgtttt caccagagga gatcagacaa cgctcttgac agctcgtcat 600
gatttaaaaa ataaaggact aaatgacatc agcaccatta tcaagcaaga actgactgaa 660
ggaagagccc ttgcttttatt acatacctac gccaatgtta gcattagcca tgtgattaac 720
ttgtgggggag ctgattttta tgctgaagga aaccttgagg ccatctatgt cacagactca 780
gatgctaatt cgtctatttg tatgaaaaaa tattttgtcg gcattaatgc tcatggacat 840
gtcgccattt ctgccaagaa aatagaagga gaaaacattg gcgctcaagt attaggctta 900
tttacgcttt ccagtggcaa ggacatttgg cagaaactga gcggcggtgg ccatcatcac 960
catcaccact aa 972

<210> 43
<211> 969
<212> ДНК
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 43
atggacgatt accaaaggaa tgctacggaa gcttatgcc aagaagtacc acatcagatc 60
acttctgtat ggaccaaagg tgttacacca cccgagcagt ttactcaagg tgaagatgtg 120
atccatgcgc catatcttgc tcatcaaggc tggtagata tcaccaaggc cttcgatggg 180
aaggataatc tcttgtgtgg cgcagcaacg gcaggtaata tgctgcattg gtggtttgat 240
caaaataaaa cagagattga agcctattta agtaaaccac ctgaaaagca aaaaatcatt 300
attaacaacc aagagctatt tgatttgaaa gctgctatcg ataccaagga cagtcaaacc 360
aatagtcagc tttttaatta ttttagagat aaagcctttc caaatctatc agcacgtcaa 420
ctcgggggtta tgcctgatct tgttctagat atgtttatca atgggttacta cttaaagtgtg 480
tttaaaacac agtctactga tgtcaatcga ctttatcagg acaaggacaa acgaggtggg 540

attttcgatg ctgttttcac cagaggagat cagacaacgc tcttgacagc tcgtcatgat	600
ttaaaaaata aaggactaaa tgacatcagc accattatca agcaagaact gactgaagga	660
agagcccttg ctttatcaca tacctacgcc aatgttagca ttagccatgt gattaacttg	720
tggggagctg attttaatgc tgaaggaaac cttgaggcca tctatgtcac agactcagat	780
gctaatagcgt ctattggtat gaaaaaatat tttgtcggca ttaatgctca tggacatgtc	840
gccatttctg ccaagaaaat agaaggagaa aacattggcg ctcaagtatt aggcttattt	900
acgctttcca gtggcaagga catttggcag aaactgagcg gcggtggcca tcatcaccat	960
caccactaa	969

<210> 44
 <211> 969
 <212> ДНК
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 44	
atggacgatt accaaaggaa tgctacggaa gcttatgcc aagaagtacc acatcagatc	60
acttctgtat ggaccaaagg tgttacacca cccgagcagt ttactcaagg tgaagatgtg	120
atccatgcgc catatcttgc tcatcaaggc tggtagcata tcaccaaggc cttcgatggg	180
aaggataatc tcttgtgtgg cgcagcaacg gcaggtaata tgctgcattg gtgggtttgat	240
caaaataaaa cagagattga agcctattta agtaaaccac ctgaaaagca aaaaatcatt	300
tttcgtaacc aagagctatt tgatttgaaa gctgctatcg ataccaagga cagtcaaacc	360
aatagtcagc tttttaatta ttttagagat aaagcctttc caaatctatc agcacgtcaa	420
ctcgggggta tgcctgatct tgttctagat atgtttatca atgggttacta cttaaatgtg	480
tttaaaacac agtctactga tgtcaatcga ctttatcagg acaaggacaa acgaggtggt	540
attttcgatg ctgttttcac cagaggagat cagacaacgc tcttgacagc tcgtcatgat	600
ttaaaaaata aaggactaaa tgacatcagc accattatca agcaagaact gactgaagga	660
agagcccttg ctttatcaca tacctacgcc aatgttagca ttagccatgt gattaacttg	720
tggggagctg attttaatgc tgaaggaaac cttgaggcca tctatgtcac agactcagat	780
gctaatagcgt ctattggtat gaaaaaatat tttgtcggca ttaatgctca tggacatgtc	840
gccatttctg ccaagaaaat agaaggagaa aacattggcg ctcaagtatt aggcttattt	900
acgctttcca gtggcaagga catttggcag aaactgagcg gcggtggcca tcatcaccat	960
caccactaa	969

<210> 45
 <211> 969
 <212> ДНК
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 45

atggacgatt accaaaggaa tgctacggaa gcttatgcc aagaagtacc acatcagatc	60
acttctgtat ggaccaaagg tgttacacca cccgagcagt ttactcaagg tgaagatgtg	120
atccatgctc catatcttgc tcatcaaggc tggtagcata tcaccaaggc cttcgatggg	180
aaggataatc tcttgtgtgg cgcagcaacg gcaggtaata tgctgcattg gtgggtttgat	240
caaaataaaa cagagattga agcctattta agtaaaccac ctgaaaagca aaaaatcatt	300
attcgtaacc aagagctatt tgatttgaaa gctgctatcg ataccaagga cagtcaaacc	360
aatagtcagc tttttaatta ttttagagat aaagcctttc caaatctatc agcacgtcaa	420
ctcgggggta tgcctgatct tgttctagat atgtttatca atgggttacta cttaaatgtg	480
tttaaaacac agtctactga tgtcaatcga ccttatcagg acaaggacaa acgaggtggg	540
attttcgatg ctgttttcac cagaggagat cagacaacgc tcttgacagc tcgtcatgat	600
ttaaaaata aaggactaaa tgacatcagc accattatca agcaagaact gactgaagga	660
agagcccttg ctttatcaca tacctacgcc aatgttagca ttagccatgt gattaacttg	720
tgggggagctg attttaatgc tgaaggaaac cttgaggcca tctatgtcac agactcagat	780
gctaattgct ctattgggat gaaaaaatat tttgtcggca ttaatgctca tggacatgtc	840
gccattttctg ccaagaaaat agaaggagaa aacattggcg ctcaagtatt aggccttattt	900
acgctttcca gtggcaagga ctttggcag aaactgagcg gcggtggcca tcatcaccat	960
caccactaa	969

<210> 46
 <211> 969
 <212> ДНК
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 46	
atggatgatt atcagcgcaa cgcgaccgaa gcgtatgcga aagaagtgcc gcatcagatt	60
accagcgtgt ggaccaaagg cgtgaccccg ccggaacagt ttactcaagg tgaagatgtg	120
attcatgctc cgtatctggc gaaccagggc tggtagcata ttaccaaacg gtttgatggc	180
aaagataacc tgctgtgcgg cgcggcgacc gcgggcaaca tgctgcattg gtgggtttgat	240
cagaacaaaa ccgaaattga agcgtatctg agcaaacatc cggaaaaaca gaaaattatt	300
tttcgcaacc aggaactggt tgatctgaaa gaagcgattc gcaccaaaga tagccagacc	360
aacagccagc tgtttgaata ttttcgcgat aaagcgtttc cgtatctgag cgcgcgccag	420
ctgggcgtga tgccggatct ggtgctggat atgtttatta acggctatta tctgaacgtg	480
tttaaaacc agagcaccga tgtgaaacgc ccgtatcagg ataaagataa acgcggcggc	540
atttttgatg cgggtgtttac ccgcggcaac cagaccaccc tgctgaccgc gcgccatgat	600
ctgaaaaaca aaggcctgaa cgatattagc accattatta aagaagaact gaccaaaggc	660
cgcgcgctgg cgctgagcca tacctatgcg aacgtgagca ttagccatgt gattaacctg	720

tggggcgcg	attttaacgc	ggaaggcaac	ctggaagcga	tttatgtgac	cgatagcgat	780
gcgaacgcga	gcattggcat	gaaaaaatat	tttgtgggca	ttaacaaaca	tggccatgtg	840
gcgattagcg	cgaaaaaat	tgaaggcgaa	aacattggcg	cgcaggtgct	gggcctgttt	900
accctgagca	gcggcaaaga	tatttggcag	aaactgaacg	gcggtggcca	tcataccat	960
caccactaa						969

<210> 47
 <211> 909
 <212> ДНК
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 47						
atgtctgtat	ggaccaaagg	tgttacacca	cccgagcagt	ttactcaagg	tgaagatgtg	60
atccatg	catatcttgc	tcatacaggc	tggtacgata	tcaccaaggc	cttcgatggg	120
aaggataatc	tcttgtgtgg	cgcagcaacg	gcaggtaata	tgctgcattg	gtgggttgat	180
caaaataaaa	cagagattga	agcctattta	agtaaacc	ctgaaaagca	aaaaatcatt	240
tttcgtaacc	aagagctatt	tgatttgaaa	gctgctatcg	ataccaagga	cagtcaaacc	300
aatagtcagc	tttttaatta	ttttagagat	aaagcctttc	caaattctatc	agcacgtcaa	360
ctcggtg	tgctgatct	tgcttagat	atgtttatca	atgggtacta	cttaaagtgtg	420
tttaaaacac	agtctactga	tgtcaatcga	ccttatcagg	acaaggacaa	acgaggtggg	480
atcttcgatg	ctgttttcac	cagaggaaac	cagacaacgc	tcttgacagc	tcgtcatgat	540
ttaaaaata	aaggactaaa	tgacatcagc	accattatca	agcaagaact	gactgaagga	600
agagcccttg	ctttatcaca	tacctacgcc	aatgttagca	ttagccatgt	gattaacttg	660
tggggagctg	attttaatgc	tgaaggaaac	cttgaggcca	tctatgtcac	agactcagat	720
gctaatacgt	ctattgggat	gaaaaaatat	tttgtcggca	ttaatgctca	tggacatgtc	780
gccatttctg	ccaagaaaat	agaaggagaa	aacattggcg	ctcaagtatt	aggcttattt	840
acgctttcca	gtggcaagga	catttggcag	aaactgagcg	gcggtggcca	tcataccat	900
caccactaa						909

<210> 48
 <211> 969
 <212> ДНК
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 48						
atggacgatt	accaaaggaa	tgctacggaa	gcttatgcc	aagaagtacc	acatcagatc	60
acttctgtat	ggaccaaagg	tgttacacca	cccgagcagt	ttactcaagg	tgaagatgtg	120
atccatg	catatcttgc	tcatacaggc	tggtacgata	tcaccaaggc	cttcgatggg	180
gcggataatc	tcttgtgtgg	cgcagcaacg	gcaggtaata	tgctgcattg	gtgggttgat	240

caaaataaaa cagagattga agcctattta agtaaacc	ctgaaaagca aaaaatcatt	300
tttcgtaacc aagagctatt tgatttgaaa gctgctatcg	ataccaagga cagtcaaacc	360
aatagtcagc tttttaatta ttttagagat aaagcctttc	caaatctatc agcacgtcaa	420
ctcgggggta tgcctgatct tgttctagat atgtttatca	atgggttacta cttaaagtgt	480
tttaaaacac agtctactga tgtcaatcga cttatcagg	acaaggacaa acgaggtggt	540
attttcgatg ctgttttcac cagaggaaat cagacaacgc	tcttgacagc tcgtcatgat	600
ttaaaaaata aaggactaaa tgacatcagc accattatca	agcaagaact gactgaagga	660
agagcccttg ctttatcaca tacctacgcc aatgttagca	ttagccatgt gattaacttg	720
tggggagctg attttaatgc tgaaggaaac cttgaggcca	tctatgtcac agactcagat	780
gctaatgctg ctattggtat gaaaaaatat tttgtcggca	ttaatgctca tggacatgtc	840
gccatttctg ccaagaaaat agaaggagaa aacattggcg	ctcaagtatt aggcttattt	900
acgctttcca gtggcaagga catttggcag aaactgagcg	gcggtggcca tcatcaccat	960
caccactaa		969

<210> 49

<211> 909

<212> ДНК

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 49

atgtctgtat ggaccaaagg tgttacacca cccgagcagt	ttactcaagg tgaagatgtg	60
atccatgctg catatcttgc tcatcaaggc tggtagata	tcaccaaggc cttcgatggg	120
gcggataatc tcttgtgtgg cgcagcaacg gcaggtaata	tgctgcattg gtgggttgat	180
caaaataaaa cagagattga agcctattta agtaaacc	ctgaaaagca aaaaatcatt	240
tttcgtaacc aagagctatt tgatttgaaa gctgctatcg	ataccaagga cagtcaaacc	300
aatagtcagc tttttaatta ttttagagat aaagcctttc	caaatctatc agcacgtcaa	360
ctcgggggta tgcctgatct tgttctagat atgtttatca	atgggttacta cttaaagtgt	420
tttaaaacac agtctactga tgtcaatcga cttatcagg	acaaggacaa acgaggtggt	480
attttcgatg ctgttttcac cagaggaaat cagacaacgc	tcttgacagc tcgtcatgat	540
ttaaaaaata aaggactaaa tgacatcagc accattatca	agcaagaact gactgaagga	600
agagcccttg ctttatcaca tacctacgcc aatgttagca	ttagccatgt gattaacttg	660
tggggagctg attttaatgc tgaaggaaac cttgaggcca	tctatgtcac agactcagat	720
gctaatgctg ctattggtat gaaaaaatat tttgtcggca	ttaatgctca tggacatgtc	780
gccatttctg ccaagaaaat agaaggagaa aacattggcg	ctcaagtatt aggcttattt	840
acgctttcca gtggcaagga catttggcag aaactgagcg	gcggtggcca tcatcaccat	900

caccactaa 909

<210> 50
<211> 969
<212> ДНК
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 50
atggacgatt accaaaggaa tgctacggaa gcttatgcca aagaagtacc acatcagatc 60
acttctgtat ggaccaaagg tgttacacca cccgagcagt ttactcaagg tgaagatgtg 120
atccatgcmc catatcttgc tcatcaaggc tggtagcata tcaccaaggc cttcgatggg 180
aaggataatc tcttgtgtgg cgcagcaacg gcaggtaata tgctgcattg gtgggttgat 240
caaaataaaa cagagattga agcctattta agtaaaccac ctgaaaagca aaaaatcatt 300
tttcgtaacc aagagctatt tgatttgaaa gctgctatcg ataccaagga cagtcaaacc 360
aatagtcagc tttttaatta ttttagagat aaagcctttc caaatctatc agcacgtcaa 420
ctcgggggta tgcctgatct tgttctagat atgtttatca atggttacta cttaaatgtg 480
tttaaaacac agtctactga tgtcaatcga ccttatcagg acaaggacaa acgagggtgg 540
attttcgatg ctgtttttcac cagaggaaac cagacaacgc tcttgacagc tcgtcatgat 600
ttaaaaaata aaggactaaa tgacatcagc accattatca agcaagaact gactgaagga 660
agagcccttg ctttatcaca tacctacgcc aatgttagca ttagccatgt gattaacttg 720
tggggagctg attttaatgc tgaaggaaac cttgaggcca tctatgtcac agactcagat 780
gctaatgcmg ctattgggat gaaaaaatat tttgtcggca ttaatgctca tggacatgtc 840
gccattttctg ccaagaaaat agaaggagaa aacattggcg ctcaagtatt aggcttattt 900
acgctttcca gtggcaagga catttggcag aaactgagcg gcggtggcca tcatcaccat 960
caccactaa 969

<210> 51
<211> 969
<212> ДНК
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 51
atggatgatt atcagcgcaa cgcgaccgaa gcgtatgcca aagaagtgcc gcatcagatt 60
accagcgtgt ggaccaaagg cgtgaccccg ctgaccccg aacagtttac ccagggcgaa 120
gatgtgtttc atgcgccgta tgtggcgaac cagggctggg atgatattac caaagcgttt 180
gatggcaaag ataacctgct gtgcggcgcg gcgaccgcmg gcaacatgct gcattggtgg 240
tttgatcaga acaaagatca gattaaacgc tatctggaag aacatccgga aaaacagaaa 300
attaacttta acggcgaaaa catgtttgat gtgaaaaaag cgattgatac caaaaacat 360
cagctggata gcaaactggt taactatttt aaagaaaaag cgtttccgta tctgagcgcg 420

aaacatctgg gcgtgtttcc ggatcatgtg attgatatgt ttattaacgg ctatcgctg	480
agcctgacca accatggccc gaccccggtg aaagaaggca gcaaagatcc gcgcggcggc	540
atTTTTgatg cggTgtttac ccgcggcaac cagagcaaac tgctgaccag ccgccatgat	600
tttaaaaaca aaaacctgaa cgatattagc accattatta aacaggaact gaccaaaaggc	660
aaagcgctgg gcctgagcca tacctatgcg aacgtgcgca ttaaccatgt gattaacctg	720
tggggcgcgg attttaacgc ggaaggcaac ctggaagcga tttatgtgac cgatagcgat	780
agcaacgcga gcattggcat gaaaaaatat tttgtgggcg tgaacgcgca tggccatgtg	840
gcgattagcg cgaaaaaat tgaaggcgaa aacattggcg cgcaggtgct gggcctgttt	900
accctgagca ccggccagga tagctggcag aaactgagcg gcggtggcca tcatcaccat	960
caccactaa	969

<210> 52

<211> 969

<212> ДНК

<213> Streptococcus pyogenes

<400> 52

atggatgatt atcagcgcaa cgcgaccgaa gcgtatgcga aagaagtgcc gcatcagatt	60
accagcgtgt ggaccaaagg cgtgaccccg ctgaccccg aacagtttac ccagggcgaa	120
gatgtgtttc atgcgccgta tgtggcgaa cagggctggt atgatattac caaagcgttt	180
gatggcaaag ataacctgct gtgcggcgcg gcgaccgcgg gcaacatgct gcattggtgg	240
tttgatcaga acaaagatca gattaaacgc tatctggaag aacatccgga aaaacagaaa	300
attaactttc gcggcgaaaa catgtttgat gtgaaagaag cgattcgcac caaaaaccat	360
cagctggata gcaaactggt tgaatatTTT aaagaaaaag cgtttccgta tctgagcgcg	420
aaacatctgg gcgtgtttcc ggatcatgtg attgatatgt ttattaacgg ctatcgctg	480
agcctgacca accatggccc gaccccggtg aaaaaaggca gcaaagatcc gcgcggcggc	540
atTTTTgatg cggTgtttac ccgcggcaac cagagcaaac tgctgaccag ccgccatgat	600
tttaaaaaca aaaacctgaa cgatattagc accattatta aaagcgaact gaccaacggc	660
aaagcgctgg gcctgagcca tacctatgcg aacgtgcgca ttaaccatgt gattaacctg	720
tggggcgcgg attttaacgc ggaaggcaac ctggaagcga tttatgtgac cgatagcgat	780
agcaacgcga gcattggcat gaaaaaatat tttgtgggcg tgaacaaaca tggccatgtg	840
gcgattagcg cgaaaaaat tgaaggcgaa aacattggcg cgcaggtgct gggcctgttt	900
accctgagca ccggccagga tagctggcag aaactgaacg gcggtggcca tcatcaccat	960
caccactaa	969

<210> 53

<211> 969

<212> ДНК
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 53
atggatgatt atcagcgcaa cgcgaccgaa gcgtatgcga aagaagtgcc gcatcagatt 60
accagcgtgt ggaccaaagg cgtgaccccg ctgaccccgg aacagttttac ccagggcgaa 120
gatgtgtttc atgcgccgta tgtggcgaac cagggctggt atgatattac caaaaccttt 180
aacggcaaag atgatctgct gtgcggcgcg gcgaccgcgg gcaacatgct gcattggtgg 240
tttgatcaga acaaagatca gattaaacgc tatctggaag aacatccgga aaaacagaaa 300
attaacttta acggcgaaca gatgtttgat gtgaaagaag cgattgatac caaaaaccat 360
cagctggata gcaaactggt tgaatatattt aaagaaaaag cgtttccgta tctgagcacc 420
aaacatctgg gcgtgtttcc ggatcatgtg attgatatgt ttattaacgg ctatcgctg 480
agcctgacca accatggccc gaccccggtg aaagaaggca gcaaagatcc gcgcggcggc 540
atTTTTgatg cggTgtttac ccgcggcaac cagagcaaac tgctgaccag ccgccatgat 600
tttaaagaaa aaaacctgaa agaaattagc gatctgatta aacaggaact gaccgaaggc 660
aaagcgctgg gcctgagcca tacctatgcg aacgtgcgca ttaaccatgt gattaacctg 720
tggggcgcgg atTTTTgatgc ggaaggcaac ctgaaagcga tttatgtgac cgatagcgat 780
agcaacgcga gcattggcat gaaaaaatat tttgtgggcg tgaacgcggc gggcaaagtg 840
gcgattagcg cgaaaaaat tgaaggcgaa aacattggcg cgcaggtgct gggcctgttt 900
accctgagca ccggccagga tagctggaac cagaccagcg gcggtggcca tcatcaccat 960
caccactaa 969

<210> 54
<211> 969
<212> ДНК
<213> Streptococcus pyogenes

<400> 54
atggatgatt atcagcgcaa cgcgaccgaa gcgtatgcga aagaagtgcc gcatcagatt 60
accagcgtgt ggaccaaagg cgtgaccccg ctgaccccgg aacagttttac ccagggcgaa 120
gatgtgtttc atgcgccgta tgtggcgaac cagggctggt atgatattac caaaaccttt 180
aacggcaaag atgatctgct gtgcggcgcg gcgaccgcgg gcaacatgct gcattggtgg 240
tttgatcaga acaaagatca gattaaacgc tatctggaag aacatccgga aaaacagaaa 300
attaactttc gcggcgaaca gatgtttgat gtgaaagaag cgattcgac caaaaaccat 360
cagctggata gcaaactggt tgaatatattt aaagaaaaag cgtttccgta tctgagcacc 420
aaacatctgg gcgtgtttcc ggatcatgtg attgatatgt ttattaacgg ctatcgctg 480
agcctgacca accatggccc gaccccggtg aaaaaaggca gcaaagatcc gcgcggcggc 540
atTTTTgatg cggTgtttac ccgcggcaac cagagcaaac tgctgaccag ccgccatgat 600

tttaaagaaa aaaacctgaa agaaattagc gatctgatta aagaagaact gaccaaaggc	660
aaagcgctgg gcctgagcca tacctatgcg aacgtgcgca ttaaccatgt gattaacctg	720
tggggcgcgg attttgatgc ggaaggcaac ctgaaagcga tttatgtgac cgatagcgat	780
agcaacgcga gcattggcat gaaaaaatat tttgtgggcg tgaacaaagc gggcaaagtg	840
gcgattagcg cgaaaaaaat tgaaggcgaa aacattggcg cgcaggtgct gggcctgttt	900
accctgagca ccggccagga tagctggaac cagaccaacg gcggtggcca tcatcaccat	960
caccactaa	969

<210> 55
 <211> 963
 <212> ДНК
 <213> Streptococcus pyogenes

<400> 55	
atggatgatt atcagcgcaa cgcgaccgaa gcgtatgcga aagaagtgcc gcatcagatt	60
accagcgtgt ggaccaaagg cgtgaccccg ccggaacagt ttactcaagg tgaagatgtg	120
attcatgcmc cgtatgtggc gaaccagggc tggatgata ttaccaaagc gtttgatggc	180
aaagataacc tgctgtgcgg cgcggcgacc gggggcaaca tgctgcattg gtgggttgat	240
cagaacaaag atcagattaa acgctatctg gaagaacatc cggaaaaaca gaaaattaac	300
tttcgcggcg aacagatgtt tgatgtgaaa aaagcgattg ataccaaaaa ccatcagctg	360
gatagcaaac tgtttaacta ttttaaagaa aaagcgtttc cgggcctgag cgcgcgccgc	420
attggcgtgt ttccggatca tgtgattgat atgtttatta acggctatcg cctgagcctg	480
accaaccatg gcccgacccc ggtgaaagaa ggcagcaaag atccgcgcgg cggcattttt	540
gatgcggtgt ttaccgcgg caaccagagc aaactgctga ccagccgcca tgattttaaa	600
aacaaaaacc tgaacgatat tagcaccatt attaaacagg aactgaccaa aggcaaagcg	660
ctgggcctga gccataccta tgcgaacgtg agcattaacc atgtgattaa cctgtggggc	720
gcggatttta acgcggaagg caacctggaa gcgatttatg tgaccgatag cgatagcaac	780
gcgagcattg gcatgaaaaa atattttgtg ggcgtgaacg cgcattggcca tgtggcgatt	840
agcgcgaaaa aaattgaagg cgaaaacatt ggcgcgcagg tgctgggcct gtttaccctg	900
agcaccggcc aggatagctg gcagaaactg agcggcggtg gccatcatca ccatcaccac	960
taa	963

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, обладающий активностью цистеиновой протеазы в отношении IgG и включающий вариант последовательности SEQ ID NO: 4 или 5, причем этот вариант:

5 (a) по меньшей мере на 50% идентичен SEQ ID NO: 4 или 5;

(b) имеет цистеин (C) в том положении указанного варианта последовательности, которое соответствует положению 102 в SEQ ID NO: 3; и необязательно

10 (c) имеет в тех положениях указанного варианта последовательности, которые соответствуют положениям 92, 272, 294 и 296 в SEQ ID NO: 3, лизин (K), гистидин (H), аспарагиновую кислоту (D) и аспарагиновую кислоту (D), соответственно;

15 и где указанный полипептид более эффективно расщепляет человеческий IgG, чем IdeZ, и/или по меньшей мере расщепляет человеческий IgG с той же эффективностью, что и IdeS.

2. Полипептид по п. 1, в котором вариант последовательности SEQ ID NO: 4 или 5:

20 (1) имеет положительно заряженную аминокислоту в том положении варианта, которое соответствует положению 138 в SEQ ID NO: 3, и положительно заряженная аминокислота необязательно представляет собой аргинин (R) или лизин (K); и/или

25 (2) имеет положительно заряженную аминокислоту в том положении варианта, которое соответствует положению 139 в SEQ ID NO: 3, и положительно заряженная аминокислота необязательно представляет собой аргинин (R) или лизин (K); и/или

(3) не включает непрерывной последовательности DDYQRNATEA YAKEVPHQIT; и/или

(4) имеет по меньшей мере одну из следующих модификаций:

30 i. удаление остатков лейцина (L) и треонина (T) в тех положениях указанного варианта, которые соответствуют положениям 64 и 65 в SEQ ID NO: 3;

ii. треонин (T) вместо аргинина (R) в том положении варианта, которое соответствует положению 70 в SEQ ID NO: 3;

iii. удаление тирозина (Y) в том положении варианта, которое соответствует положению 71 в SEQ ID NO: 3;

5 iv. глутамин (Q) вместо аспарагина (N) в том положении варианта, которое соответствует положению 72 в SEQ ID NO: 3;

v. глицин (G) вместо аспарагина (N) в том положении варианта, которое соответствует положению 73 в SEQ ID NO: 3;

10 vi. аланин (A) вместо глутаминовой кислоты (E) в том положении варианта, которое соответствует положению 67 в SEQ ID NO: 3;

vii. аспарагин (N) вместо глутамина (Q) в том положении варианта, которое соответствует положению 68 в SEQ ID NO: 3..

15 3. Полипептид по п. 1 или п. 2, в котором вариант последовательности SEQ ID NO: 4 или 5 по меньшей мере на 80%, 90%, 95% или 99% идентичен SEQ ID NO: 4 или 5, соответственно, и/или указанный полипептид обладает меньшей иммуногенностью, чем IdeS, и предпочтительно не большей иммуногенностью, чем IdeZ или IdeS/Z, причем иммуногенность определяют с помощью одного и того же анализа.

20 4. Полипептид по любому из пп. 1-3, который включает или состоит из любой из последовательностей SEQ ID NO: 6-25, где указанная последовательность необязательно включает дополнительный метионин на N-конце и/или гистидиновую метку на C-конце.

25 5. Полипептид по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что полипептид по меньшей мере в 2,0 раза более эффективно, чем IdeZ, расщепляет человеческий IgG, причем расщепление оценивают с помощью одного и того же анализа.

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 одного и того же анализа.

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

5 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.

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

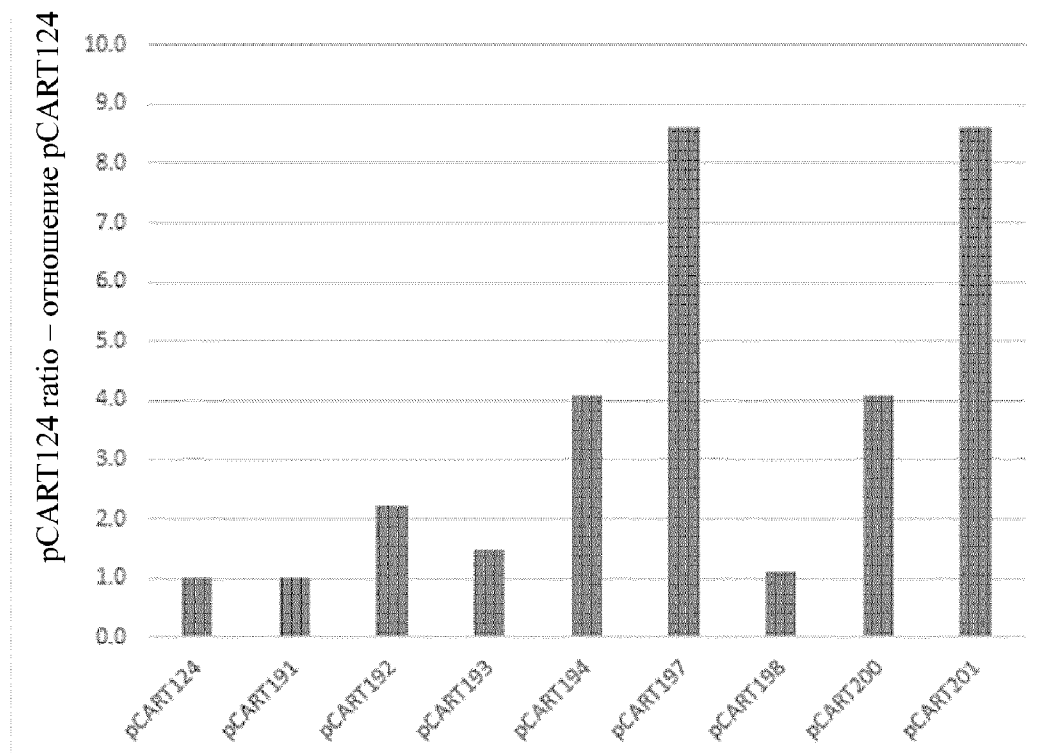
11. Способ профилактики или лечения заболевания или состояния у субъекта, отличающийся тем, что способ включает введение субъекту полипептида по любому из пп. 1-6 в профилактически или терапевтически эффективном количестве.

15 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.

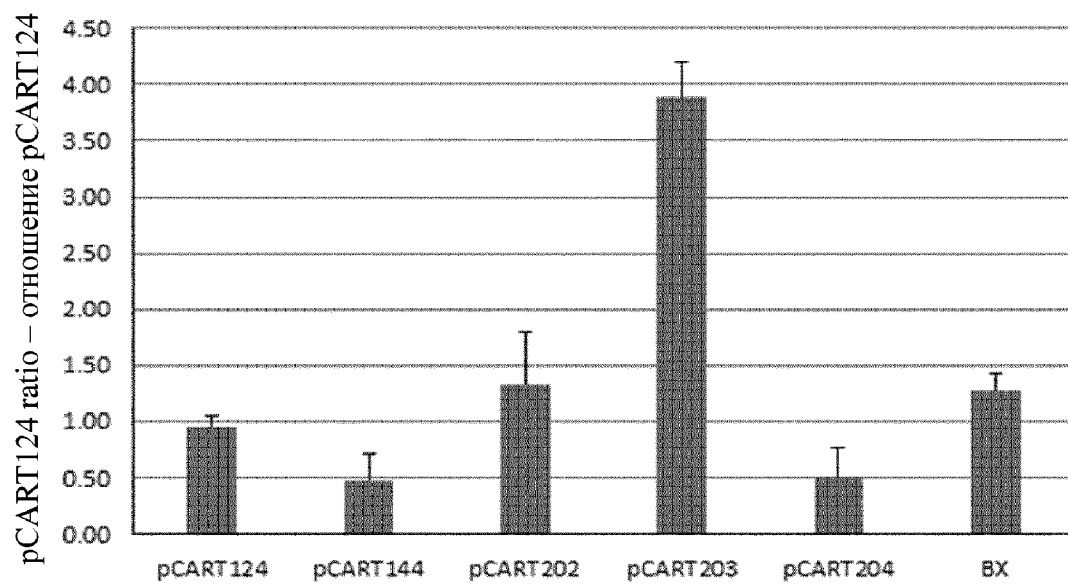
20 13. Способ расщепления IgG, который включает контакт образца, содержащего IgG, с полипептидом по любому из пп. 1-6, в условиях позволяющих проявиться активности IgG-цистеиновой протеазы.

25 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.

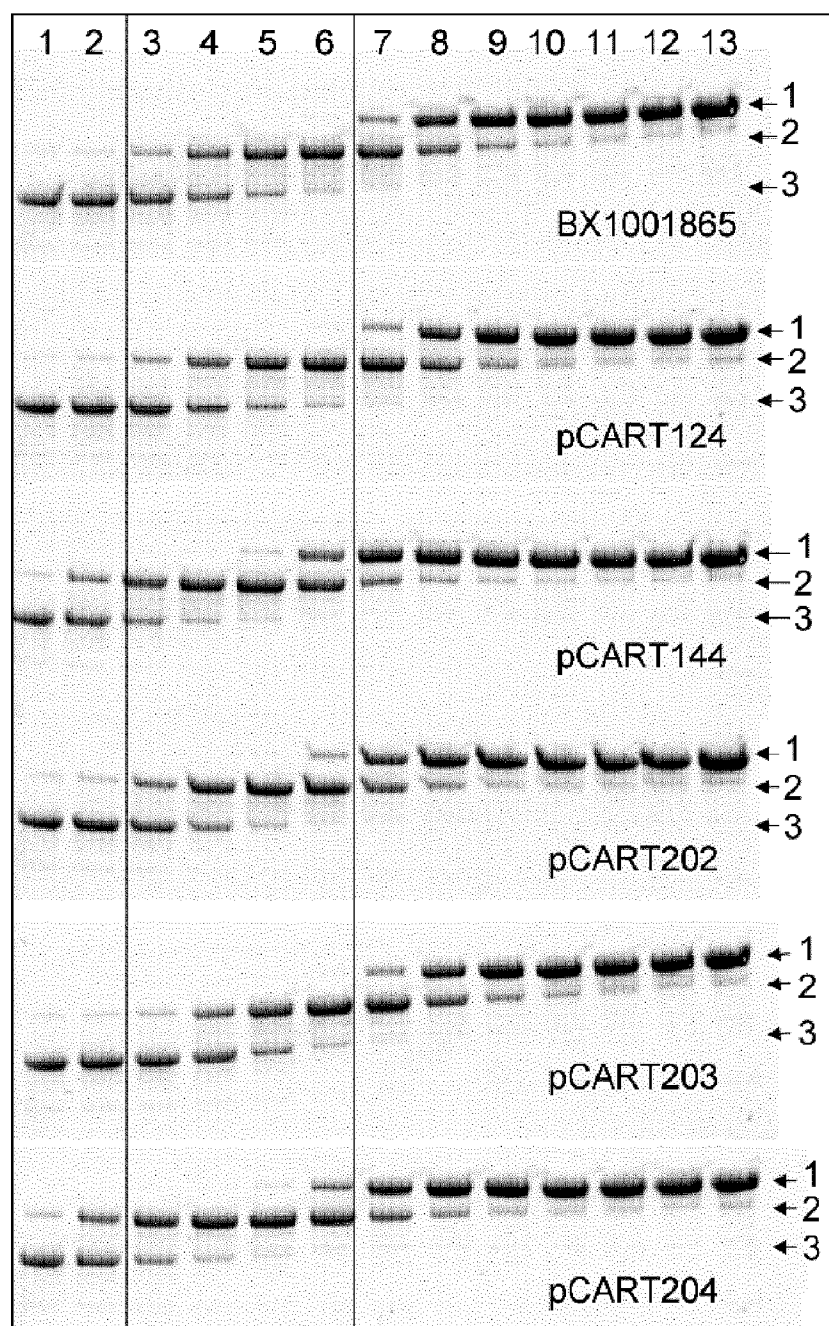
1

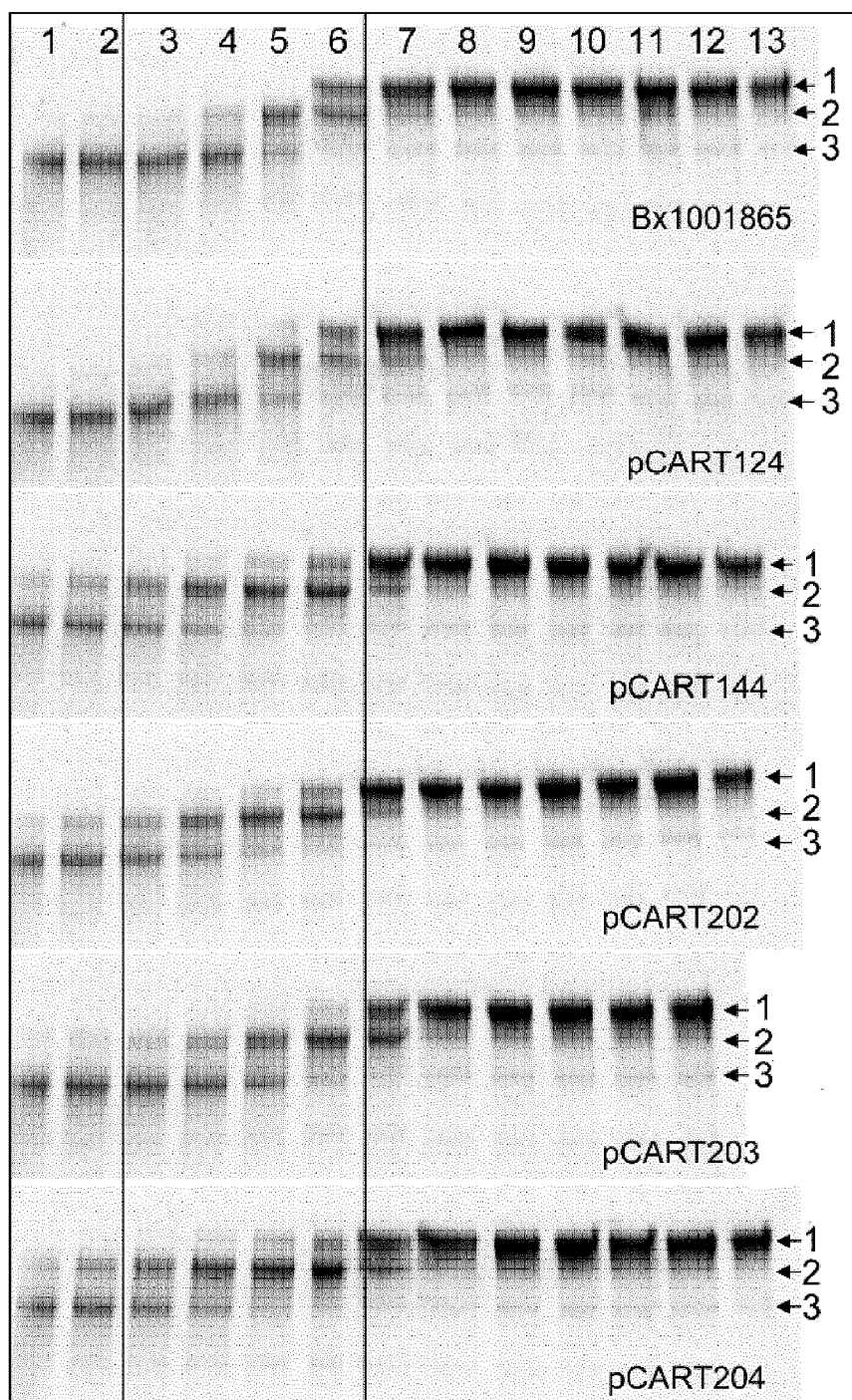


ФИГ. 1

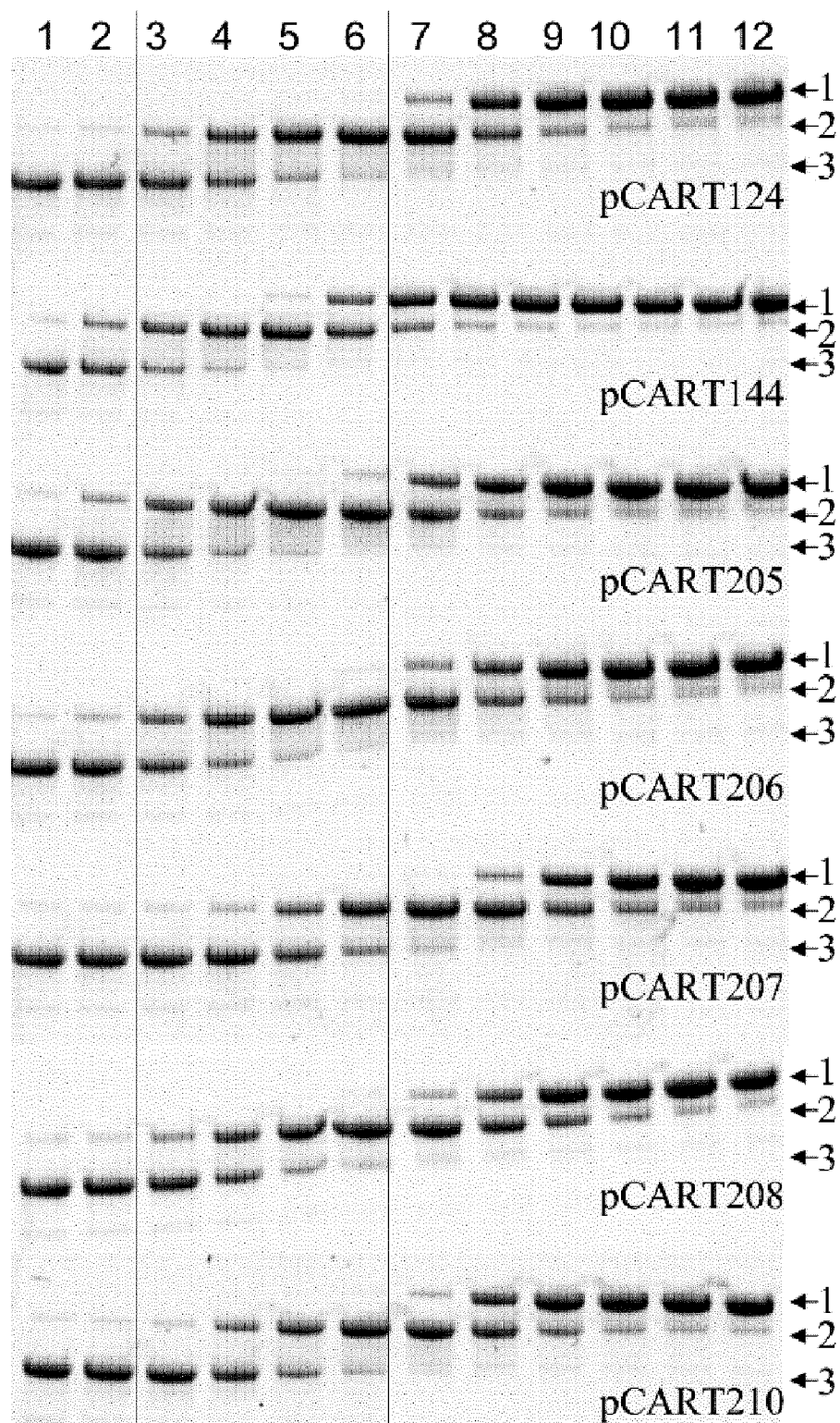


ФИГ. 2

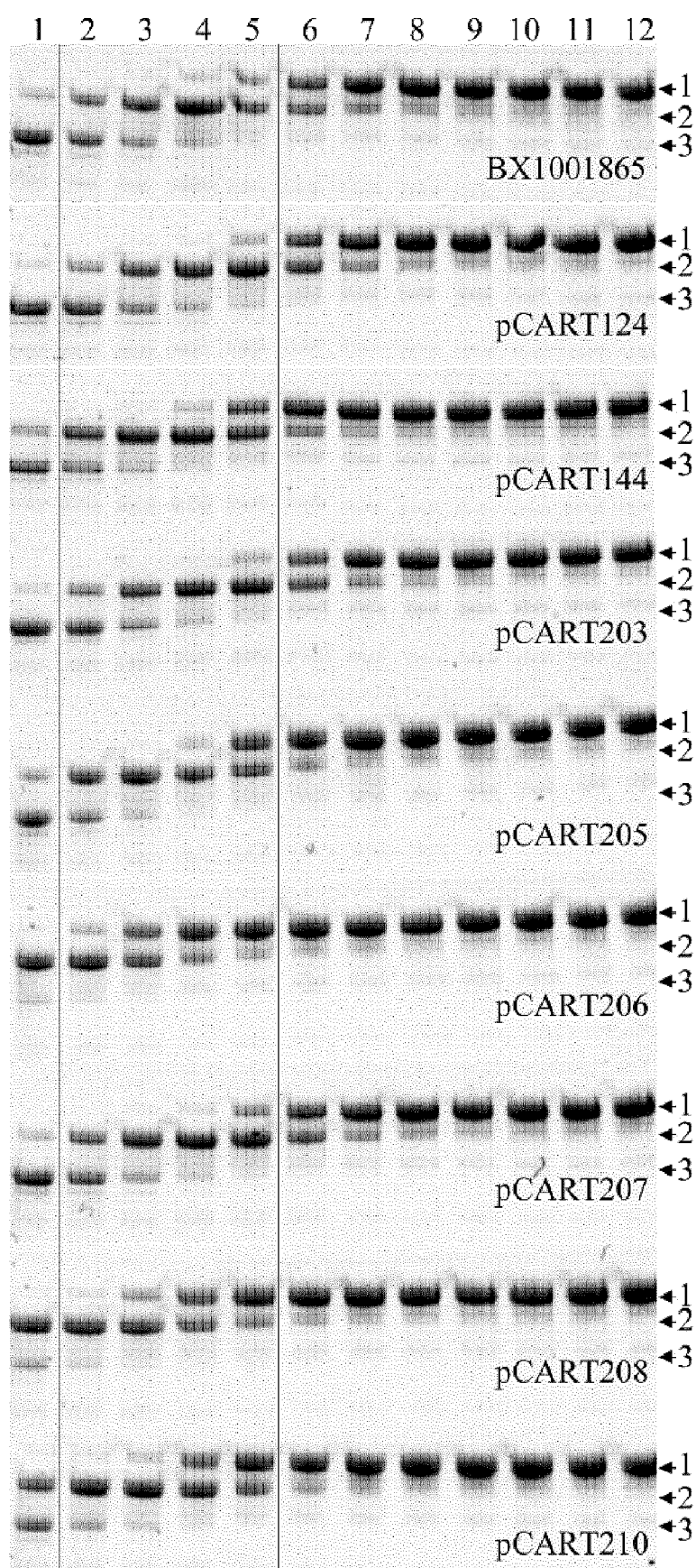
*ФИГ. 3*



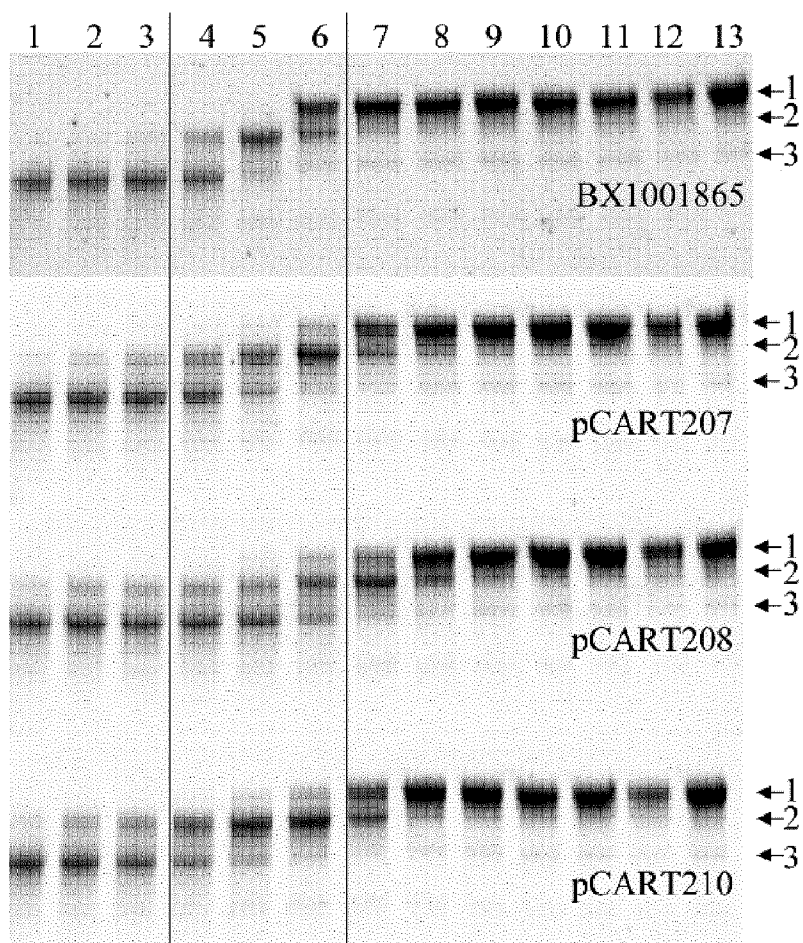
ФИГ. 4



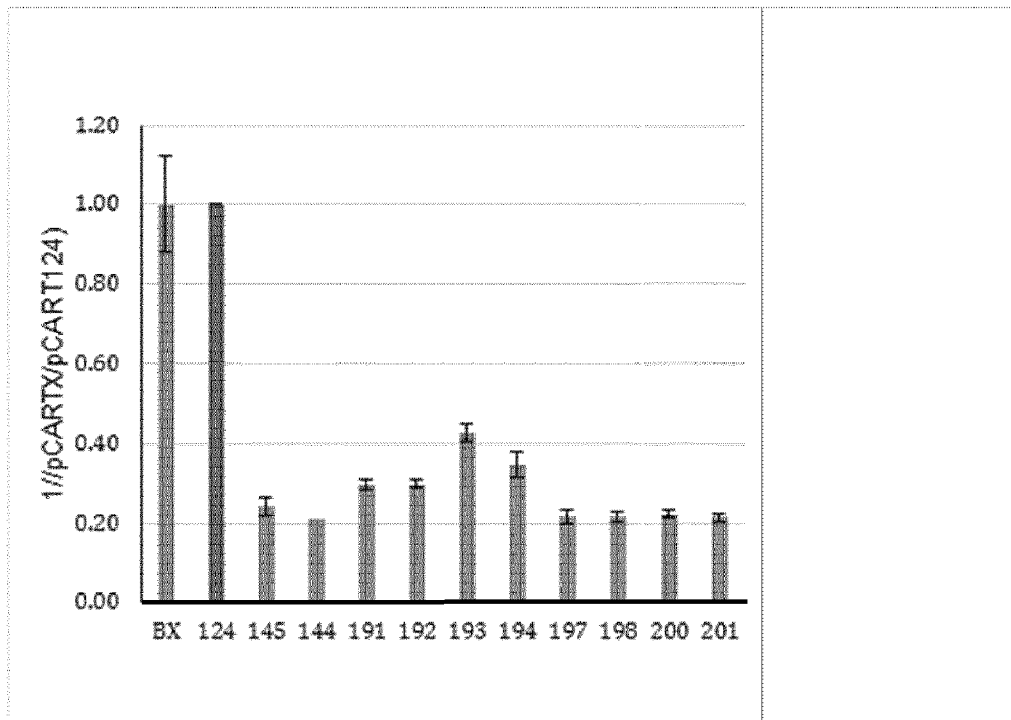
ФИГ. 5



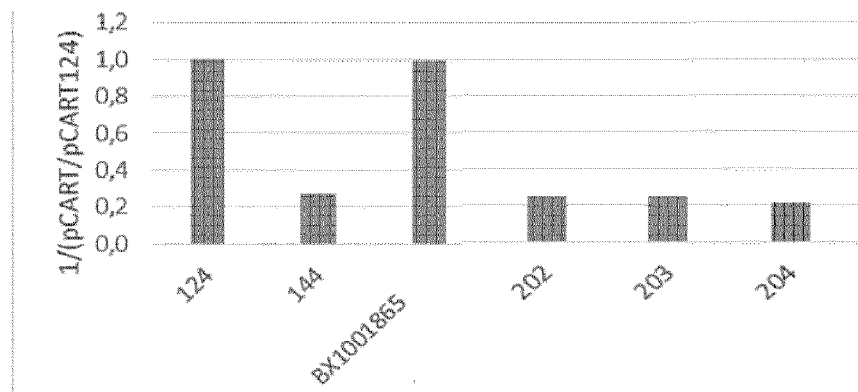
ФИГ. 6



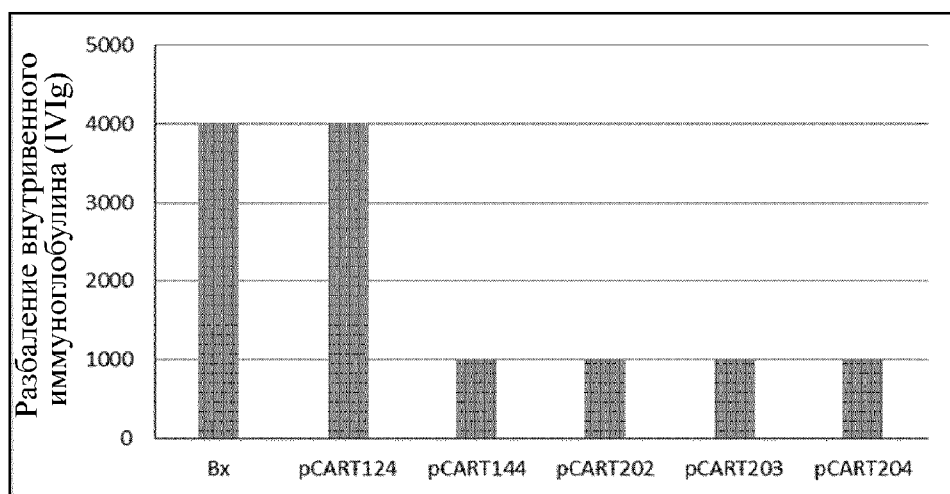
ФИГ. 7



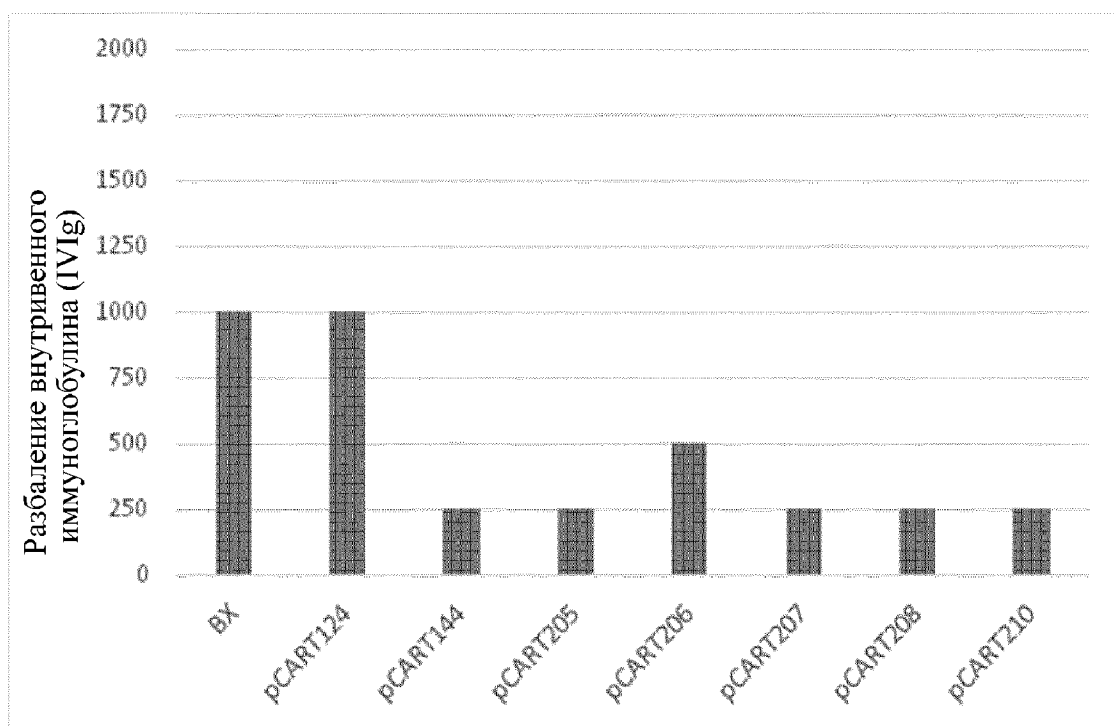
ФИГ. 8



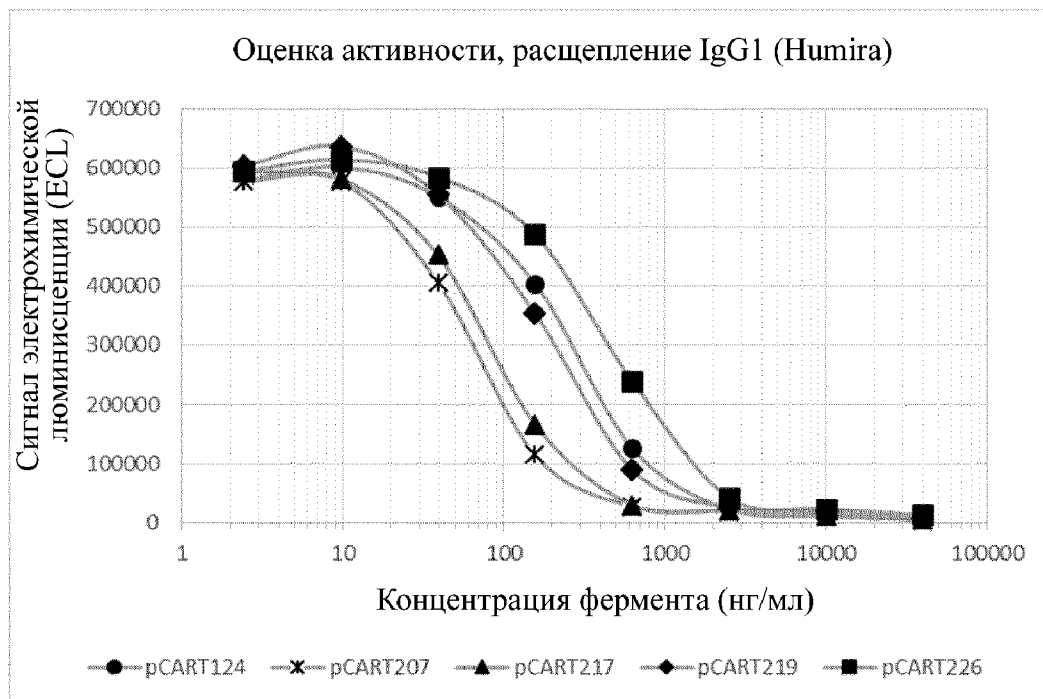
ФИГ. 9



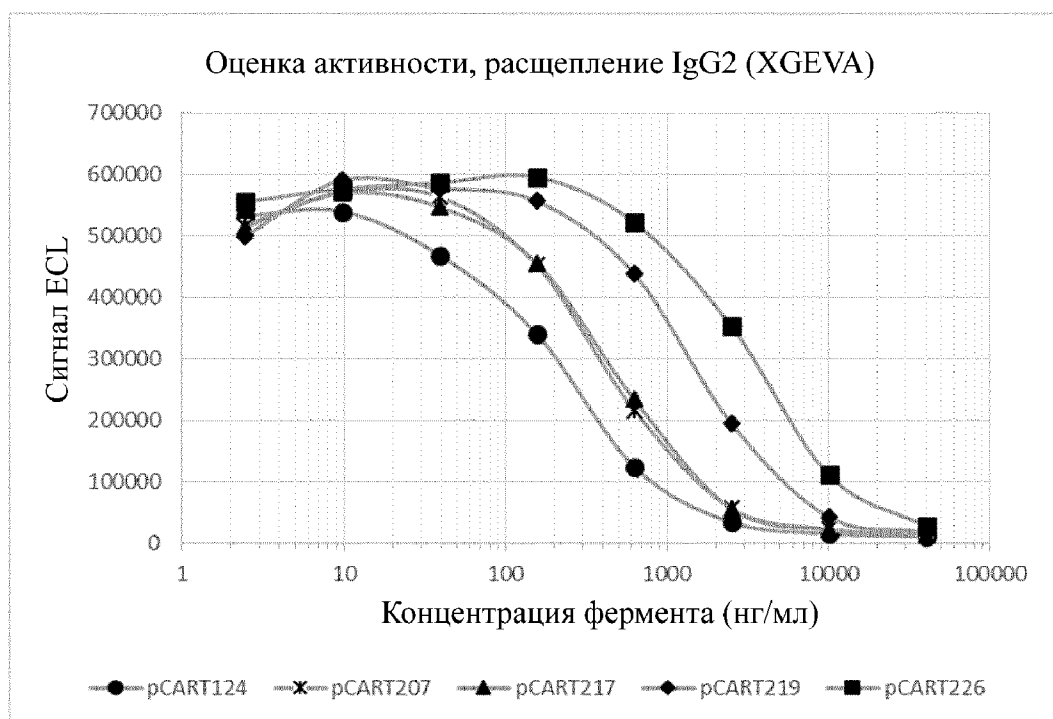
ФИГ. 10



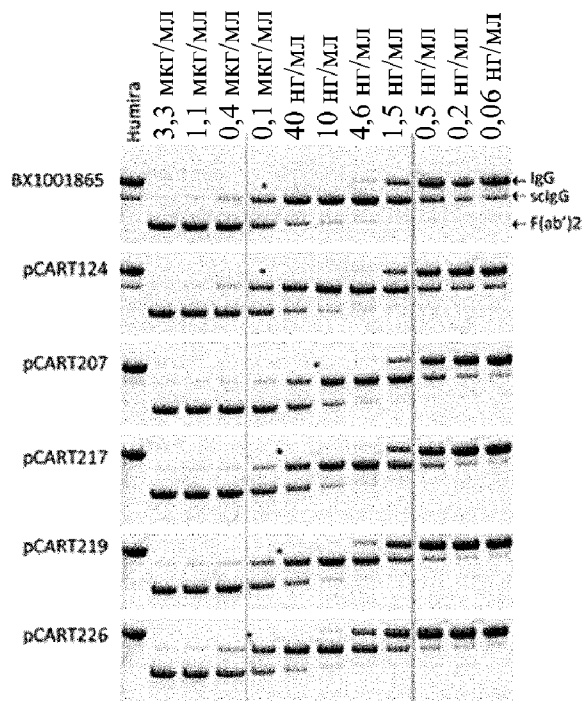
ФИГ. 11



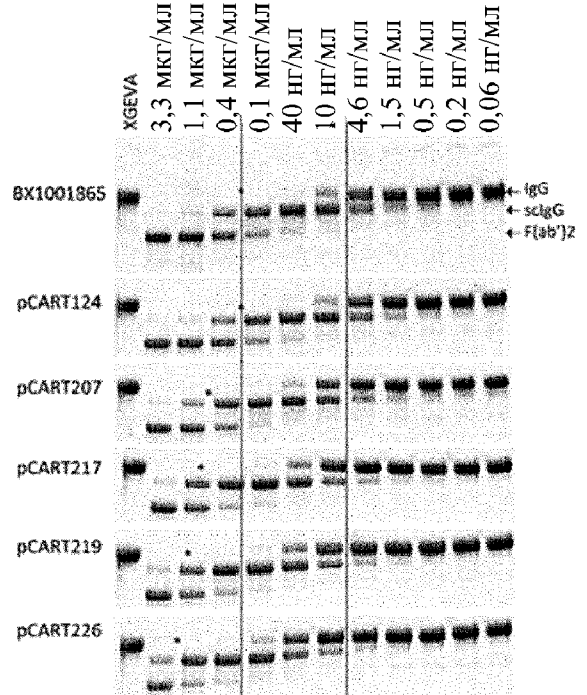
ФИГ. 12



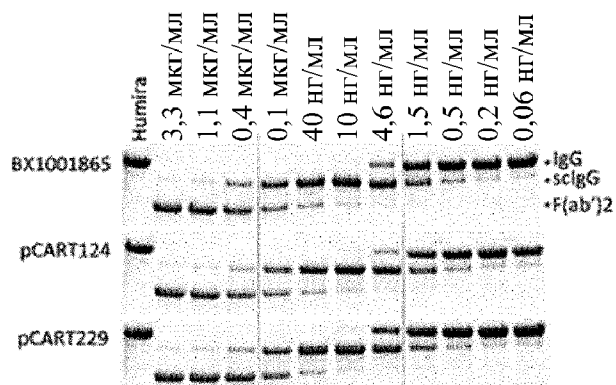
ФИГ. 13



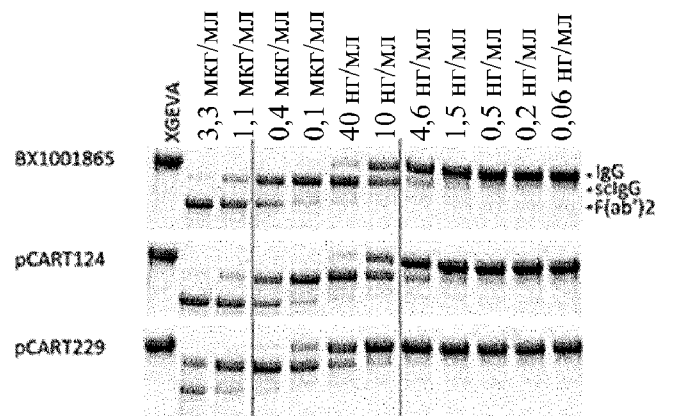
ФИГ. 14А



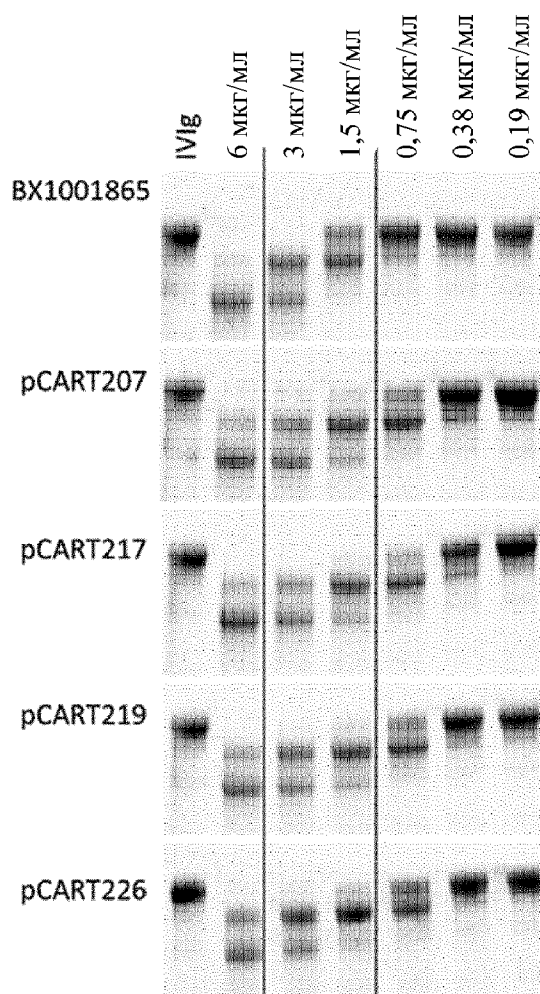
ФИГ. 14В



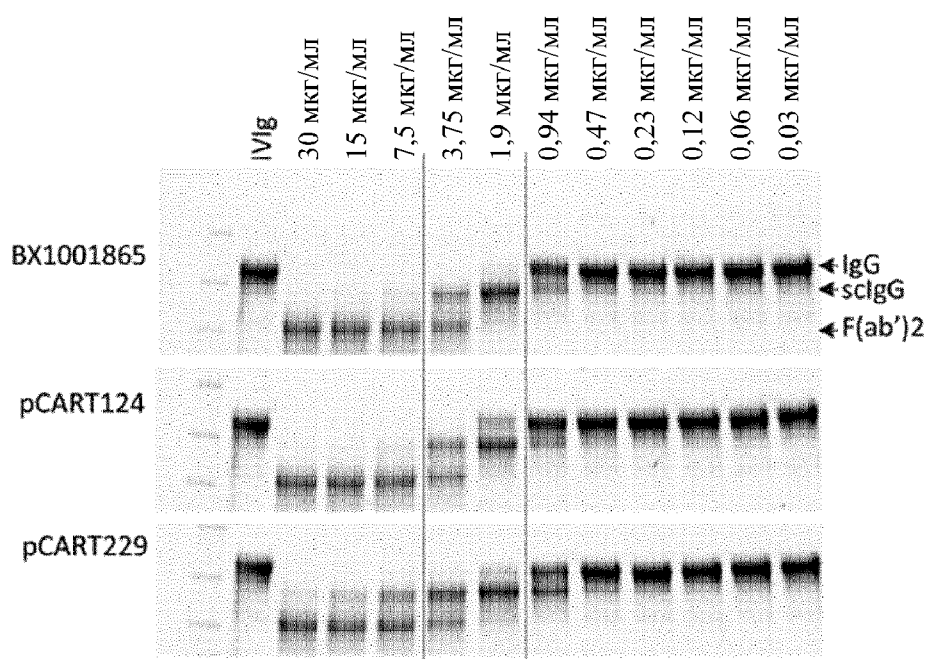
ФИГ. 15А



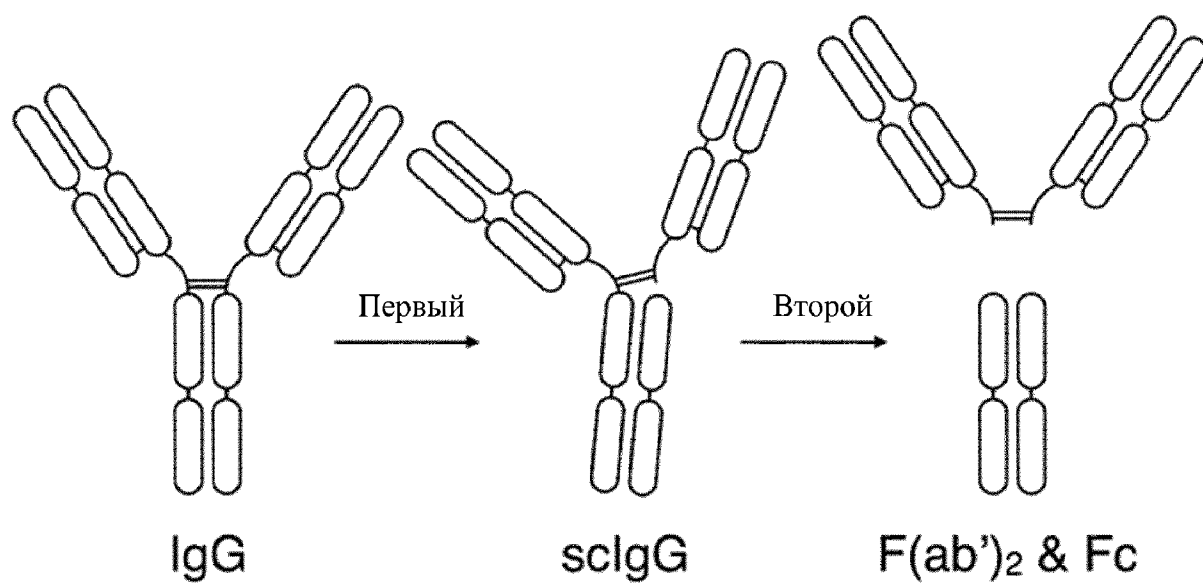
ФИГ. 15В



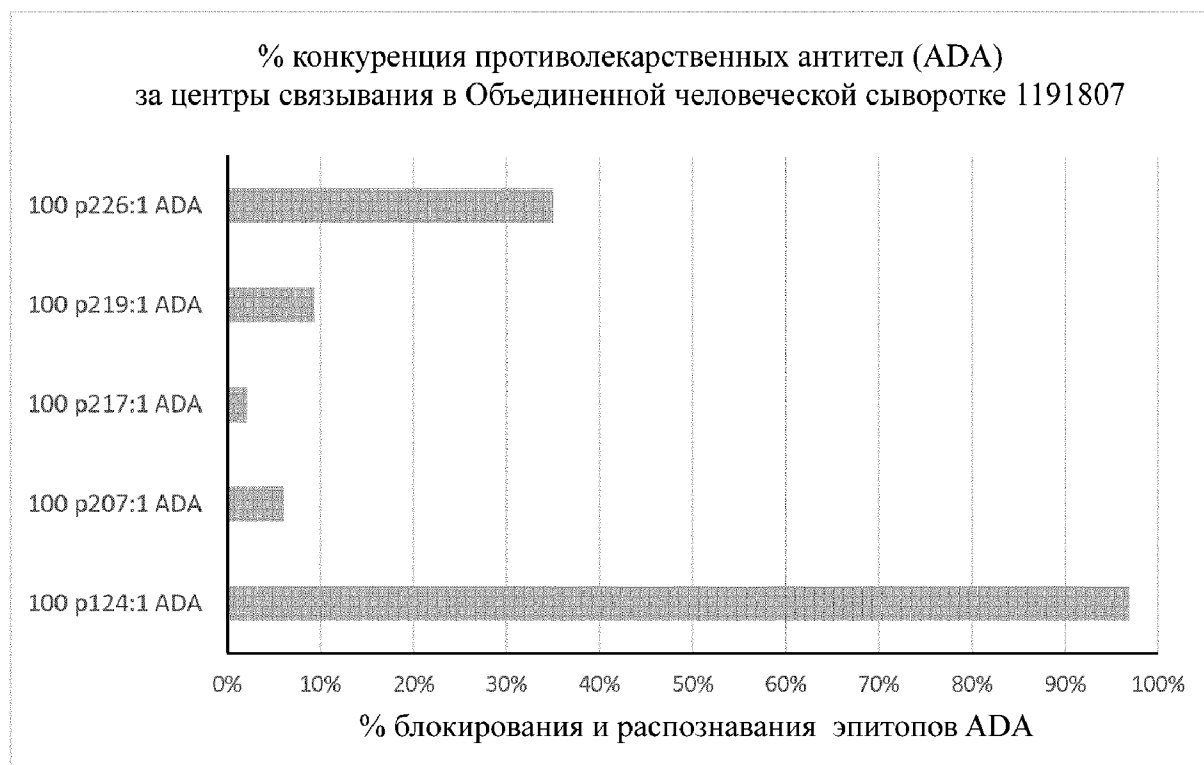
ФИГ. 16



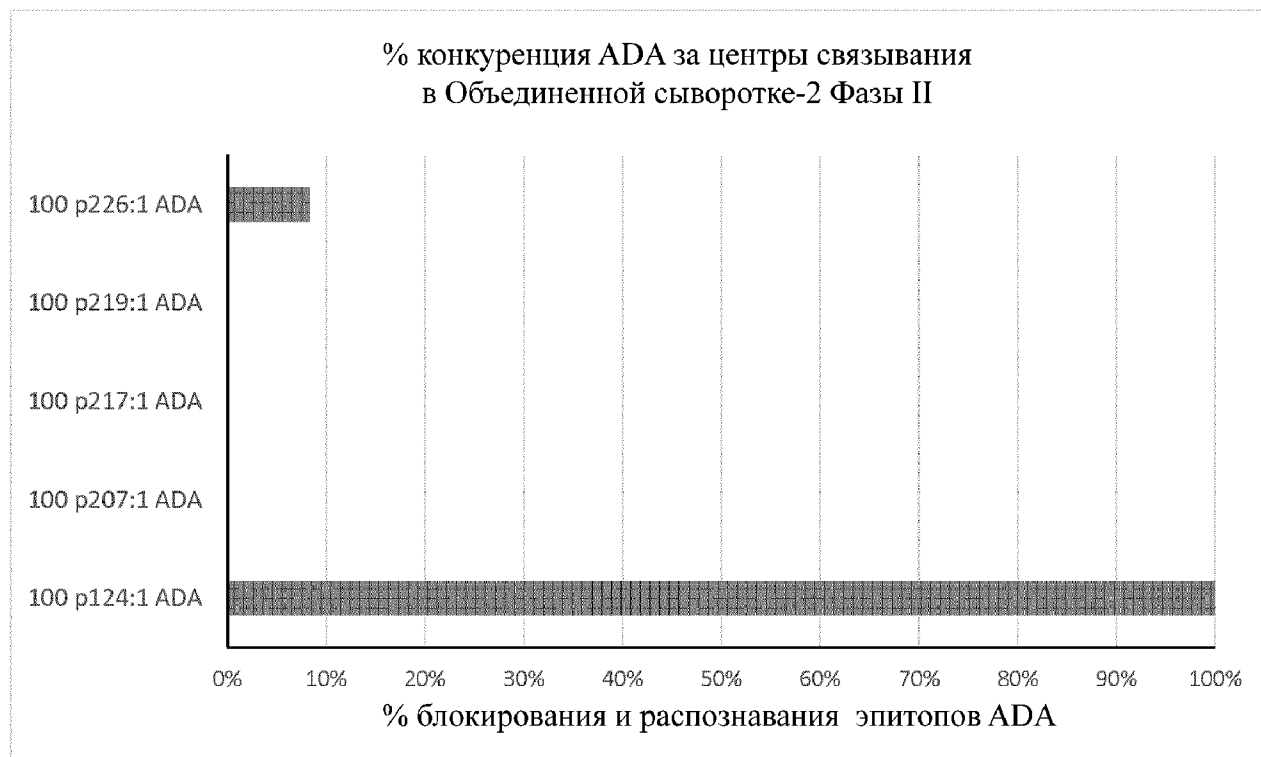
ФИГ. 17



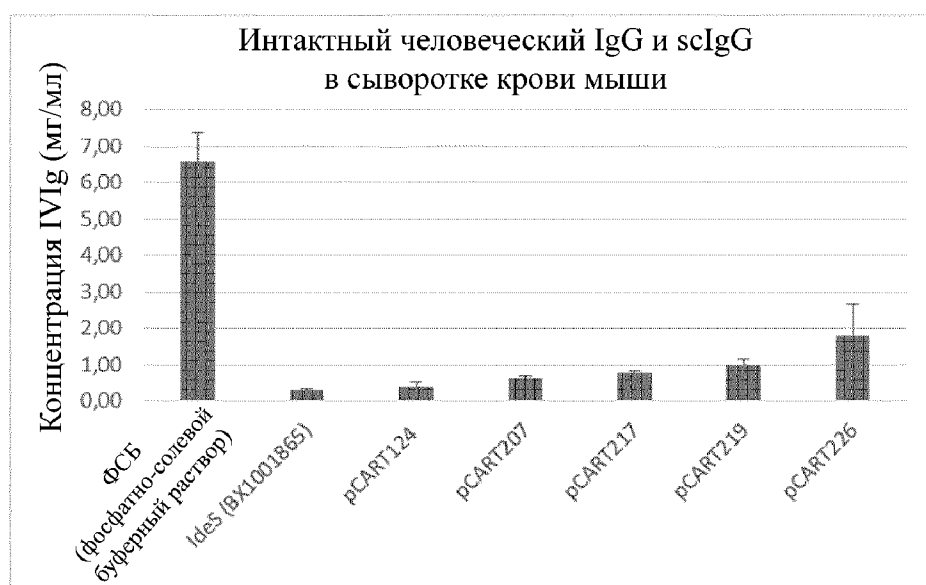
ФИГ. 18



ФИГ. 19

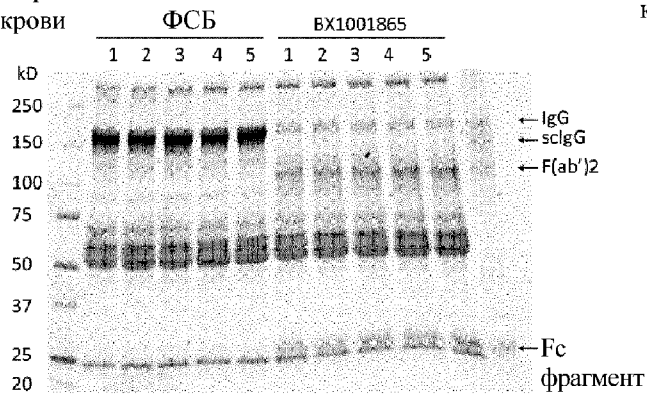


ФИГ. 20

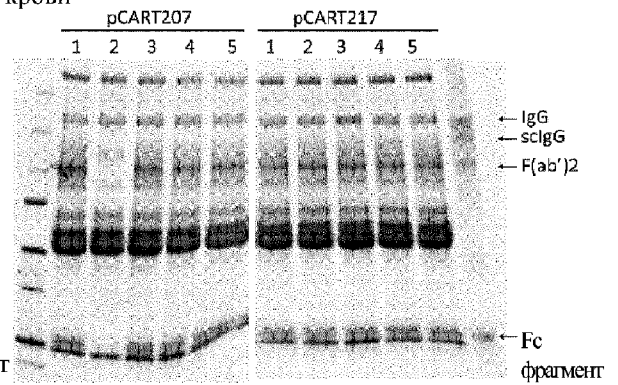


ФИГ. 21

Сыворотка
крови

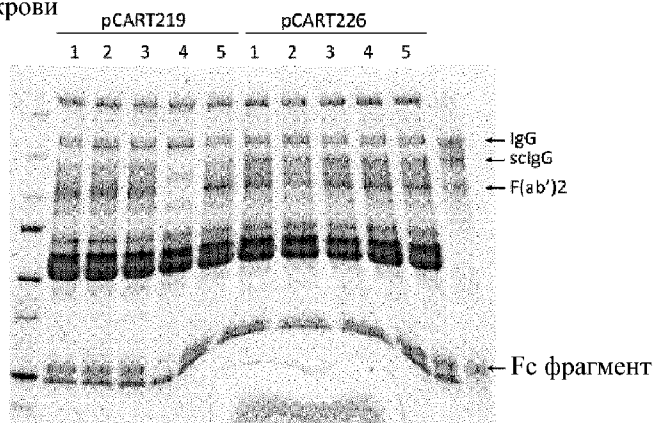


Сыворотка
крови



Сыворотка
крови

ФИГ. 22А



ФИГ. 22С

ФИГ. 22В