

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 201792176 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2018.02.28

(51) Int. Cl. C07K 16/24 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2016.03.31

(54) ПОЛИПЕПТИДЫ

(31) 15162112.5

(32) 2015.03.31

(33) EP

(86) PCT/EP2016/057021

(87) WO 2016/156465 2016.10.06

(71) Заявитель:
ВиЭйчСКВЕАРД ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
Кроу Скотт, Уэст Майк, Робертс
Кевин, Карлтон Тим, Маджоре Луана,
Кьюбитт Мэрион, Рэй Кейт (GB)

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

(57) Настоящее изобретение относится, в частности, к полипептиду, содержащему переменный домен цепи иммуноглобулина, который связывается с TNF-альфа, причем переменный домен цепи иммуноглобулина содержит три определяющих комплементарность области (CDR1-CDR3) и четыре каркасных области (FR1-FR4), где CDR1-CDR3 и FR1-FR4 определены в данном описании.

A1

201792176

201792176

A1

ПОЛИПЕПТИДЫ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к полипептидам, содержащим вариабельный домен иммуноглобулиновой цепи (или «вариабельный домен»), который связывается с фактором некроза опухолей-альфа (TNF-альфа, «TNF- α » или «TNF»), а также к конструкциям и фармацевтическим композициям, содержащим эти полипептиды. Настоящее изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим такие полипептиды, к способам получения таких полипептидов, к кДНК и векторам, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие такие полипептиды, к клеткам-хозяевам, экспрессирующим или способным экспрессировать такие полипептиды, и к применению таких полипептидов, фармацевтических композиций или конструкций.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Фактор некроза опухолей-альфа представляет собой гомотримерный провоспалительный цитокин, участвующий в системном воспалении, который существует как в растворимой, так и мембраносвязанной форме. TNF-альфа секретируется преимущественно моноцитами и макрофагами, но также секретируется опухолевыми клеточными линиями, а также CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитами периферической крови и некоторыми культивируемыми линиями Т- и В-клеток. TNF-альфа участвует в воспалительных заболеваниях, аутоиммунных заболеваниях, вирусных, бактериальных и паразитарных инфекциях, злокачественных заболеваниях и/или нейродегенеративных заболеваниях, а также является мишенью направленной биотерапии аутоиммунных/аутовоспалительных заболеваний, таких как ревматоидный артрит и болезнь Крона.

Болезнь Крона, также известная как синдром Крона и регионарный энтерит, представляет собой тип воспалительного заболевания кишечника, вызывающего широкий спектр симптомов. В первую очередь это заболевание вызывает боль в животе, понос, рвоту и/или потерю веса, но также может вызвать осложнения, не

связанные с желудочно-кишечным трактом (ЖКТ), такие как анемия, сыпь на коже, артрит, воспаление глаз, усталость и отсутствие концентрации (Baumgart et al 2012 *The Lancet* 380(9853):1590-605, которая полностью включена в данное описание путем ссылки). Болезнь Крона является в настоящее время неизлечимым хроническим заболеванием ЖКТ, которое трудно контролировать с помощью обычных методов лечения. Болезнь Крона описана более подробно ниже в разделе «Аутоиммунные заболевания».

Ингибитор TNF-альфа, который имеет достаточную специфичность к TNF-альфа, может являться эффективным профилактическим или терапевтическим фармацевтическим препаратом для профилактики или лечения заболеваний, таких как болезнь Крона, где TNF-альфа является ключевым цитокином, обуславливающим наблюдаемую патологию.

Терапевтические средства на основе антител обладают значительным потенциалом в качестве эффективного терапевтического средства для лечения аутоиммунных заболеваний, поскольку они обладают высокой специфичностью к своей мишени и присущей им низкой токсичностью. Описаны способы лечения аутоиммунного заболевания путем введения антител, которые связываются с TNF-альфа (Kamm et al 2011 *Inflamm Bowel Dis* 17:2366-91, которая полностью включена в данное описание путем ссылки).

В клинике для лечения болезни Крона используются три анти-TNF-альфа антитела - инфликсимаб (торговое название Ремикад), адалимумаб (торговое название Хумира) и цертолизумаб (или «Цертолизумаб пегол», оба с торговым названием Симзия); однако эти антитела, как правило, считаются неподходящими для введения в виде пероральных терапевтических средств вследствие присущей им нестабильности и подверженности протеолитической деградации со стороны пищеварительной системы, воспалительных протеаз, присутствующих в участках патологии в желудочно-кишечном тракте, и кишечной микрофлоры. Таким образом, эти агенты должны вводиться путем внутривенной инфузии или подкожной инъекции, что требует специальной подготовки для правильного и безопасного использования шприца или иглы для подкожных инъекций. Эти агенты

также требуют стерильного оборудования, жидкого состава терапевтического полипептида, упаковки флакона указанного полипептида в стерильной и стабильной форме и подходящего участка на субъекте для ввода иглы. Субъекты обычно испытывают психологический стресс перед инъекцией и боль во время инъекции. Длительное лечение этими системными анти-TNF-альфа антителами несет повышенный риск тяжелых инфекций и рака. Вместе с высокой стоимостью производства в настоящее время эти факторы ограничивают использование этих агентов у пациентов с более тяжелой формой заболевания.

В настоящее время в клинической разработке для лечения болезни Крона также находятся несколько низкомолекулярных противовоспалительных и иммунодепрессивных лекарственных средств (Danese 2012 *Gut* 61:918-932 и Shealy et al 2010 *mAbs* 2:428-439, которые полностью включены в данное описание путем ссылки). Хотя эти препараты вводятся перорально, многие из них после введения будут доступны системно и, следовательно, могут иметь системное иммунодепрессивное действие, которое не связано с активностью в отношении повреждений желудочно-кишечного тракта. Кроме того, поскольку низкомолекулярные соединения не имеют специфичности антител, риск значительных побочных эффектов остается высоким.

Болезнь Крона является, прежде всего, заболеванием желудочно-кишечного тракта. Продукция TNF-альфа локализована в клетках, присутствующих в тканях слизистой оболочки и подслизистого слоя, и это приводит к хроническим воспалительным процессам в стенке кишечника и привлечению дополнительных воспалительных клеток, которые отвечают за развитие иммунопатологии заболевания (van Deventer 1999 *Ann Rheum Dis* 58(Suppl 1):I114-I120). Возможность доставки перорального терапевтического агента с высокой селективностью в отношении TNF-альфа, но с действием и активностью, ограниченными кишечником, могут обеспечить эффективность, аналогичную инъекционным анти-TNF-альфа антителам, в сочетании со значительным улучшением безопасности за счет снижения системного воздействия.

В патентах WO 2004/041862, WO 2006/122786 и в статье

Coppieters et al 2006 *Arthritis & Rheumatism* 54(6):1856-1866 (полностью включенных в данное описание путем ссылки) раскрыты однодоменные антитела к TNF-альфа и связанные с ними аспекты. Последовательности, указанные в заявке WO 2006/122786, как «TNF1», «PMP1C2» или «SEQ ID NO: 52» описаны ниже.

Полипептиды по настоящему изобретению могут по меньшей мере в некоторых вариантах осуществления изобретения иметь одно или несколько из следующих преимуществ по сравнению с анти-TNF-альфа соединениями из предшествующего уровня техники:

- (i) повышенное сродство к TNF-альфа;
- (ii) повышенная специфичность к TNF-альфа;
- (iii) повышенная нейтрализующая способность в отношении TNF-альфа;
- (iv) повышенная перекрестная реактивность с TNF-альфа из различных видов, таких как человек и яванский макак;
- (v) повышенная перекрестная реактивность с обоими растворимой и мембранной формами TNF-альфа;
- (vi) сниженная иммуногенность, например, при введении мыши, яванскому макаку или человеку;
- (vii) повышенная стабильность в присутствии протеаз, например, (a) в присутствии протеаз, найденных в тонком и/или толстом кишечнике, и/или воспалительных протеаз при IBD, например, трипсина, химотрипсина, MMP3, MMP10, MMP12, других MMP и катепсина, и/или (b) в присутствии протеаз из комменсальной микрофлоры кишечника и/или патогенных бактерий, активно секретируемых и/или высвобождаемых при лизисе микробных клеток, обнаруженных в тонком и/или толстом кишечнике;
- (viii) повышенная устойчивость к протеолитической деградации в процессе получения (например, устойчивость к дрожжевым протеазам);
- (ix) повышенная пригодность для перорального введения;
- (x) повышенная пригодность для местной доставки в желудочно-кишечный тракт и собственную пластинку (*lamina propria*) после перорального введения;
- (xi) повышенная пригодность для экспрессии в гетерологичном хозяине, таком как бактерии, такие как *Escherichia coli*, или

дрожжи, принадлежащие к роду *Aspergillus*, *Saccharomyces*, *Kluveromyces*, *Hansenula* или *Pichia*, такие как *Saccharomyces cerevisiae* или *Pichia pastoris*;

(xii) пригодность и улучшенные свойства для использования в качестве фармацевтического препарата;

(xiii) пригодность и улучшенные свойства для использования в функциональных пищевых продуктах;

(xiv) улучшенное проникновение в ткани, такое как проникновение в воспаленный эпителий слизистой оболочки и подслизистые ткани толстого кишечника, чтобы получить доступ к подслизистой *lamina propria*;

(xv) полипептиды остаются по существу активными после (a) замораживания и размораживания, и/или (b) после длительного хранения в лиофилизированной, жидкой/эмульгированной форме, например, при 37 или 50°C;

(xvi) сниженная иммуногенность у человека, например, вследствие увеличения сходства последовательности с иммуноглобулинами человека;

(xvii) повышенная пригодность для создания в мультиспецифичном формате;

(xviii) связывание с новыми эпитопами.

Преимущества (i)-(xviii), указанные выше, могут быть потенциально реализованы в полипептидах по настоящему изобретению в одновалентном или в поливалентном формате, таком как двуглавый формат (например, гомодвуглавый или гетеродвуглавый форматы).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящего изобретения получили неожиданно предпочтительные полипептиды, содержащие переменные домены цепей иммуноглобулинов, которые связываются с TNF-альфа. В частности, эти полипептиды являются предпочтительными благодаря неожиданно высокой активности. Они также нейтрализуют как растворимую, так и мембранную формы TNF-альфа, способны перекрестно реагировать с TNF-альфа яванского макака и остаются стабильными при воздействии трипсина, химотрипсина и/или протеаз

тонкого и толстого кишечника. В одном варианте осуществления эти полипептиды дополнительно улучшены с помощью генной инженерии. Эти дополнительно улучшенные полипептиды, предпочтительные благодаря указанным выше преимуществам, сохраняют свою TNF-альфа-нейтрализующую активность при прохождении через желудочно-кишечный тракт и дополнительно устойчивы к деградации и/или инактивации протеазами кишечного тракта, например, пищеварительными, воспалительными и микробными протеазами у, например, нескольких видов млекопитающих (грызунов, свиней, приматов и человека).

Можно ожидать, что эти полипептиды будут особенно полезны для профилактики или лечения аутоиммунных и/или воспалительных заболеваний, таких как воспалительное заболевание кишечника (например, болезни Крона или язвенного колита), или для профилактики или лечения мукозита, в частности, при пероральном введении.

Настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему переменный домен цепи иммуноглобулина, который связывается с TNF-альфа, где переменный домен цепи иммуноглобулина содержит три определяющие комплементарности области (CDR1-CDR3) и четыре каркасные области (FR1-FR4), где CDR1 содержит последовательность, имеющую 60% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 1, CDR2 содержит последовательность, имеющую 50% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 2 и (a) CDR3 содержит последовательность, имеющую 80% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 3, или (b) CDR3 содержит последовательность, имеющую 50% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 3, и где остаток в CDR3, соответствующий остатку номер 3 в SEQ ID NO: 3, представляет собой R, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y или V.

Также изобретение относится к полипептиду, содержащему переменный домен цепи иммуноглобулина, который связывается с TNF-альфа, где переменный домен цепи иммуноглобулина содержит три определяющие комплементарности области (CDR1-CDR3) и четыре

каркасные области (FR1-FR4), где CDR1 содержит последовательность, имеющую 60% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 15, CDR2 содержит последовательность, имеющую 50% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 16, и CDR3 содержит последовательность, имеющую 50% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 17.

Также изобретение относится к полипептиду, содержащему переменный домен цепи иммуноглобулина, который связывается с TNF-альфа, где переменный домен цепи иммуноглобулина содержит три определяющие комплементарность области (CDR1-CDR3) и четыре каркасные области (FR1-FR4), где CDR3 содержит последовательность, имеющую 80% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 3.

ОПИСАНИЕ ФИГУР

Фигура 1 - % TNF-альфа-нейтрализующей активности периплазматических супернатантов и очищенных образцов при воздействии и без воздействия трипсина и химотрипсина

Фигура 2A - Q65B1, Q65C7, Q62E10 и адалимумаб в репортерном анализе HEK-NF-κB-SEAP.

Фигура 2B - нейтрализация hs-TNF-альфа с помощью Q65B1 и Q65D3.

Фигура 3 - переменные домены иммуноглобулиновых цепей при расщеплении протеазами тонкого кишечника мыши и фекальными протеазами человека.

Фигура 4A - нейтрализация hs-TNF-альфа с помощью ID32F, ID34F, Q65B1 и инфликсимаба (первый эксперимент).

Фигура 4B - нейтрализация hs-TNF-альфа с помощью ID32F, ID34F и Q65B1 (второй эксперимент).

Фигура 4C - нейтрализация hs-TNF-альфа с помощью ID37F, ID38F и Ремикада (второй эксперимент).

Фигура 5A - устойчивость ID34F и ID25F к действию протеаз воспалительной болезни кишечника (IBD-протеаз).

Фигура 5B - устойчивость этанерцепта и адалимумаба к IBD-протеазам.

Рисунок 5С - устойчивость инфликсимаба к IBD-протеазам.

Фигура 6 - Нейтрализация h-TNF-альфа с помощью анти-TNF-альфа полипептидов предшествующего уровня техники.

Фигура 7 - Расчетная просветная концентрация [анти-TNF ICVD (вариабельного домена иммуноглобулиновой цепи)] в срезах желудочно-кишечного тракта яванских макак.

Фигура 8 - общий % выделенного анти-TNF ICVD из желудочно-кишечного тракта яванских макак.

Фигура 9 - данные по конкурентному ELISA (OD450) с Хумира.

Фигура 10 - концентрация анти-TNF ICVD в объединенных фекальных массах яванских макак.

Фигура 11 - расчетное количество анти-TNF ICVD, извлекаемого из объединенных фекальных масс яванских макак.

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1 - Полипептидная последовательность CDR1 из ID38F

SEQ ID NO: 2 - Полипептидная последовательность CDR2 из ID38F

SEQ ID NO: 3 - Полипептидная последовательность CDR3 из ID38F

SEQ ID NO: 4 - Полипептидная последовательность FR1 из ID38F

SEQ ID NO: 5 - Полипептидная последовательность FR2 из ID38F

SEQ ID NO: 6 - Полипептидная последовательность FR3 из ID38F

SEQ ID NO: 7 - Полипептидная последовательность FR4 из ID38F

SEQ ID NO: 8 - Полипептидная последовательность ID38F

SEQ ID NO: 9 - Полипептидная последовательность растворимого TNF-альфа человека (мономер)

SEQ ID NO: 10 - Полипептидная последовательность мембраносвязанного TNF-альфа человека (мономер)

SEQ ID NO: 11 - Полипептидная последовательность растворимого TNF-альфа яванского макака (мономер)

SEQ ID NO: 12 - Полипептидная последовательность

мембраносвязанного TNF-альфа яванского макака (мономер)

SEQ ID NO: 13 - Полипептидная последовательность растворимого мышинного TNF-альфа (мономер)

SEQ ID NO: 14 - Полипептидная последовательность мембраносвязанного мышинного TNF-альфа (мономер)

SEQ ID NO: 15 - Полипептидная последовательность CDR1 из Q62E10

SEQ ID NO: 16 - Полипептидная последовательность CDR2 из Q62E10

SEQ ID NO: 17 - Полипептидная последовательность CDR3 из Q62E10

SEQ ID NO: 18 - Полипептидная последовательность FR1 из Q62E10

SEQ ID NO: 19 - Полипептидная последовательность FR2 из Q62E10

SEQ ID NO: 20 - Полипептидная последовательность FR3 из Q62E10

SEQ ID NO: 21 - Полипептидная последовательность FR4 Q62E10

SEQ ID NO: 22 - Полипептидная последовательность Q62E10

SEQ ID NO: 23 - Полипептидная последовательность Q65F2

SEQ ID NO: 24 - Полипептидная последовательность Q65F3

SEQ ID NO: 25 - Полипептидная последовательность Q62F2

SEQ ID NO: 26 - Полипептидная последовательность Q65G1

SEQ ID NO: 27 - Полипептидная последовательность Q65H6

SEQ ID NO: 28 - Полипептидная последовательность Q65F1

SEQ ID NO: 29 - Полипептидная последовательность Q65D1

SEQ ID NO: 30 - Полипептидная последовательность Q65C7

SEQ ID NO: 31 - Полипептидная последовательность Q65D3

SEQ ID NO: 32 - Полипептидная последовательность Q65B1

SEQ ID NO: 33 - Полипептидная последовательность Q65F6

SEQ ID NO: 34 - Полипептидная последовательность Q65F11

SEQ ID NO: 35 - Полипептидная последовательность Q65E12

SEQ ID NO: 36 - Полипептидная последовательность Q65C12

SEQ ID NO: 37 - Полипептидная последовательность Q65A6

SEQ ID NO: 38 - Полипептидная последовательность Q65A3

SEQ ID NO: 39 - Полипептидная последовательность Q62F10

SEQ ID NO: 40 - Полипептидная последовательность Q62F11

SEQ ID NO: 41 - Полипептидная последовательность D7F-EV

SEQ ID NO: 42 - Полипептидная последовательность D8F-EV

SEQ ID NO: 43 - Полипептидная последовательность D9F-EV

SEQ ID NO: 44 - Полипептидная последовательность D13F-EV

SEQ ID NO: 45 - Полипептидная последовательность D14F-EV

SEQ ID NO: 46 - Полипептидная последовательность D15F-EV

SEQ ID NO: 47 - Полипептидная последовательность D22F

SEQ ID NO: 48 - Полипептидная последовательность D23F

SEQ ID NO: 49 - Полипептидная последовательность D24F

SEQ ID NO: 50 - Полипептидная последовательность D25F

SEQ ID NO: 51 - Полипептидная последовательность D26F

SEQ ID NO: 52 - Полипептидная последовательность D27F

SEQ ID NO: 53 - Полипептидная последовательность D28F

SEQ ID NO: 54 - Полипептидная последовательность D29F

SEQ ID NO: 55 - Полипептидная последовательность Q62E10-DVQLV

SEQ ID NO: 56 - Полипептидная последовательность D34F

SEQ ID NO: 57 - Полипептидная последовательность D37F

SEQ ID NO: 58 - Полинуклеотидная последовательность 3'-праймера с сайтом Spe I

SEQ ID NO: 59 - Полипептидная последовательность CDR1 из Q65F1

SEQ ID NO: 60 - Полипептидная последовательность CDR1 из Q65D1

SEQ ID NO: 61 - Полипептидная последовательность CDR2 из ID27F

SEQ ID NO: 62 - Полипептидная последовательность CDR2 из ID28F

SEQ ID NO: 63 - Полипептидная последовательность CDR2 из Q65F2

SEQ ID NO: 64 - Полипептидная последовательность CDR2 из Q65F3

SEQ ID NO: 65 - Полипептидная последовательность CDR2 из Q62F2

SEQ ID NO: 66 - Полипептидная последовательность CDR2 из

Q65F1

SEQ ID NO: 67 - Полипептидная последовательность CDR2 из Q65D1

SEQ ID NO: 68 - Полипептидная последовательность CDR2 из Q65D3

SEQ ID NO: 69 - Полипептидная последовательность CDR2 из Q65B1

SEQ ID NO: 70 - Полипептидная последовательность CDR3 из Q65F2

SEQ ID NO: 71 - Полипептидная последовательность CDR3 из Q65F1

SEQ ID NO: 72 - Полипептидная последовательность CDR3 из Q65D3

SEQ ID NO: 73 - Полипептидная последовательность CDR2 из Q65F6

SEQ ID NO: 74 - Полипептидная последовательность CDR2 из Q65F11

SEQ ID NO: 75 - Полипептидная последовательность CDR2 из Q65C12

SEQ ID NO: 76 - Полипептидная последовательность CDR2 из Q65A6

SEQ ID NO: 77 - Полипептидная последовательность CDR2 из Q65A3

SEQ ID NO: 78 - Полипептидная последовательность CDR3 из Q65F6

SEQ ID NO: 79 - Полипептидная последовательность CDR3 из Q65F11

SEQ ID NO: 80 - Полипептидная последовательность CDR3 Q62F10

SEQ ID NO: 81 - Полинуклеотидная последовательность M13.rev

SEQ ID NO: 82 - Полинуклеотидная последовательность M13.fw

SEQ ID NO: 83 - Полинуклеотидная кодирующая последовательность ID38F, оптимизированная по кодонам для экспрессии в дрожжах

SEQ ID NO: 84 - Полинуклеотидная кодирующая последовательность Q62E10, оптимизированная по кодонам для

экспрессии в дрожжах

SEQ ID NO: 85 - Полинуклеотидная кодирующая последовательность ID38F, оптимизированная по кодонам для экспрессии в *E. coli*

SEQ ID NO: 86 - Полинуклеотидная кодирующая последовательность Q62E10, оптимизированная по кодонам для экспрессии в *E. coli*

SEQ ID NO: 87 - Полинуклеотид, состоящий из открытой рамки считывания ID38F для экспрессии в *E. coli* (от лидерной последовательности PelB до с-Мус-6His-тег 2х стоп-кодона)

SEQ ID NO: 88 - Полинуклеотид, состоящий из открытой рамки считывания ID38F для экспрессии в *E. coli* (от лидерной последовательности PelB до Flag-6His-тег 2х стоп-кодона)

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Полипептиды, включающие антитела и фрагменты антител, включая VH и VNH

Обычные антитело или иммуноглобулин (Ig) представляют собой белок, состоящий из четырех полипептидных цепей: двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей. Каждая цепь разделена на константную область и переменный домен. Переменные домены тяжелой цепи сокращенно указываются в данном документе как VHC, а переменные домены легкой (L) цепи сокращенно указываются в данном документе как VLC. Эти домены, родственные им домены и полученные из них домены указываются в данном документе как переменные домены иммуноглобулиновых цепей. Домены VHC и VLC могут быть далее разделены на области гиперпеременности, называемые «определяющими комплементарность областями» («CDR»), перемежающиеся областями, которые являются более консервативными и называются «каркасными областями» («FR»). Каркасные и определяющие комплементарность области были точно охарактеризованы (Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication Number 91-3242, включено в данный документ путем ссылки в полном объеме). В обычном антителе каждый VHC и VLC состоят из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбокси-концу в следующем

порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Тетрамер обычного антитела из двух иммуноглобулиновых тяжелых цепей и двух иммуноглобулиновых легких цепей образован тяжелыми и легкими цепями иммуноглобулина, соединенными между собой, например, дисульфидными связями, и связанными между собой гомологичными тяжелыми цепями. Константная область тяжелой цепи включает в себя три домена: CH1, CH2 и CH3. Константная область легкой цепи состоит из одного домена – CL. Вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи являются связывающими доменами, которые взаимодействуют с антигеном. Константные области антител обычно опосредуют связывание антитела с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента. Термин антитело включает иммуноглобулины типов IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (а также их подтипы), у которых легкие цепи иммуноглобулина могут быть каппа или лямбда-типа. Общая структура иммуноглобулин-гамма (IgG) антител, собранных из двух идентичных полипептидов тяжелой (H) цепи и двух идентичных полипептидов легкой (L) цепи, хорошо известна и является высоко консервативной у млекопитающих (Padlan 1994 *Mol Immunol* 31:169–217).

Исключение относительно стандартной структуры антител было найдено в сыворотке крови верблюдовых (*Camelidae*). Кроме обычных антител, эти сыворотки содержат специальные IgG-антитела. Эти IgG-антитела, известные как антитела из тяжелых цепей (HCAb), лишены полипептида L-цепи и не содержат первого константного домена (CH1). В своей N-концевой области H-цепь гомодимерного белка содержит специализированный вариабельный домен иммуноглобулиновой цепи, именуемый VHH, который служит для связывания с его когнатым антигеном (Muyldermans 2013 *Annu Rev Biochem* 82:775–797, Hamers-Casterman et al 1993 *Nature* 363(6428):446–448, Muyldermans et al 1994 *Protein Eng* 7(9):1129–1135, которые включены в данный документ путем ссылки в полном объеме).

Антигенсвязывающий фрагмент (или «фрагмент антитела» или «фрагмент иммуноглобулина») в контексте изобретения относится к

участку антитела, который специфично связывается с TNF-альфа (например, к молекуле, в которой одна или несколько иммуноглобулиновых цепей не являются полноразмерными, но которая специфично связывается с TNF-альфа). Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином антигенсвязывающий фрагмент, включают:

- (i) Fab-фрагмент (моновалентный фрагмент, состоящий из VLC-, VHC-, CL- и CH1-доменов);
- (ii) F(ab')₂-фрагмент (двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области);
- (iii) Fd-фрагмент (состоящий из VHC и CH1-доменов);
- (iv) Fv-фрагмент (состоящий из VLC- и VHC-доменов одного плеча антитела);
- (v) scFv-фрагмент (состоящий из VLC- и VHC-доменов, соединенных с использованием рекомбинантных способов синтетическим линкером, который позволяет получать их в виде единой белковой цепи, в которой VLC- и VHC-области связываются с образованием моновалентных молекул);
- (vi) VH (вариабельный домен иммуноглобулиновой цепи, состоящий из VHC-домена (Ward et al *Nature* 1989 341:544-546);
- (vii) VL (вариабельный домен иммуноглобулиновой цепи, состоящий из VLC-домена);
- (viii) V-NAR (вариабельный домен иммуноглобулиновой цепи, состоящий из VLC-домена из IgNAR хрящевых рыб (*Chondrichthyes*) (Roux et al 1998 *Proc Natl Acad Sci USA* 95:11804-11809 и Griffiths et al 2013 *Antibodies* 2:66-81, которые включены в данный документ путем ссылки в полном объеме);
- (ix) VHH.

Общее число аминокислотных остатков (а.о.) в VHH или VH может составлять 110-130 а.о., предпочтительно, составляет, 112-120 а.о. и наиболее предпочтительно - 115 а.о.

Вариабельные домены иммуноглобулиновых цепей по изобретению могут, например, быть получены путем получения нуклеиновой кислоты, кодирующей вариабельный домен иммуноглобулиновой цепи с использованием методов синтеза нуклеиновых кислот, с последующей

экспрессией полученной таким образом нуклеиновой кислоты. В соответствии с конкретным вариантом осуществления переменный домен иммуноглобулиновой цепи по настоящему изобретению не имеет аминокислотную последовательность, которая является абсолютно одинаковой (т.е. имеет 100%-ю идентичность по последовательности) с аминокислотной последовательностью природного полипептида, такого как VH- или VHH-домены из природного антитела.

Примеры, приведенные в данном описании, относятся к переменным доменам иммуноглобулиновых цепей *per se*, которые связываются с TNF-альфа. Однако принципы настоящего изобретения, раскрытые в данном документе, в равной степени применимы к любому полипептиду, содержащему переменный домен иммуноглобулиновой цепи, который связывается с TNF-альфа, такому как антитела и фрагменты антител. Например, переменные домены анти-TNF-альфа иммуноглобулиновых цепей, описанные в настоящем документе, могут быть включены в полипептид, такой как полноразмерное антитело. Такой подход продемонстрирован в статье McCoy et al *Retrovirology* 2014, 11:83, в которой предложен анти-HIV VHH, сконструированный в виде гибрида с Fc-областью антитела человека (включающей шарнирный, CH2- и CH3-домены) и проэкспрессированный в виде димерной конструкции.

Замена по меньшей мере одного аминокислотного остатка в каркасной области переменного домена иммуноглобулина животного соответствующим остатком из переменного домена антитела человека является гуманизацией. Гуманизация переменной области может привести к снижению иммуногенности у человека.

Соответственно, полипептид по настоящему изобретению состоит из переменного домена иммуноглобулиновой цепи. Соответственно, полипептид по настоящему изобретению представляет собой антитело или фрагмент антитела. Соответственно, фрагмент антитела представляет собой VHH, VH, VL, V-NAR, Fab-фрагмент, VL- или F(ab')₂-фрагмент (например, VHH или VH, наиболее предпочтительно, VHH).

Специфичность, аффинность, авидность и перекрестная реактивность

Специфичность относится к числу различных типов антигенов или антигенных детерминант, с которыми конкретный антигенсвязывающий полипептид может связываться. Специфичность антигенсвязывающего полипептида является способностью антигенсвязывающего полипептида распознавать конкретный антиген в качестве уникальной молекулярной единицы и отличить его от другого антигена.

Аффинность, представленная константой равновесия для диссоциации антигена с антигенсвязывающим полипептидом (K_d), является мерой силы связывания между антигенной детерминантой и антигенсвязывающим сайтом на антигенсвязывающем полипептиде: чем меньше значение K_d , тем сильнее сила связывания между антигенной детерминантой и антигенсвязывающим полипептидом (в качестве альтернативы, аффинность также может быть выражена в виде константы аффинности (K_a), которая представляет собой $1/K_d$). Аффинность может быть определена известными способами в зависимости от конкретного антигена, представляющего интерес.

Авидность является мерой силы связывания между антигенсвязывающим полипептидом и соответствующим антигеном. Авидность связана как с аффинностью между антигенной детерминантой и ее антигенсвязывающим сайтом на антигенсвязывающем полипептиде, так и с числом соответствующих сайтов связывания, присутствующих на антигенсвязывающем полипептиде.

Соответственно, антигенсвязывающие полипептиды по изобретению будут связываться с константой диссоциации (K_d) от 10^{-6} до 10^{-12} М, более предпочтительно, от 10^{-7} до 10^{-12} М, более предпочтительно, от 10^{-8} до 10^{-12} М и, более предпочтительно, от 10^{-9} до 10^{-12} М.

Любое значение K_d ниже 10^{-6} считается указывающим на связывание. Специфичное связывание антигенсвязывающего полипептида с антигеном или антигенной детерминантой может быть определено любым подходящим известным способом, включая, например, анализ Скэтчарда и/или конкурентные анализы связывания, такие как радиоиммуноанализы (RIA), иммуноферментные анализы (EIA) и конкурентные сэндвич-анализы, а также различные

их варианты, известные в данной области техники.

Анти-TNF-альфа полипептид, полипептид, который взаимодействует с TNF-альфа, или полипептид против TNF-альфа, все представляют собой активные полипептиды, которые связываются с TNF-альфа. Полипептид по изобретению может связываться с линейным или конформационным эпитопом на TNF-альфа. Термин «связывается с TNF-альфа» означает связывание с тримером TNF-альфа, связывание с мономером TNF-альфа и/или связывание с участком мономера TNF-альфа.

Соответственно, полипептид по изобретению будет связываться с обоими растворимым и мембранным TNF-альфа. Соответственно, полипептид по изобретению будет связываться с TNF-альфа человека. Более предпочтительно, полипептид по изобретению будет связываться с TNF-альфа как человека, так и по меньшей мере одного примата, выбранного из группы, состоящей из TNF-альфа бабуина, TNF-альфа мартышки, TNF-альфа яванского макака и TNF-альфа макака-резуса. Наиболее предпочтительно, чтобы полипептид по изобретению связывался с TNF-альфа как человека, так и яванского макака.

Соответственно, полипептид по изобретению будет нейтрализовать как растворимый, так и мембранный TNF-альфа. Соответственно, полипептид по изобретению будет нейтрализовать TNF-альфа человека. Более предпочтительно, чтобы полипептид по изобретению нейтрализовал TNF-альфа как человека, так и по меньшей мере одного примата, выбранного из группы, состоящей из TNF-альфа бабуина, TNF-альфа мартышки, TNF-альфа яванского макака и TNF-альфа макака-резуса. Наиболее предпочтительно, чтобы полипептид по изобретению нейтрализовал TNF-альфа как человека, так и яванского макака.

Соответственно, TNF-альфа представляет собой полипептид, содержащий SEQ ID NO: 9, более предпочтительно, TNF-альфа представляет собой полипептид, состоящий из SEQ ID NO: 9. Соответственно, TNF-альфа представляет собой полипептид, содержащий SEQ ID NO: 10, более предпочтительно TNF-альфа представляет собой полипептид, состоящий из SEQ ID NO: 10. Соответственно, TNF-альфа представляет собой полипептид,

содержащий SEQ ID NO: 11, более предпочтительно, TNF-альфа представляет собой полипептид, состоящий из SEQ ID NO: 11. Соответственно, TNF-альфа представляет собой полипептид, содержащий SEQ ID NO: 12, более предпочтительно, TNF-альфа представляет собой полипептид, состоящий из SEQ ID NO: 12.

Полипептиды, способные вступать в реакцию с TNF-альфа человека и TNF-альфа другого вида («перекрестно реагирующие»), например, с TNF-альфа яванского макака, являются предпочтительными, поскольку они позволяют проводить доклинические исследования, которые легче выполнять на животных моделях.

Соответственно, полипептид по изобретению направлен против эпитопов на TNF-альфа (и, в частности, на тримере TNF-альфа), которые находятся в и/или образуют часть участка(ов) связывания рецептора(ов) в тримере TNF-альфа, так что указанный полипептид по изобретению после связывания с тримером TNF-альфа способен ингибировать или уменьшать перекрестную сшивку рецептора TNF-альфа, которая опосредована указанным TNF-альфа тримером, и/или передачу сигнала (сигнальную трансдукцию), которая опосредована такой сшивкой рецептора.

Полипептиды по настоящему изобретению связываются с одним или несколькими эпитопами на тримере TNF-альфа. В одном аспекте настоящего изобретения предложен полипептид, который связывается с тем же эпитопом на тримере TNF-альфа, что и Q65F2, Q65F3, Q62F2, Q65G1, Q65H6, Q65F1, Q65D1, Q65C7, Q65D3, Q65B1, Q65F6, Q65F11, Q65E12, Q65C12, Q65A6, Q65A3, Q62E10, Q62F10, ID7F-EV, ID8F-EV, ID9F-EV, ID13F-EV, ID14F-EV, ID15F-EV, ID22F, ID23F, ID24F, ID25F, ID26F, ID27F, ID28F, ID29F, ID34F, ID37F или ID38F.

Соответственно, полипептид по изобретению является выделенным. «Выделенный» полипептид представляет собой полипептид, который отделен от своего исходного окружения. Например, природный полипептид по изобретению является выделенным, если он отделен от некоторых или всех сосуществующих с ним веществ в природной системе.

Сила действия, ингибирование и нейтрализация

Сила действия представляет собой меру активности терапевтического агента, выражаемую в количестве, необходимом для получения эффекта заданной интенсивности. Сильнодействующий агент вызывает большую реакцию при низких концентрациях по сравнению с агентом с более низкой активностью, который вызывает меньшую реакцию при низких концентрациях. Сила действия зависит от аффинности и эффективности. Эффективность относится к способности терапевтического агента продуцировать биологический ответ после связывания с лигандом-мишенью и к количественной величине этого ответа. Термин половинная максимальная эффективная концентрация (EC50) относится к концентрации терапевтического агента, которая обеспечивает половинный ответ между базовой линией и максимумом после заданного времени воздействия. Терапевтический агент может являться ингибирующим или стимулирующим. Термин половинная максимальная эффективная концентрация широко используется, и в настоящем описании используется в качестве меры силы действия.

Нейтрализующий полипептид в контексте настоящего изобретения представляет собой полипептид, который связывается с TNF-альфа, ингибируя связывание TNF-альфа с одним или обоими его когнатными рецепторами (например, TNFR1, TNFR2), что измеряется с помощью ELISA. В качестве альтернативного или дополнительного варианта, нейтрализующий полипептид в контексте настоящего изобретения представляет собой полипептид, который защищает клетки от воздействия TNF-альфа, например, ингибируя биологическую активность TNF-альфа. Обычно, для анти-TNF-альфа терапевтических антител использовали мышиную клеточную линию L929 с клеточной гибелью в качестве конечной точки анализа нейтрализации (Humphreys and Wilson 1999 *Cytokine* 11(10):773-782). Для этих целей способы, в которых используется мышинная клеточная линия L929, включают в себя следующие способы:

Анализ на L929 с фиксированной концентрацией - анализ на L929 с фиксированной концентрацией может быть использован для относительно быстрого определения способности фиксированной концентрации полипептида, например, содержащегося в периплазматическом экстракте, нейтрализовать цитотоксические

эффекты TNF-альфа (анализ подробно описано в части 2.2.3 раздела примеров).

Стандартный анализ на L929 - с использованием известных концентраций анти-TNF-альфа полипептида может быть выполнен стандартный анализ на L929 (как подробно описано в части 3.2 3.2.3 раздела примеров), чтобы проанализировать способность анти-TNF-альфа полипептида нейтрализовать цитотоксические эффекты TNF-альфа путем определения половинной максимальной эффективной концентрации (EC50) для анти-TNF-альфа полипептида.

Соответственно, полипептид или конструкция по настоящему изобретению нейтрализуют цитотоксичность TNF-альфа человека в стандартном анализе на L929 с EC50 1 нМ или ниже, такой как 0,9 нМ или ниже, такой как 0,8 нМ или ниже, такой как 0,7 нМ или ниже, такой как 0,6 нМ или ниже, такой как 0,5 нМ или ниже, такой как 0,4 нМ или ниже, такой как 0,3 нМ или ниже, такой как 0,2 нМ или ниже, такой как 0,1 нМ или ниже, такой как 0,09 нМ или ниже, такой как 0,08 нМ или ниже, такой как 0,07 нМ или ниже, такой как 0,06 нМ или ниже, такой как 0,05 нМ или ниже, такой как 0,04 нМ или ниже.

Соответственно, полипептид или конструкция по настоящему изобретению нейтрализуют цитотоксичность TNF-альфа яванского макака в стандартном анализе на L929 с EC50 1 нМ или ниже, такой как 0,9 нМ или ниже, такой как 0,8 нМ или ниже, такой как 0,7 нМ или ниже, такой как 0,6 нМ или ниже, такой как 0,5 нМ или ниже, такой как 0,4 нМ или ниже, такой как 0,3 нМ или ниже, такой как 0,2 нМ или ниже, такой как 0,1 нМ или ниже, такой как 0,09 нМ или ниже, такой как 0,08 нМ или ниже, такой как 0,07 нМ или ниже, такой как 0,06 нМ или ниже, такой как 0,05 нМ или ниже, такой как 0,04 нМ или ниже, такой как 0,03 нМ или ниже, такой как 0,02 нМ или ниже, такой как 0,01 нМ или ниже.

Соответственно, полипептид по изобретению ингибирует связывание TNF-альфа человека с TNFR2 в анализе ELISA с EC50, составляющей 30 нМ или ниже, более предпочтительно, 10 нМ или ниже, более предпочтительно, 3 нМ или ниже, более предпочтительно, 1 нМ или ниже, более предпочтительно, 0,6 нМ или ниже, более предпочтительно, 0,5 нМ или ниже, более

предпочтительно, 0,4 нМ или ниже, более предпочтительно, 0,3 нМ или ниже.

Соответственно, полипептид по изобретению ингибирует связывание TNF-альфа яванского макака с TNFR2 в анализе ELISA с EC50, составляющей 110 нМ или ниже, более предпочтительно, 30 нМ или ниже, более предпочтительно, 10 нМ или ниже, более предпочтительно, 3 нМ или ниже, более предпочтительно, 1 нМ или ниже, более предпочтительно, 0,6 нМ или ниже, более предпочтительно, 0,5 нМ или ниже, более предпочтительно, 0,4 нМ или ниже, более предпочтительно, 0,3 нМ или ниже.

Соответственно, полипептид по изобретению ингибирует связывание TNF-альфа человека с TNFR1 в анализе ELISA с EC50, составляющей 2 нМ или ниже, более предпочтительно, 1 нМ или ниже, более предпочтительно, 0,9 нМ или ниже, более предпочтительно, 0,8 нМ или ниже, более предпочтительно, 0,7 нМ или ниже, более предпочтительно, 0,6 нМ или ниже, более предпочтительно, 0,5 нМ или ниже, более предпочтительно, 0,4 нМ или ниже, более предпочтительно, 0,3 нМ или ниже.

Соответственно, полипептид по изобретению ингибирует индуцируемую растворимым TNF-альфа человека активацию репортерных клеток HEK-293-NF-kappa-B-SEAP с EC50 3 нМ или ниже, предпочтительно, 2 нМ или ниже, предпочтительно, 1 нМ или ниже, предпочтительно, 0,5 нМ или ниже, предпочтительно, 0,4 нМ или ниже, предпочтительно, 0,3 нМ или ниже, предпочтительно, 0,2 нМ или ниже, предпочтительно, 0,1 нМ или ниже, предпочтительно, 0,08 нМ или ниже.

Соответственно, полипептид по изобретению ингибирует индуцируемую мембранным TNF-альфа человека активацию репортерных клеток HEK-293-NF-kappa-B-SEAP с EC50 300 нМ или ниже, предпочтительно, 150 нМ или ниже, предпочтительно, 100 нМ или ниже, предпочтительно, 80 нМ или ниже, предпочтительно, 40 нМ или ниже, предпочтительно, 30 нМ или ниже, предпочтительно, 25 нМ или ниже, предпочтительно, 20 нМ или ниже, предпочтительно, 15 нМ или ниже.

Полипептидные и полинуклеотидные последовательности

Для сравнения двух близкородственных полипептидных

последовательностей «% идентичности последовательностей» между первой полипептидной последовательностью и второй полипептидной последовательностью может быть вычислен с помощью NCBI BLAST v2.0 с использованием стандартных параметров для полипептидных последовательностей (BLASTP). Для сравнения двух близкородственных полинуклеотидных последовательностей «% идентичности последовательностей» между первой нуклеотидной последовательностью и второй нуклеотидной последовательностью может быть вычислен с помощью NCBI BLAST v2.0 с использованием стандартных параметров для нуклеотидных последовательностей (BLASTN).

Полипептидные или полинуклеотидные последовательности считают одинаковыми или идентичными другим полипептидным или полинуклеотидным последовательностям, если они имеют 100%-ю идентичность последовательностей по всей их длине. Остатки в последовательностях нумеруются слева направо, то есть от N- к C-концу для полипептидов и от 5'- к 3'-концу для полинуклеотидов.

«Отличие» между последовательностями относится к вставке, делеции или замещению одного аминокислотного остатка во второй последовательности по сравнению с первой последовательностью. Две полипептидные последовательности могут содержать одно, два или большее число таких аминокислотных отличий. Вставки, делеции или замены в второй последовательности, которая в остальном является идентичной (100%-я идентичность последовательностей) первой последовательности приводит к снижению % идентичности последовательностей. Например, если идентичные последовательности имеют длину 9 аминокислотных остатков, одна замена во второй последовательности приводит к идентичности последовательностей 88,9%. Если идентичные последовательности имеют 17 аминокислотных остатков в длину, две замены в второй последовательности дают идентичность последовательностей, составляющую 88,2%. Если идентичные последовательности имеют 7 аминокислотных остатки в длину, то три замены в второй последовательности приводят к идентичности последовательностей 57,1%. Если первая и вторая полипептидные последовательности имеют 9 аминокислотных остатков в длину и имеют 6 идентичных

остатков, то первая и вторая полипептидные последовательности имеют более 66% идентичности (первая и вторая полипептидные последовательности имеют 66,7%-ю идентичность). Если первая и вторая полипептидные последовательности имеют 17 аминокислотных остатков в длину и имеют 16 идентичных остатков, то первая и вторая полипептидные последовательности имеют более 94% идентичности (первая и вторая полипептидные последовательности имеют 94,1%-ю идентичность). Если первая и вторая полипептидные последовательности имеют 7 аминокислотных остатков в длину и имеют 3 идентичных остатка, то первая и вторая полипептидные последовательности имеют более 42% идентичности (первая и вторая полипептидные последовательности имеют 42,9%-ю идентичность).

В альтернативном варианте для сравнения первой эталонной полипептидной последовательности со второй «сравниваемой» полипептидной последовательностью может быть определено количество добавлений, замен и/или делеций, выполненных в первой последовательности для получения второй последовательности. «Добавление» представляет собой добавление одного аминокислотного остатка в последовательность первого полипептида (включая добавление на обоих концах первого полипептида). «Замена» представляет собой замену одного аминокислотного остатка в последовательности первого полипептида другим аминокислотным остатком. «Делеция» представляет собой удаление одного аминокислотного остатка из последовательности первого полипептида (включая удаление на обоих концах первого полипептида).

Для сравнения первой эталонной полинуклеотидной последовательности со второй «сравниваемой» полинуклеотидной последовательностью может быть определено количество добавлений, замен и/или делеций, выполненных в первой последовательности для получения второй последовательности. «Добавление» представляет собой добавление одного нуклеотидного остатка в последовательности первого полинуклеотида (включая добавление на обоих концах первого полинуклеотида). «Замена» представляет собой замену одного нуклеотидного остатка в последовательности первого полинуклеотида другим нуклеотидным остатком. «Делеция»

представляет собой удаление одного нуклеотидного остатка из последовательности первого полинуклеотида (включая удаление на обоих концах первого полинуклеотида).

«Консервативная» аминокислотная замена представляет собой аминокислотную замену, в которой аминокислотный остаток заменен другим аминокислотным остатком с аналогичной химической структурой, и которая, как ожидается, будет оказывать незначительное влияние на функции, активность или другие биологические свойства полипептида. Такими консервативными заменами, предпочтительно, являются замены, в которых одна аминокислота в пределах указанных ниже групп замещена другим аминокислотным остатком из той же группы:

Группа	Аминокислотный остаток
Неполярные алифатические	Глицин
	Аланин
	Валин
	Лейцин
	Изолейцин
Ароматические	Фенилаланин
	Тирозин
	Триптофан
Полярные незаряженные	Серин
	Треонин
	Аспарагин
	Глутамин
Отрицательно заряженные	Аспартат
	Глутамат
Положительно заряженные	Лизин
	Аргинин

Соответственно, гидрофобный аминокислотный остаток представляет собой неполярную аминокислоту. Более предпочтительно, чтобы гидрофобный аминокислотный остаток выбирали из V, I, L, M, F, W или C.

Используемая в настоящем документе нумерация полипептидных последовательностей и границы CDR и FR соответствует системе

Кабата (Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication Number 91-3242, которая включена в данное описание путем ссылки в полном объеме). «Соответствующий» аминокислотный остаток между первой и второй полипептидной последовательностью представляет собой аминокислотный остаток в первой последовательности, который имеет одинаковую позицию по системе Кабата с аминокислотным остатком во второй последовательности, хотя аминокислотный остаток во второй последовательности может отличаться от остатка в первой последовательности. Соответственно, соответствующие остатки будут иметь одинаковый номер (и букву), если каркасные области и CDR имеют одинаковую длину по Кабату. Выравнивание может быть осуществлено вручную или с помощью, например, известного компьютерного алгоритма для выравнивания последовательностей, такого как NCBI BLAST v2.0 (BLASTP или BLASTN) с использованием стандартных параметров.

Соответственно, полинуклеотиды, используемые в настоящем изобретении, являются выделенными. «Выделенный» полинуклеотид представляет собой полинуклеотид, который отделен от своего исходного окружения. Например, природный полинуклеотид является выделенным, если он отделен от некоторых или всех сосуществующих с ним веществ в природной системе. Полинуклеотид считается выделенным, если, например, он клонирован в вектор, который не является частью его природного окружения, или если он содержится в кДНК.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен полинуклеотид, кодирующий полипептид, или конструкция по настоящему изобретению. Соответственно, полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, имеющей 70% или больший процент, например, 80% или больший процент, например, 90% или больший процент, например, 95% или больший процент, например, 99% или больший процент идентичности по последовательности с любой из SEQ ID NO: 83-88. Более предпочтительно, чтобы полинуклеотид содержал или состоял из какой-либо одной из SEQ ID NO: 83-88. В дополнительном аспекте предложена кДНК, содержащая

указанный полинуклеотид.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен полинуклеотид, содержащий или состоящий из последовательности, имеющей 70% или больший процент, например, 80% или больший процент, например, 90% или больший процент, например, 95% или больший процент, например, 99% или больший процент идентичности по последовательности с любым одним из участков любой одной из SEQ ID NO: 83-86, который кодирует CDR1, CDR2 или CDR3 кодируемого переменного домена иммуноглобулиновой цепи.

Соответственно, полипептидная последовательность по настоящему изобретению содержит по меньшей мере одно изменение относительно нативной последовательности. Соответственно, полинуклеотидные последовательности по настоящему изобретению содержат по меньшей мере одно изменение относительно нативной последовательности. Соответственно, изменение в полипептидной последовательности или полинуклеотидной последовательности производится для повышения стабильности полипептида или кодируемого полипептида к протеазам, присутствующим в желудочно-кишечном тракте (например, трипсину и химотрипсину).

Система нумерации Кабата в приложении к отобранным последовательностям переменных доменов иммуноглобулиновых цепей

Область	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1
№ остатка	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Q62E10	Q	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S
Q65B1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	K	L	S
И38F	D	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	K	L	S
TNF1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S
Нумерация по Кабату	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21

Область	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1
№ остатка	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Q62E10	Q	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S
Q65B1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	K	L	S
И38F	D	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	K	L	S
TNF-1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S
Нумерация по Кабату	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17	H18	H19	H20	H21

Область	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	FR1	CDR1	CDR1	CDR1	CDR1	CDR1	FR2	FR2	FR2	FR2	FR2	FR2	FR2
№ остатка	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
Q62E10	C	T	T	S	G	L	D	F	G	I	H	W	M	Y	W	F	R	Q	A	P	G
Q65B1	C	A	A	S	G	F	D	F	S	S	H	W	M	Y	W	V	R	Q	A	P	G
И38F	C	A	A	S	G	F	D	F	S	S	H	W	M	Y	W	V	R	Q	A	P	G
TNF-1	C	A	A	S	G	F	T	F	S	D	Y	W	M	Y	W	V	R	Q	A	P	G
Нумерация по Кабату	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29	H30	H31	H32	H33	H34	H35	H36	H37	H38	H39	H40	H41	H42

Область	FR2	FR2	FR2	FR2	FR2	FR2	FR2	CDR2	CDR2	CDR2	CDR2	CDR2	CDR2	CDR2	CDR2	CDR2	CDR2	CDR2	CDR2	CDR2	CDR2
№ остатка	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63
Q62E10	K	E	L	E	W	V	A	E	I	N	T	N	A	L	I	T	K	Y	A	D	S
Q65B1	K	E	L	E	W	L	S	E	I	N	T	N	G	L	I	T	K	Y	G	D	S
ID38F	K	E	L	E	W	L	S	E	I	N	T	N	G	L	I	T	H	Y	G	D	S
TNF1	K	G	L	E	W	V	S	E	I	N	T	N	G	L	I	T	K	Y	P	D	S
Нумерация по Кабату	H43	H44	H45	H46	H47	H48	H49	H50	H51	H52	H52A	H53	H54	H55	H56	H57	H58	H59	H60	H61	H62

Область	CDR2	CDR2	CDR2	FR3	FR3	FR3	FR3	FR3	FR3	FR3	FR3	FR3	FR3	FR3	FR3	FR3	FR3	FR3	FR3	FR3	FR3
№ остатка	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
Q62E10	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	F	L	Q	M	N
Q65B1	V	K	G	R	F	T	V	S	R	N	N	A	A	N	K	M	Y	L	E	L	T
ID38F	V	K	G	R	F	T	V	S	R	N	N	A	A	N	K	M	Y	L	E	L	T
TNF1	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N
Нумерация по Кабату	H63	H64	H65	H66	H67	H68	H69	H70	H71	H72	H73	H74	H75	H76	H77	H78	H79	H80	H81	H82	H82A

Область	FR3	FR3	FR3	FR3	FR3	FR3	FR3	FR3	FR3	FR3	FR3	FR3	FR3	FR3	FR3	CDR3	CDR3	CDR3	CDR3	CDR3	CDR3	FR4
№ остатка	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	
Q62E10	D	L	K	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	S	N	T	Q	N	G	A	A	K	
Q65B1	R	L	E	P	E	D	T	A	L	Y	Y	C	A	R	N	Q	K	G	L	N	K	
ID38F	R	L	E	P	E	D	T	A	L	Y	Y	C	A	R	N	Q	H	G	L	N	K	
TNF1	S	L	K	P	E	D	T	A	L	Y	Y	C	A	R	S	P	S	G	F	N	R	
Нумерация по Кабату	H82B	H82C	H83	H84	H85	H86	H87	H88	H89	H90	H91	H92	H93	H94	H95	H96	H97	H98	H101	H102	H103	

Область	FR4	FR4	FR4	FR4	FR4	FR4	FR4	FR4	FR4	FR4
№ остатка	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115
Q62E10	G	Q	G	V	Q	V	T	V	S	S
Q65B1	G	Q	G	T	Q	V	T	V	S	S
ID38F	G	Q	G	T	Q	V	T	V	S	S
TNF1	G	Q	G	T	Q	V	T	V	S	S
Нумерация по Кабату	H104	H105	H106	H107	H108	H109	H110	H111	H112	H113

Последовательности, принадлежащие к семейству 1

Соответственно, CDR1 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей 80% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 1.

В качестве альтернативы, CDR1 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 2, более предпочтительно, не более 1 добавления по сравнению с SEQ ID NO: 1. Соответственно, CDR1 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 2, более предпочтительно, не более 1 замены по сравнению с SEQ ID NO: 1. Соответственно, CDR1 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 2, более предпочтительно, не более 1 делеции по сравнению с SEQ ID NO: 1.

Предпочтительно, чтобы любые остатки в CDR1, отличающиеся

от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 1, являлись консервативными заменами относительно соответствующих им остатков. Предпочтительно, чтобы CDR1 содержала или, более предпочтительно, состояла из SEQ ID NO: 1. Предпочтительно, чтобы последовательность CDR1 являлась SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 60.

Предпочтительно, чтобы CDR2 полипептида по настоящему изобретению содержала или, более предпочтительно, состояла из последовательности, имеющей 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 2.

В качестве альтернативы, CDR2 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 8, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 добавления по сравнению с SEQ ID NO: 2. Соответственно, CDR2 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 8, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 замены по сравнению с SEQ ID NO: 2. Соответственно, CDR2 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 8, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 делеции по сравнению с SEQ ID NO: 2.

Соответственно любые остатки в CDR2, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 2, представляют собой консервативные замены относительно соответствующих им остатков.

Соответственно, остаток CDR2, соответствующий остатку номер 10 из SEQ ID NO: 2, представляет собой R, H, D, E, N, Q, S, T, Y, G, A, V, L, W, P, M, C, F или I (наиболее предпочтительно, H). Соответственно, CDR2 содержит или, более предпочтительно, состоит из SEQ ID NO: 2. Соответственно, последовательностью CDR2 является SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69.

Соответственно CDR3 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей 80% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 3.

В качестве альтернативы, CDR3-полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 добавления по сравнению с SEQ ID NO: 3. Соответственно, CDR3 полипептида по настоящему изобретению содержит, или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 замены по сравнению с SEQ ID NO: 3. Соответственно, CDR3 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 делеции по сравнению с SEQ ID NO: 3. Предпочтительно, чтобы любые замены являлись консервативными относительно соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 3.

Соответственно, любые остатки в CDR3, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 3, представляют собой консервативные замены относительно соответствующих им остатков. Соответственно, остаток в CDR3, соответствующий остатку номер 3 в SEQ ID NO: 3, представляет собой R, H, D, E, N, Q, S, T, Y, G, A, V, L, W, P, M, C, F или I; или, предпочтительно, R, H, D, E, N, Q, S, T, Y, G, V, L, W, P, M, C, F или I (наиболее предпочтительно, H). Соответственно, остаток в CDR3, соответствующий остатку номер 3 в SEQ ID NO: 3, представляет

собой Н, а любые другие остатки в CDR3, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 3, являются консервативными заменами относительно соответствующих им остатков. Соответственно, CDR3 содержит или, более предпочтительно, состоит из SEQ ID NO: 3.

В качестве альтернативы CDR3 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей 50%, например, 60%, например, 80% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 3, и где остаток номер 3 в SEQ ID NO: 3 представляет собой R, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y или V (предпочтительно, Н или консервативную замещену Н; более предпочтительно, Н). В качестве альтернативы, остаток номер 3 в SEQ ID NO: 3 представляет собой Н или консервативную замену Н (наиболее предпочтительно, Н), а любые другие остатки CDR3, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 3, являются консервативными заменами. Соответственно, последовательность CDR3 является SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 или SEQ ID NO: 72.

Соответственно остаток 1 из CDR1 является S, V или N; остатки 2-4 представляют собой HWM, а остаток 5 представляет собой Y или C. Соответственно, остатки 1-9 из CDR2 представляют собой EINTNGLIT; остаток 10 представляет собой H, K, S или N; остаток 11 представляет собой Y; остаток 12 представляет собой G, V, I или A; остаток 13 является D; остаток 14 представляет собой S или F; остаток 15 представляет собой V или T; остаток 16 представляет собой H, K, R или G; а остаток 17 является G. Соответственно, остаток 1 из CDR3 является N; остаток 2 является Q или E; остаток 3 представляет собой H, K, M или R, а остатки 4-6 представляют собой GLN.

Некоторые особенно предпочтительные последовательности CDR представлены в таблице ниже. Соответственно, CDR1 полипептида по изобретению является одной из последовательностей CDR1, перечисленных ниже. Соответственно, CDR2 полипептида по изобретению является одной из последовательностей CDR2, перечисленных ниже. Соответственно, CDR3-полипептида по

изобретению является одной из последовательностей CDR3, перечисленных ниже. Соответственно, полипептид по настоящему изобретению содержит комбинацию из двух или, более предпочтительно, трех последовательностей CDR, перечисленных ниже.

Отдельные CDR из семейства 1 полипептида по изобретению:

<u>CDR1</u>	<u>CDR2</u>	<u>CDR3</u>
SHWMY (SEQ ID NO: 1)	EINTNGLITHYGDSVHG (SEQ ID NO: 61)	NQHGLN (SEQ ID NO: 3)
VHWMY (SEQ ID NO: 59)	EINTNGLITKYGDSVHG (SEQ ID NO: 62)	NQKGLN (SEQ ID NO: 70)
NHWMC (SEQ ID NO: 60)	EINTNGLITHYGDSVKG (SEQ ID NO: 2)	NQMGLN (SEQ ID NO: 71)
	EINTNGLITSYVDSVKG (SEQ ID NO: 63)	NERGLN (SEQ ID NO: 72)
	EINTNGLITKYIDSVRG (SEQ ID NO: 64)	
	EINTNGLITNYVDSVKG (SEQ ID NO: 65)	
	EINTNGLITKYIDSVGG (SEQ ID NO: 66)	
	EINTNGLITKYADSVKG (SEQ ID NO: 67)	
	EINTNGLITKYADSTKG (SEQ ID NO: 68)	
	EINTNGLITKYGDSVKG (SEQ ID NO: 69)	

Процент идентичности CDR из ID38F с другими представителями семейства 1, TNF1 и Q62F11

Название	CDR 1	CDR 2	CDR 3
Q65B1	100	94,1	83,3
Q65F2	100	88,2	83,3
Q65F3	100	82,4	83,3
Q62F2	100	88,2	83,3
Q65G1	100	82,4	83,3

Q65H6	100	82,4	83,3
Q65F1	80	82,4	83,3
Q65D1	60	82,4	83,3
Q65D3	100	82,4	66,7
Q65C7	100	82,4	83,3
TNF1	60	88,2	33,3
Q62F11	20	52,9	13,3

Соответственно FR1 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей 5%, 12%, 18%, 26%, 32%, 38%, 46%, 52%, 58%, 62%, 66%, 68%, 72%, 75%, 78%, 82%, 85%, 90%, 95% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 4.

В качестве альтернативы, FR1 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 28, более предпочтительно, не более 26, более предпочтительно, не более 24, более предпочтительно, не более 22, более предпочтительно, не более 20, более предпочтительно, не более 18, более предпочтительно, не более 16, более предпочтительно, не более 14, более предпочтительно, не более 13, более предпочтительно, не более 12, более предпочтительно, не более 11, более предпочтительно, не более 10, более предпочтительно, не более 9, более предпочтительно, не более 8, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 добавления по сравнению с SEQ ID NO: 4. Соответственно, FR1 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 28, более предпочтительно, не более 26, более предпочтительно, не более 24, более предпочтительно, не более 22, более предпочтительно, не более 20, более предпочтительно, не более 18, более предпочтительно, не более 16, более предпочтительно, не более 14, более

предпочтительно, не более 13, более предпочтительно, не более 12, более предпочтительно, не более 11, более предпочтительно, не более 10, более предпочтительно, не более 9, более предпочтительно, не более 8, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 замены по сравнению с SEQ ID NO: 4. Соответственно, FR1 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 28, более предпочтительно, не более 26, более предпочтительно, не более 24, более предпочтительно, не более 22, более предпочтительно, не более 20, более предпочтительно, не более 18, более предпочтительно, не более 16, более предпочтительно, не более 14, более предпочтительно, не более 13, более предпочтительно, не более 12, более предпочтительно, не более 11, более предпочтительно, не более 10, более предпочтительно, не более 9, более предпочтительно, не более 8, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 делеции по сравнению с SEQ ID NO: 4.

Соответственно, любые остатки в FR1, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 4, представляют собой консервативные замены относительно соответствующих им остатков. Соответственно, остаток в FR1, соответствующий остатку номер 1 из SEQ ID NO: 4, представляет собой G, A, V, L, I, F, P, S, T, Y, C, M, K, R, H, W, D, E или N (более предпочтительно, D или E, наиболее предпочтительно, D). Соответственно, остаток в FR1, соответствующий остатку номер 5 из SEQ ID NO: 4, представляет собой G, A, V, L, I, F, P, S, T, Y, C, M, K, R, H, W, D, E или N (предпочтительно, V). Соответственно, остатки в FR1, соответствующие остаткам с номерами 1-5 из SEQ ID NO: 4, являются DVQLV. Соответственно, остаток FR1, соответствующий

остаткам с номерами 20 и/или 24 из SEQ ID NO: 4, представляет собой аминокислоту, которая является гидрофобной (наиболее предпочтительно, L или A, соответственно). Соответственно, остаток в FR1, соответствующий остатку номер 29 из SEQ ID NO: 4, представляет собой F. Соответственно, FR1 содержит или, более предпочтительно, состоит из SEQ ID NO: 4.

Соответственно, FR2 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей 10%, 15%, 25%, 30%, 40%, 45%, 55%, 60%, 70%, 75%, 85%, 90% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 5.

В качестве альтернативы, FR2 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 13, более предпочтительно, не более 12, более предпочтительно, не более 11, более предпочтительно, не более 10, более предпочтительно, не более 9, более предпочтительно, не более 8, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 добавления по сравнению с SEQ ID NO: 5. Соответственно, FR2 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 13, более предпочтительно, не более 12, более предпочтительно, не более 11, более предпочтительно, не более 10, более предпочтительно, не более 9, более предпочтительно, не более 8, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 замены по сравнению с SEQ ID NO: 5. Соответственно, FR2 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 13, более предпочтительно, не более 12, более предпочтительно, не более 11, более предпочтительно, не более 10, более

предпочтительно, не более 9, более предпочтительно, не более 8, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 делеции по сравнению с SEQ ID NO: 5.

Соответственно любые остатки в FR2, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 5, представляют собой консервативные замены относительно соответствующих им остатков. Соответственно, остатки в FR2, соответствующие остатку с номерами 8-11 в SEQ ID NO: 5, представляют собой KEXE, где X представляет собой R или L. В альтернативном варианте остатки в FR2, соответствующие остаткам с номерами 9-12 в SEQ ID NO: 5, являются GLEW. Соответственно, FR2 содержит или, более предпочтительно, состоит из SEQ ID NO: 5.

Соответственно, FR3 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей 8%, 15%, 20%, 26%, 32%, 40%, 45%, 52%, 58%, 65%, 70%, 76%, 80%, 82%, 85%, 90%, 92%, 95% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 6.

В качестве альтернативы, FR3 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 29, более предпочтительно, не более 27, более предпочтительно, не более 25, более предпочтительно, не более 23, более предпочтительно, не более 21, более предпочтительно, не более 19, более предпочтительно, не более 17, более предпочтительно, не более 15, более предпочтительно, не более 13, более предпочтительно, не более 11, более предпочтительно, не более 9, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 добавления по сравнению с SEQ ID NO: 6. Соответственно, FR3 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно,

состоит из последовательности, имеющей не более 29, более предпочтительно, не более 27, более предпочтительно, не более 25, более предпочтительно, не более 23, более предпочтительно, не более 21, более предпочтительно, не более 19, более предпочтительно, не более 17, более предпочтительно, не более 15, более предпочтительно, не более 13, более предпочтительно, не более 11, более предпочтительно, не более 9, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 замены по сравнению с SEQ ID NO: 6. Соответственно, FR3 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 29, более предпочтительно, не более 27, более предпочтительно, не более 25, более предпочтительно, не более 23, более предпочтительно, не более 21, более предпочтительно, не более 19, более предпочтительно, не более 17, более предпочтительно, не более 15, более предпочтительно, не более 13, более предпочтительно, не более 11, более предпочтительно, не более 9, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 делеции по сравнению с SEQ ID NO: 6.

Соответственно остаток в FR3, соответствующий остатку номер 26 из SEQ ID NO: 6, представляет собой аминокислоту, которая является гидрофобной (предпочтительно, A). Соответственно, любые остатки в FR3, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 6, представляют собой консервативные замены относительно соответствующих им остатков. Соответственно, FR3 содержит или, более предпочтительно, состоит из SEQ ID NO: 6.

Соответственно. FR4 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или больший процент идентичности по

последовательности с SEQ ID NO: 7.

В качестве альтернативы, FR4 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 10, более предпочтительно, не более 9, более предпочтительно, не более 8, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 добавления по сравнению с SEQ ID NO: 7. Соответственно, FR4 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 10, более предпочтительно, не более 9, более предпочтительно, не более 8, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 замены по сравнению с SEQ ID NO: 7. Соответственно, FR4 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 10, более предпочтительно, не более 9, более предпочтительно, не более 8, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 делеции по сравнению с SEQ ID NO: 7.

Соответственно, любые остатки в FR4, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 7, представляют собой консервативные замены относительно соответствующих им остатков. Соответственно, FR4 содержит или, более предпочтительно, состоит из SEQ ID NO: 7.

Соответственно, полипептид по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больший процент

идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 8.

В качестве альтернативы, полипептид по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 20, более предпочтительно, не более 15, более предпочтительно, не более 10, более предпочтительно, не более 9, более предпочтительно, не более 8, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 добавления по сравнению с SEQ ID NO: 8. Соответственно, полипептид по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 20, более предпочтительно, не более 15, более предпочтительно, не более 10, более предпочтительно, не более чем 9, более предпочтительно, не более 8, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 замены по сравнению с SEQ ID NO: 8. Соответственно, полипептид по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 20, более предпочтительно, не более 15, более предпочтительно, не более 10, более предпочтительно, не более 9, более предпочтительно, не более 8, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 делеции по сравнению с SEQ ID NO: 8.

Соответственно, N-концом полипептида является D. Соответственно, полипептид содержит или, более предпочтительно, состоит из SEQ ID NO: 8.

Последовательности, принадлежащие к семейству 2

Соответственно, CDR1 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из

последовательности, имеющей 80% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 15.

В качестве альтернативы, CDR1 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 2, более предпочтительно, не более 1 добавления по сравнению с SEQ ID NO: 15. Соответственно, CDR1 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 2, более предпочтительно, не более 1 замены по сравнению с SEQ ID NO: 15. Соответственно, CDR1 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 2, более предпочтительно, не более 1 делеции по сравнению с SEQ ID NO: 15.

Соответственно, любые остатки CDR1, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 15, являются консервативными заменами относительно соответствующих им остатков. Соответственно, CDR1 содержит или, более предпочтительно, состоит из SEQ ID NO: 15.

Соответственно, CDR2 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 16.

В качестве альтернативы, CDR2 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 8, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 добавления по сравнению с SEQ ID NO: 16. В качестве альтернативы, CDR2 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 8, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более

предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 замены по сравнению с SEQ ID NO: 16. В качестве альтернативы, CDR2 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 8, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 делеции по сравнению с SEQ ID NO: 16.

Соответственно, остаток в CDR2, соответствующий остатку с номером 10 и/или 16 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R, H, D, E, N, Q, S, T, Y, G, A, V, L, W, P, M, C, F или I (более предпочтительно, H). Соответственно, любые остатки в CDR2, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 16, представляют собой консервативные замены относительно соответствующих им остатков. Соответственно, CDR2 содержит или, более предпочтительно, состоит из SEQ ID NO: 16. Соответственно, последовательность CDR2 является SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77 или SEQ ID NO: 16.

Соответственно, CDR3 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей 60% или больший процент идентичности по последовательности, например, 80% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 17.

В качестве альтернативы, CDR3 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 добавления по сравнению с SEQ ID NO: 17. Соответственно, CDR3 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 замены по сравнению с SEQ ID NO: 17. Соответственно, CDR3 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более

предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 делеции по сравнению с SEQ ID NO: 17.

Соответственно, любые остатки в CDR3, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 17, представляют собой консервативные замены относительно соответствующих им остатков. Соответственно, последовательность CDR3 является SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 80. Соответственно, CDR3 содержит или, более предпочтительно, состоит из SEQ ID NO: 17.

Соответственно, остатки 1-5 из CDR1 являются IHWMY. Соответственно остатки 1-9 из CDR2 являются EINTNGLIT; остаток 10 представляет собой L, T, H, K или V; остаток 11 представляет собой Y; остаток 12 представляет собой S, A, T или P; остатки 13-15 являются DSV; остаток 16 представляет собой R, K или S; и остаток 17 представляет собой G. Соответственно, остаток 1 из CDR3 представляет собой S, A или T; остаток 2 представляет собой R или Q; остатки 3-4 являются NG; остаток 5 представляет собой A или K; а остаток 6 представляет собой A или T.

Некоторые особенно предпочтительные последовательности CDR представлены в таблице ниже. Соответственно, CDR1 полипептида по изобретению является одной из последовательностей CDR1, перечисленных ниже. Соответственно, CDR2 полипептида по изобретению является одной из последовательностей CDR2, перечисленных ниже. Соответственно, CDR3-полипептида по изобретению является одной из последовательностей CDR3, перечисленных ниже. Соответственно, полипептид по настоящему изобретению содержит комбинацию из двух или, более предпочтительно, трех последовательностей CDR, перечисленных ниже.

Отдельные CDR из семейства 2 полипептида по изобретению:

<u>CDR1</u>	<u>CDR2</u>	<u>CDR3</u>
IHWMY (SEQ ID NO: 15)	EINTNGLITLYSDSVRG (SEQ ID NO: 73)	SRNGAA (SEQ ID NO: 78)
	EINTNGLITLYADSVKG	ARNGAA (SEQ ID NO: 80)

	(SEQ ID NO: 74)	79)
	EINTNALITTYADSVKG (SEQ ID NO: 75)	TQNGAA (SEQ ID NO: 17)
	EINTNGLITHYTDSVSG (SED ID NO: 76)	TQNGKT (SEQ ID NO: 80)
	EINTNALITKYADSVKG (SEQ ID NO: 77)	
	EINTNGLITVYPDSVKG (SEQ ID NO: 16)	

Процент идентичности CDR из 62E10 с другими представителями семейства 2, TNF1 и Q62F11

Название	CDR 1	CDR 2	CDR 3
Q65F6	100	76,5	66,7
Q65F11	100	88,2	66,7
Q65E12	100	88,2	66,7
Q62C12	100	94,1	66,7
Q65A6	100	76,5	66,7
Q65A3	100	100	100
Q65F10	100	82,4	66,7
TNF1	60	88,2	16,7
Q62F11	20	52,9	13,3

Соответственно, FR1 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей 5%, 12%, 18%, 26%, 32%, 38%, 46%, 52%, 58%, 62%, 66%, 68%, 72%, 75%, 78%, 82%, 85%, 90%, 95% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 18.

В качестве альтернативы, FR1 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 28, более предпочтительно, не более 26, более предпочтительно, не более 24, более предпочтительно, не более 22, более предпочтительно, не более 20, более предпочтительно, не более 18, более предпочтительно, не более 16, более предпочтительно, не более 14, более предпочтительно, не более 13, более предпочтительно, не более

более 2, более предпочтительно, не более 1 делеции по сравнению с SEQ ID NO: 18.

Соответственно, остаток FR1, соответствующий остатку номер 1 из SEQ ID NO: 4 представляет собой is G, A, V, L, I, F, P, S, T, Y, C, M, K, R, H, W, D, E или N (более предпочтительно, D или E, наиболее предпочтительно, D). Соответственно, остаток FR1, соответствующий остатку номер 5 из SEQ ID NO: 18, представляет собой G, A, V, L, I, F, P, S, T, Y, C, M, K, R, H, W, D, E или N (более предпочтительно, V). Соответственно, остатки FR1, соответствующие остаткам с номерами 1-5 из SEQ ID NO: 18, являются DVQLV. Соответственно, остаток FR1, соответствующий остатку номер 20 из SEQ ID NO: 18, представляет собой аминокислоту, которая является гидрофобной (более предпочтительно, L). Соответственно, остаток FR1, соответствующий остатку номер 29 из SEQ ID NO: 18, представляет собой F. Соответственно, любые остатки FR1, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 18, являются консервативными заменами относительно соответствующих им остатков. Соответственно, FR1 содержит или, более предпочтительно, состоит из SEQ ID NO: 18.

Соответственно, FR2 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей 10%, 15%, 25%, 30%, 40%, 45%, 55%, 60%, 70%, 75%, 85%, 90% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 19.

В качестве альтернативы, FR2 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 13, более предпочтительно, не более 12, более предпочтительно, не более 11, более предпочтительно, не более 10, более предпочтительно, не более чем 9, более предпочтительно, не более 8, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 добавления по сравнению с SEQ ID NO: 19. Соответственно, FR2 полипептида по

настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 13, более предпочтительно, не более 12, более предпочтительно, не более 11, более предпочтительно, не более 10, более предпочтительно, не более 9, более предпочтительно, не более 8, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 замены по сравнению с SEQ ID NO: 19. Соответственно, FR2 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 13, более предпочтительно, не более 12, более предпочтительно, не более 11, более предпочтительно, не более 10, более предпочтительно, не более 9, более предпочтительно, не более 8, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 делеции по сравнению с SEQ ID NO: 19.

Соответственно, остатки в FR2, соответствующие остаткам с номерами 8-11 из SEQ ID NO: 19, являются KELE. Соответственно, любые остатки FR2, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 19, являются консервативными заменами относительно соответствующих им остатков. Соответственно, FR2 содержит или, более предпочтительно, состоит из SEQ ID NO: 19.

Соответственно, FR3 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей 8%, 15%, 20%, 26%, 32%, 40%, 45%, 52%, 58%, 65%, 70%, 76%, 80%, 82%, 85%, 90%, 92%, 95% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 20.

В качестве альтернативы, FR3 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 29, более предпочтительно, 27, более предпочтительно, 25, более предпочтительно, 23, более

предпочтительно, 21, более предпочтительно, 19, более
предпочтительно, 17, более предпочтительно, 15, более
предпочтительно, 13, более предпочтительно, 11, более
предпочтительно, 9, более предпочтительно, 7, более
предпочтительно, 6, более предпочтительно, 5, более
предпочтительно, 4, более предпочтительно, 3, более
предпочтительно, 2, более предпочтительно, 1 добавления по
сравнению с SEQ ID NO: 20. Соответственно, FR3 полипептида по
настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно,
состоит из последовательности, имеющей не более 29, более
предпочтительно, 27, более предпочтительно, 25, более
предпочтительно, 23, более предпочтительно, 21, более
предпочтительно, 19, более предпочтительно, 17, более
предпочтительно, 15, более предпочтительно, 13, более
предпочтительно, 11, более предпочтительно, 9, более
предпочтительно, 7, более предпочтительно, 6, более
предпочтительно, 5, более предпочтительно, 4, более
предпочтительно, 3, более предпочтительно, 2, более
предпочтительно, 1 замены по сравнению с SEQ ID NO: 20.
Соответственно, FR3 полипептида по настоящему изобретению
содержит или, более предпочтительно, состоит из
последовательности, имеющей не более 29, более предпочтительно,
27, более предпочтительно, 25, более предпочтительно, 23, более
предпочтительно, 21, более предпочтительно, 19, более
предпочтительно, 17, более предпочтительно, 15, более
предпочтительно, 13, более предпочтительно, 11, более
предпочтительно, 9, более предпочтительно, 7, более
предпочтительно, 6, более предпочтительно, 5, более
предпочтительно, 4, более предпочтительно, 3, более
предпочтительно, 2, более предпочтительно, 1 делеции по
сравнению с SEQ ID NO: 20.

Соответственно, остаток в FR3, соответствующий остатку
номер 26 из SEQ ID NO: 20, представляет собой аминокислоту,
которая является гидрофобной (предпочтительно, А).
Соответственно любые остатки в FR3, отличающиеся от
соответствующих их остатков в SEQ ID NO: 20, представляют собой

консервативные замены относительно соответствующих им остатков. Соответственно, FR3 содержит или, более предпочтительно, состоит из SEQ ID NO: 20.

Соответственно, FR4 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 21.

В качестве альтернативы, FR4 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 10, более предпочтительно, не более 9, более предпочтительно, не более 8, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 добавления по сравнению с SEQ ID NO: 21. Соответственно, FR4 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 10, более предпочтительно, не более 9, более предпочтительно, не более 8, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 замены по сравнению с SEQ ID NO: 21. Соответственно, FR4 полипептида по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 10, более предпочтительно, не более 9, более предпочтительно, не более 8, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 делеции по сравнению с SEQ ID NO: 21.

Соответственно, остаток в CDR2, соответствующий остатку номер 1 из SEQ ID NO: 21, представляет собой R, H, D, E, N, Q,

S, T, Y, G, A, V, L, W, P, M, C, F или I (предпочтительно, H). Соответственно, любые остатки FR4, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 21, представляют собой консервативные замены относительно соответствующих им остатков. Соответственно, FR4 содержит или, более предпочтительно, состоит из SEQ ID NO: 21.

Соответственно, полипептид по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 22.

В качестве альтернативы, полипептид по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 20, более предпочтительно, не более 15, более предпочтительно, не более 10, более предпочтительно, не более 9, более предпочтительно, не более 8, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 добавления по сравнению с SEQ ID NO: 22. Соответственно, полипептид по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 20, более предпочтительно, не более 15, более предпочтительно, не более 10, более предпочтительно, не более 9, более предпочтительно, не более 8, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 замены по сравнению с SEQ ID NO: 22. Соответственно, полипептид по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из последовательности, имеющей не более 20, более предпочтительно, не более 15, более предпочтительно, не более 10, более предпочтительно, не более 9, более предпочтительно, не более 8, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не

более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 делеции по сравнению с SEQ ID NO: 22.

Соответственно полипептид содержит или, более предпочтительно, состоит из SEQ ID NO: 22. Соответственно, N-концом полипептида является D. Соответственно, полипептид содержит или, более предпочтительно, состоит из SEQ ID NO: 55.

Соответственно, полипептид по настоящему изобретению содержит или, более предпочтительно, состоит из, последовательности, имеющий не более 20, более предпочтительно, не более 15, более предпочтительно, не более 10, более предпочтительно, не более 9, более предпочтительно, не более 8, более предпочтительно, не более 7, более предпочтительно, не более 6, более предпочтительно, не более 5, более предпочтительно, не более 4, более предпочтительно, не более 3, более предпочтительно, не более 2, более предпочтительно, не более 1 замены относительно SEQ ID NO: 22. Предпочтительно, чтобы любые замены являлись консервативными относительно соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 22.

Линкеры и мультимеры

Конструкция по изобретению содержит множество полипептидов и, поэтому, может соответственно являться поливалентной. Такая конструкция может содержать по меньшей мере два идентичных полипептида по изобретению. Конструкция, состоящая из двух идентичных полипептидов по изобретению, является «гомодвуглавой». В одном аспекте настоящего изобретения предложена конструкция, содержащая два или несколько одинаковых полипептида по настоящему изобретению.

В качестве альтернативы, конструкция может содержать по меньшей мере два полипептида, которые отличаются друг от друга, но оба все еще являются полипептидами по изобретению («гетеродвуглавая конструкция»).

В качестве альтернативы, такая конструкция может содержать: (a) по меньшей мере один полипептид по изобретению, и (b) по меньшей мере один полипептид, такой как антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент, которые не являются полипептидом по настоящему изобретению (также «гетеродвуглавая конструкция»). По меньшей мере один полипептид по п.(b) может связываться с TNF-альфа (например, через другой эпитоп, чем связывает (a)), или, в альтернативном варианте, может связываться с другой мишенью, помимо TNF-альфа. Соответственно различные полипептиды по п.(b) связываются, например: с интерлейкином (например, IL-1, IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-18 и IL-23), интерлейкиновым рецептором (например, IL-6R и IL-7R), транскрипционным фактором (например, NF-κB), цитокином (например, TNF-альфа, IFN-гамма, TGF-бета и TSLP), трансмембранным белком (например, gp130 и CD3), поверхностным гликопротеином (например, CD4, CD20, CD40), растворимым белком (например, CD40L), интегрином (например, α4β7 и αEβ7), адгезионной молекулой (например, MAdCAM), хемокином (например, IP10 и CCL20), хемокиновым рецептором (например, CCR2 и CCR9), ингибирующим белком (например, Smad7), киназой (например, JAK3), G-белок-связанным рецептором (таким, как сфингозин-1-P-рецептор), другими воспалительными медиаторами или иммунологически значимыми лигандами, участвующими в патологических процессах у человека. Таким образом, различные полипептиды по п.(b) связываются, например, с IL-6R, IL-6, IL-12, IL-23, IL-1-бета, IL-17A или CD3; или другими воспалительными медиаторами или иммунологически значимыми лигандами, участвующими в патологических процессах у человека.

Конструкции могут быть поливалентными и/или полиспецифичными. Поливалентная конструкция (например, бивалентная конструкция) содержит два или несколько связывающих полипептидов, следовательно, представляет два или несколько участков, которые могут связываться с одним или несколькими антигенами. Примером поливалентной конструкции может являться гомодвуглавая или гетеродвуглавая конструкция. Полиспецифичная конструкция (например, биспецифичная конструкция) содержит два или несколько различных связывающих полипептидов, которые представляют два или несколько участков, которые либо (a) могут

связываться с двумя или несколькими различными антигенами; или (b) могут связываться с двумя или несколькими различными эпитопами на одном антигене. Примером полиспецифичной конструкции может являться гетеродвуглавая конструкция. Полиспецифичная конструкция является поливалентной.

Соответственно, полипептиды, содержащиеся в конструкциях, являются фрагментами антител. Более предпочтительно, чтобы эти полипептиды, содержащиеся в конструкции, были выбраны из группы, состоящей из: V_{HH}, V_H, V_L, V-NAR, Fab-фрагмента и F(ab')-фрагмента. Более предпочтительно, чтобы эти полипептиды, содержащиеся в конструкции, являлись V_{HH}.

Полипептиды по изобретению могут быть связаны друг с другом напрямую (т.е. без использования линкера) или через линкер. Соответственно, линкер представляет собой устойчивый к действию протеаз линкер или чувствительный к действию протеаз линкер. Линкер, предпочтительно, является полипептидом, и будет выбираться таким образом, чтобы обеспечить возможность связывания полипептидов с их эпитопами. При использовании в терапевтических целях, линкер, предпочтительно, является неиммуногенным для субъекта, которому вводят полипептиды. Предпочтительно, чтобы все полипептиды были связаны устойчивыми к действию протеаз линкерами. Предпочтительно, чтобы чувствительный к действию протеаз линкер имел формат $[-(G_4S)_x - BJB' - (G_4S)_y -]_z$, где J представлял собой лизин или аргинин, B составлял от 0 до 5 аминокислотных остатков, выбранных из R, H, N, Q, S, T, Y, G, A, V, L, W, P, M, C, F, K или I, B' составлял от 0 до 5 аминокислотных остатков, выбранных из R, H, N, Q, S, T, Y, G, A, V, L, W, M, C, F, K или I, x составлял от 1 до 10; y составлял от 1 до 10, и z составлял от 1 до 10. Наиболее предпочтительно, чтобы J представлял собой лизин, B был равен 0, x равен 1, y равен 1, и z равен 1. Предпочтительно, чтобы устойчивые к действию протеаз линкеры имели формат $(G_4S)_x$. Наиболее предпочтительно, чтобы x был равен 6.

Векторы и хозяева

Термин «вектор», используемый в данном описании,

предназначен для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Одним типом вектора является «плазмида», которая относится к кольцевой двухцепочечной петле ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другим типом вектора является вирусный вектор, в котором дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную точку инициации репликации и эписомные векторы млекопитающих и дрожжей). Другие векторы (например, неэписомные векторы млекопитающих) могут интегрироваться в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Кроме того, некоторые векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы указаны в данном документе как «рекомбинантные экспрессионные векторы» (или просто «экспрессионные векторы»). В общем случае, экспрессионные векторы, используемые в методах рекомбинантных ДНК, часто имеют форму плазмид. В настоящем описании термины «плазмида» и «вектор» могут быть использованы взаимозаменяемо, поскольку плазмида является наиболее часто используемой формой вектора. Однако изобретение предполагает включение таких других форм экспрессионных векторов, как вирусные векторы (например, репликационно дефектные ретровирусы, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют такие же функции, а также бактериофаговые и фагмидные системы. Настоящее изобретение также относится к нуклеотидным последовательностям, которые кодируют полипептидные последовательности или поливалентные и/или полиспецифичные конструкции. Термин «рекомбинантная клетка-хозяин» (или просто «клетка-хозяин»), используемый в данном описании, предназначен для обозначения клетки, в которую был введен рекомбинантный экспрессионный вектор. Такие термины предназначены для обозначения не только конкретной указанной клетки, но и потомства такой клетки.

В одном аспекте настоящего изобретения предложен вектор,

содержащий полинуклеотид, кодирующий полипептид или конструкцию по настоящему изобретению, или кДНК, содержащую указанный полинуклеотид. В еще одном аспекте настоящего изобретения предложена клетка-хозяин, трансформированная указанным вектором, который способен экспрессировать полипептид или конструкцию по настоящему изобретению. Предпочтительно, чтобы клетка-хозяин являлась бактерией, такой как *Escherchia coli*, дрожжевой клеткой, принадлежащих к роду *Aspergillus*, *Saccharomyces*, *Kluuveromyces*, *Hansenula* или *Pichia*, например, *Saccharomyces cerevisiae* или *Pichia pastoris*.

Стабильность

Соответственно, полипептид или конструкция по настоящему изобретению, по существу, сохраняют нейтрализующую способность и/или эффективность при пероральной доставке и после прохождения через желудочно-кишечный тракт (например, после воздействия протеаз тонкого и/или толстого кишечника и/или воспалительных протеаз при IBD). Такие протеазы включают энтеропептидазу, трипсин, химотрипсин и воспалительные протеазы при болезни раздраженного кишечника (например, MMP3, MMP12 и катепсин). Протеаз тонкого и/или толстого кишечника или протеазы, продуцируемые в тонком и/или толстом кишечнике, включают протеазы, получаемые из кишечной комменсальной микрофлоры и/или патогенных бактерий, например, где протеазами являются ассоциированные с клеточной мембраной протеазы, секретируемые из организма протеазы и протеаз, высвобождаемые при лизисе клеток). Наиболее предпочтительно, чтобы протеазами являлись трипсин и химотрипсин.

Соответственно, кишечным трактом является кишечный тракт собаки, свиньи, человека, яванского макака или мыши. Тонкий кишечник, соответственно, состоит из двенадцатиперстной кишки, тощей кишки и подвздошной кишки. Толстый кишечник, соответственно, состоит из слепой кишки, ободочной кишки, прямой кишки и анального канала. Предпочтительно, чтобы полипептид или конструкция по настоящему изобретению были, по существу, устойчивыми к действию одной или нескольких протеаз. Кишечный тракт, в отличие от желудочно-кишечного тракта, состоит только

из тонкого кишечника и толстого кишечника.

Полипептид или конструкция по настоящему изобретению, по существу, сохраняют нейтрализующую способность, когда предпочтительно, 10%, более предпочтительно, 20%, более предпочтительно, 30%, более предпочтительно, 40%, более предпочтительно, 50%, более предпочтительно, 60%, более предпочтительно, 70%, более предпочтительно, 80%, более предпочтительно, 90%, более предпочтительно, 95%, более предпочтительно, 100% от первоначальной нейтрализующей способности полипептида или конструкции по изобретению сохраняется после воздействия протеаз, присутствующих в тонком и/или толстом кишечнике, и/или воспалительных протеаз IBD.

Соответственно, полипептид или конструкция по настоящему изобретению, по существу, сохраняют нейтрализующую способность после воздействия протеаз, присутствующих в тонком и/или толстом кишечнике, и/или воспалительных протеаз IBD, например, по меньшей мере до 2, более предпочтительно, по меньшей мере до 3, более предпочтительно, по меньшей мере до 4, более предпочтительно, по меньшей мере до 5, более предпочтительно, по меньшей мере до 5,5, более предпочтительно по меньшей мере до 16, более предпочтительно, по меньшей мере до 21 или, более предпочтительно, по меньшей мере до 22 часов при температуре 37 градусов Цельсия.

Соответственно, 10% или больший %, более предпочтительно, 20% или больший %, более предпочтительно, 30% или больший %, более предпочтительно, 40% или больший %, более предпочтительно, 50% или больший %, более предпочтительно, 60% или больший %, более предпочтительно, 70% или больший % нейтрализующей способности полипептида или конструкции по настоящему изобретению сохраняется после 16 часов выдержки в условиях желудочно-кишечного тракта, более предпочтительно, тонкого или толстого кишечника, более предпочтительно, экстракта фекалий человека.

Соответственно, 10% или больший %, более предпочтительно, 20% или больший %, более предпочтительно, 30% или больший %, более предпочтительно, 40% или больший %, более предпочтительно,

50% или больший %, более предпочтительно, 60% или больший %, более предпочтительно, 70% или больший %нейтрализующей способности полипептида или конструкции по настоящему изобретению сохраняется после, соответственно, 4, 6 или 16 часов воздействия супернатанта тонкого кишечника мыши.

Соответственно 10% или больший %, более предпочтительно, 15% или больший %, более предпочтительно, 20% или более, более предпочтительно, 25% или больший %, более предпочтительно, 30% или больший %, более предпочтительно, 35% или больший %, более предпочтительно, 40% или больший %нейтрализующей способности полипептида или конструкции по настоящему изобретению сохраняется после 16 часов воздействия супернатанта тонкого кишечника мыши.

Соответственно 50% или больший %, более предпочтительно, 60% или больший %, более предпочтительно, 65% или более, более предпочтительно, 70% или больший %, более предпочтительно, 75% или больший %, более предпочтительно, 80% или больший %, более предпочтительно, 85% или больший %, более предпочтительно, 85% или больший % нейтрализующей способности полипептида или конструкции по изобретению сохраняется после 16 часов воздействия супернатанта тонкого кишечника мыши.

Соответственно, 10% или больший %, более предпочтительно, 20% или больший %, более предпочтительно, 30% или больший %, более предпочтительно, 40% или больший %, более предпочтительно, 50% или больший %, более предпочтительно, 60% или больший %, более предпочтительно, 70% или больший % вводимой дозы полипептидов или конструкций по настоящему изобретению сохраняют нейтрализующую способность в отношении TNF-альфа и остаются в фекалиях мыши, яванского макака и/или человека (предпочтительно, выводятся из организма с фекалиями или с фекалиями, удаляемыми из кишечного тракта) после 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 часов воздействия условий кишечного тракта.

Полипептид по изобретению или конструкция по настоящему изобретению остаются по существу неповрежденными, когда предпочтительно, 10%, более предпочтительно, 20%, более предпочтительно, 30%, более предпочтительно, 40%, более

предпочтительно, 50%, более предпочтительно, 60%, более предпочтительно, 70%, более предпочтительно, 80%, более предпочтительно, 90%, более предпочтительно, 95%, более предпочтительно, 99%, наиболее предпочтительно, 100% от введенного количества полипептида по изобретению или конструкции остаются неизменными после воздействия протеаз, присутствующих в тонком и/или толстом кишечнике, и/или воспалительных протеаз IBD.

Соответственно, полипептид по изобретению или конструкция по настоящему изобретению по существу остаются неповрежденными после нахождения в желудке, двенадцатиперстной кишке, тощей или подвздошной кишке яванского макака в течение 5 часов. Соответственно, полипептид по изобретению или конструкция по настоящему изобретению по существу остаются неповрежденными после нахождения в слепой кишке или в ободочной кишке яванского макака в течение 16 часов.

Соответственно, полипептид или конструкция по настоящему изобретению, по существу сохраняют нейтрализующую способность, когда, предпочтительно, 10%, более предпочтительно, 20%, более предпочтительно, 30%, более предпочтительно, 40%, более предпочтительно, 50%, более предпочтительно, 60%, более предпочтительно, 70%, более предпочтительно, 80%, более предпочтительно, 90%, более предпочтительно, 95%, более подходящее 100% от первоначальной нейтрализующей способности полипептида или конструкции сохраняются после замораживания и размораживания.

Терапевтическое использование и доставка

Терапевтически эффективное количество полипептида, фармацевтической композиции или конструкции по настоящему изобретению представляет собой количество, которое является эффективным при однократном или многократном введении дозы пациенту для нейтрализации TNF-альфа до значительной степени у субъекта. Терапевтически эффективное количество может варьировать в зависимости от таких факторов, как стадия болезни, возраст, пол и вес индивидуума, а также способности полипептида, фармацевтической композиции или конструкции вызывать желаемый

ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также является таковым, при котором любые токсические или вредные эффекты полипептида по изобретению, фармацевтической композиции или конструкции перевешиваются терапевтически благоприятными эффектами. Полипептид или конструкция по настоящему изобретению могут быть включены в фармацевтические композиции, пригодные для введения субъекту. Полипептид или конструкция по настоящему изобретению могут иметь форму фармацевтически приемлемой соли.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть, соответственно, составлена для перорального, внутримышечного, подкожного или внутривенного введения. Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут находиться в различных формах. К ним относятся, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, инъекционные и инфузионные), дисперсии или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, липосомы и суппозитории. Предпочтительными являются твердые лекарственные формы. Полипептид по изобретению, фармацевтическая композиция или конструкция могут быть объединены с вспомогательными веществами и использованы в форме таблеток для приема внутрь, буккальных таблеток, пастилок, капсул, эликсиров, суспензий, сиропов, пластинок и т.п.

Как правило, фармацевтическая композиция содержит полипептид или конструкцию по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают один или несколько из воды, физиологического раствора, забуференного фосфатом физиологического раствора, декстрозы, глицерина, этанола и т.д., а также их комбинации. Фармацевтически приемлемые носители могут дополнительно содержать незначительные количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, консерванты или буферы, которые увеличивают срок хранения или эффективность полипептида или конструкции по настоящему изобретению. Фармацевтические композиции могут включать антиадгезивные вещества, связующие вещества, используемые в качестве оболочки вещества, разрыхлители,

ароматизаторы, красители, смазывающие вещества, сорбенты, консерванты, подсластители, вспомогательные вещества для лиофилизации (включая лиопротекторы) или вещества, способствующие прессованию.

Наиболее предпочтительно, чтобы полипептид по изобретению, фармацевтическую композицию или конструкцию по настоящему изобретению вводили перорально. Основной проблемой пероральной доставки является гарантия того, чтобы достаточное количество полипептида, фармацевтической композиции или конструкции достигало области кишечного тракта, где они необходимы. Факторы, которые препятствуют попаданию полипептида, фармацевтической композиции или конструкции по настоящему изобретению в область кишечного тракта, где они необходимы, включают присутствие протеаз в пищеварительном соке, которые могут разрушать полипептид, фармацевтическую композицию или конструкцию по настоящему изобретению. Предпочтительно, чтобы полипептид, фармацевтическая композиция или конструкция по настоящему изобретению являлись по существу стабильными в присутствии одной или нескольких таких протеаз за счет свойств полипептида или конструкции. Предпочтительно, чтобы полипептид или конструкция по настоящему изобретению были лиофилизированы перед включением в фармацевтическую композицию.

Полипептид по изобретению также могут быть предложен с энтеросолюбильной оболочкой. Энтеросолюбильная оболочка представляет собой полимерный барьер, наносимый на пероральный препарат, который помогает защитить полипептид от низкого pH в желудке. Материалы, используемые для энтеросолюбильных оболочек, включают жирные кислоты, воски, шеллак, пластмассу и растительные волокна. Подходящие компоненты энтеросолюбильных оболочек включают сополимеры метилакрилата и метакриловой кислоты, ацетат-сукцинат целлюлозы, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы, ацетат-сукцинат гидроксипропилметилцеллюлозы, (ацетат-сукцинат гипромеллозы), поливинилацетат-фталат (PVAP), сополимеры метилметакрилата и метакриловой кислоты, альгинат натрия и стеариновую кислоту. Подходящие энтеросолюбильные оболочки включают полимеры,

обеспечивающие рН-зависимое высвобождение. Они представляют собой полимеры, которые являются нерастворимыми при сильно кислом рН в желудке, но которые быстро растворяются при менее кислом рН. Таким образом, предпочтительно, чтобы энтеросолюбильная оболочка не растворялась в кислом желудочном соке (рН ~3), но растворялась при более высоком рН в тонком кишечнике (рН выше 6) или в ободочной кишке (рН выше 7,0). Полимер для рН-зависимого высвобождения выбирают таким образом, чтобы полипептид или конструкция по настоящему изобретению высвобождались примерно в то время, когда препарат достигает тонкого кишечника.

Полипептид, конструкция или фармацевтическая композиция по настоящему изобретению могут быть введены в препараты для инъекций путем растворения, суспендирования или эмульгирования их в водном или неводном растворителе, таком как растительные или другие аналогичные масла, глицериды синтетических алифатических кислот, сложные эфиры высших алифатических кислот или пропиленгликоля; и, если желательно, с обычными добавками, такими как солюбилизаторы, изотонические агенты, суспендирующие агенты, эмульгаторы, стабилизаторы и консерванты. Приемлемые носители, наполнители и/или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях и включают буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту, глутатион, цистеин, метионин и лимонную кислоту; консерванты (такие как этанол, бензиловый спирт, фенол, м-крезол, п-хлор-м-крезол, метил- или пропил-парабены, хлорид бензалкония или их комбинации); аминокислоты, такие как аргинин, глицин, орнитин, лизин, гистидин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, изолейцин, лейцин, аланин, фенилаланин, тирозин, триптофан, метионин, серин, пролин и их комбинации; моносахариды, дисахариды и другие углеводы; низкомолекулярные (менее примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как желатин или сывороточный альбумин; хелатирующие агенты, такие как EDTA; сахара, такие как трегалоза, сахароза, лактоза, глюкоза, манноза, мальтоза, галактоза, фруктоза, сорбоза, рафиноза, глюкозамин, N-метилглюкозамин, галактозамин и нейраминовая

кислота; и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбаты, простые эфиры полиоксиэтилена, полуксамеры, Triton-X или полиэтиленгликоль.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть доставлена местно на кожу (например, для использования при лечении аутоиммунных заболеваний, таких как псориаз или экзема). Такая фармацевтическая композиция может иметь форму крема, мази, лосьона, геля, пены, трансдермального пластыря, порошка, пасты или настойки и может соответственно включать в себя аналоги витамина D3 (например, кальцитриол и максакальцитол), стероиды (например, пропионат флутиказона, валерат бетаметазона и пропионат клобетазола), ретиноиды (например, тазаротен), каменноугольную смолу и дитранол. Местные лекарственные средства часто используются в сочетании друг с другом (например, витамин D3 и стероид) или с другими агентами, такими как салициловая кислота. Если фармацевтическая композиция по настоящему изобретению должна вводиться местно для лечения псориаза или экземы, предпочтительно, чтобы дополнительное вещество, считающееся эффективным для лечения псориаза или экземы, могло быть включено в композицию, такое как стероиды, особенно, стероиды 4-го или 5-го класса, такие как гидрокортизон (например, 1%-й гидрокортизоновый крем); циклоспорин или аналогичный макролидный агент; или ретиноиды.

Для всех способов доставки, полипептид, фармацевтическая композиция или конструкция по настоящему изобретению могут быть введены в буфер с целью стабилизации pH композиции, имеющий концентрацию между 5-50 или, более предпочтительно, 15-40, или, более предпочтительно, 25-30 г/л. Примеры подходящих буферных компонентов включают в себя физиологические соли, такие как цитрат натрия и/или лимонная кислота. Подходящие буферы содержат 100-200, более предпочтительно, 125-175 мМ физиологических солей, таких как хлорид натрия. Предпочтительно выбирать буфер, чтобы получить pKa, близкий pH композиции или физиологическому pH пациента.

Иллюстративные концентрации полипептида или конструкции в фармацевтической композиции могут находиться в интервале от

примерно 1 мг/мл до примерно 200 мг/мл или от примерно 50 мг/мл до примерно 200 мг/мл, или от примерно 150 мг/мл до примерно 200 мг/мл.

Водный состав полипептида, конструкции или фармацевтической композиции по настоящему изобретению может быть получен в pH-забуференном растворе, например, при pH в диапазоне от примерно 4,0 до примерно 7,0 или от примерно 5,0 до примерно 6,0, или, в альтернативном варианте, при pH около 5,5. Примеры подходящих буферов включают фосфатный, гистидиновый, цитратный, сукцинатный, ацетатный буферы и другие буферные органические кислоты. Концентрация буфера может составлять от примерно 1 мМ до примерно 100 мМ или от примерно 5 мМ до примерно 50 мМ, в зависимости, например, от буфера и желаемой тоничности состава.

Тоничность фармацевтической композиции может быть изменена путем включения модификатора тоничности. Такие модификаторы тоничности могут представлять собой заряженные или незаряженные химические частицы. Типичные незаряженные модификаторы тоничности включают сахара или сахарные спирты, или другие многоатомные спирты, предпочтительно трегалозу, сахарозу, маннит, глицерин, 1,2-пропандиол, рафинозу, сорбит или лактит (особенно, трегалозу, маннит, глицерин или 1,2-пропандиол). Типичные заряженные модификаторы тоничности включают соли, такие как комбинация ионов натрия, калия или кальция, с хлоридным, сульфатным, карбонатным, сульфитным, нитратным, лактатным, сукцинатным, ацетатным или малеатным ионами (особенно, хлорид натрия или сульфат натрия); или аминокислоты, такие как аргинин или гистидин. Предпочтительно, чтобы водная композиция была изотонической, хотя могут быть пригодны гипертонические или гипотонические растворы. Термин «изотонический» означает раствор, имеющий такую же тоничность, как некоторые другие растворы, с которыми он сравнивается, такие как физиологический солевой раствор или сыворотка. Агенты, придающие тоничность, могут быть использованы в количестве от примерно 5 мМ до примерно 350 мМ, например, в количестве от 1 мМ до 500 нМ. Предпочтительно, чтобы по меньшей мере один изотонический агент был включен в композицию.

Поверхностно-активное вещество также может быть добавлено к фармацевтической композиции для уменьшения агрегации введенных в состав полипептида или конструкции, и/или для того чтобы свести к минимуму образование частиц в композиции, и/или для снижения адсорбции. Типичные поверхностно-активные вещества включают сложные эфиры жирных кислот и полиоксиэтиленсорбитана (Tween), полиоксиэтиленалкиловые эфиры (Brij), алкилфенилполиоксиэтиленовые эфиры (Triton-X), сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена (Poloxamer, Pluronic) и додецилсульфат натрия (SDS). Примерами подходящих сложных эфиров полиоксиэтиленсорбитана и жирных кислот являются полисорбат 20 и полисорбат 80. Типичные концентрации поверхностно-активного вещества могут находиться в диапазоне от примерно 0,001% до примерно 10% вес/об.

Также может быть добавлен лиопротектор, для того чтобы защитить полипептид или конструкцию по настоящему изобретению от дестабилизирующих условий в процессе лиофилизации. Например, известные лиопротекторы включают сахара (включая глюкозу, сахарозу, маннозу и трегалозу); многоатомные спирты (включая маннит, сорбит и глицерин); и аминокислоты (включая аланин, глицин и глутаминовую кислоту). Лиопротекторы могут быть включены в количестве от примерно 10 мМ до 500 мМ.

Диапазонами доз для введения полипептида по изобретению, фармацевтической композиции или конструкции по настоящему изобретению являются те, которые обеспечивают желаемый терапевтический эффект. Требуемый диапазон доз зависит от конкретной природы полипептида по изобретению, фармацевтической композиции или конструкции, пути введения, типа состава, возраста пациента, характера, степени и тяжести состояния пациента, противопоказаний, если таковые имеются, и решения лечащего врача. Вариации уровней этих дозировок можно корректировать с помощью стандартных эмпирических процедур для оптимизации.

Приемлемые суточные дозы полипептида по изобретению, фармацевтической композиции или конструкции по настоящему изобретению находятся в диапазоне от 50 нг - 50 мг на кг,

например, 50 мкг – 40 мг на кг, например, 5–30 мг на кг массы тела. Стандартная доза может варьировать от менее чем 100 мг, но, как правило, будет находиться в области 250–2000 мг на дозу, которую можно вводить ежедневно или более часто, например, 2, 3 или 4 раза в день или менее часто, например, каждый день или один раз в неделю, раз в две недели или раз в месяц.

В одном аспекте настоящего изобретения предложено применение полипептида, фармацевтической композиции или конструкции по изобретению в производстве лекарственного средства для лечения аутоиммунных заболеваний. В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения аутоиммунного заболевания, включающий введение человеку, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества полипептида, фармацевтической композиции или конструкции по настоящему изобретению.

Слово «лечение» должно охватывать профилактику, а также терапевтическое лечение. Лечение заболеваний также охватывает лечение их обострений, а также охватывает лечение пациентов в стадии ремиссии от симптомов болезни, чтобы предотвратить рецидив симптомов заболевания.

Комбинированная терапия

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может также включать один или несколько действующих агентов (например, действующих агентов, пригодных для лечения заболеваний, указанных в данном описании). В объем настоящего изобретения входит использование фармацевтической композиции по изобретению в терапевтических способах лечения аутоиммунных заболеваний в качестве дополнения или в сочетании с другие установленными методами лечения, обычно используемыми при лечении аутоиммунных заболеваний.

Для лечения IBD (например, болезни Крона или язвенного колита), возможные комбинации включают комбинации, например, одного или нескольких действующих агентов, выбранных из списка, состоящего из: 5-аминосалициловой кислоты или ее пролекарственных форм (например, сульфасалазина, олсалазина или бисалазина); кортикостероидов (например, преднизолона,

метилпреднизолона или будесонида); иммунодепрессантов (например, циклоспорина, такролимуса, метотрексата, азатиоприна или 6-меркаптопурин); анти-TNF-альфа антител (например, инфликсимаба, адалимумаба, цертолизумаба пегола или голимумаба); анти-IL-12/IL23 антител (например, устекинумаба); анти-IL6R антител или низкомолекулярных ингибиторов IL-12/IL23 (например, апилимода); анти-альфа-4-бета-7 антител (например, ведолизумаба); MAdCAM-1-блокаторов (например, PF-00547659); антител против молекулы клеточной адгезии альфа-4-интегрин (например, натализумаба); антител против альфа-субъединицы рецептора IL-2 (например, даклизумаба или базиликсимаба); ингибиторов JAK3 (например, тофацитиниба или R348); ингибиторов Syk и их пролекарственных форм (например, фостаматиниба и P-406); ингибиторов фосфодиэстеразы-4 (например, тетомиласта); HMPL-004; пробиотиков; дерсалазина; семапимода/CPSI-2364; и ингибиторов протеинкиназы C (например, АЕВ-071). Наиболее подходящими комбинирующимися агентами являются инфликсимаб, адалимумаб, цертолизумаб пегол или голимумаб.

Следовательно, еще один аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции по настоящему изобретению в комбинации с одним или несколькими дополнительными действующими агентами, например, одним или несколькими действующими агентами, описанными выше.

В еще одном аспекте настоящего изобретения, полипептид, фармацевтическую композицию или конструкцию вводят последовательно, одновременно или по отдельности с по меньшей мере одним действующим агентом, выбранным из приведенного выше списка.

Аналогичным образом, еще один аспект изобретения относится к комбинированному продукту, содержащему:

(А) полипептид, фармацевтическую композицию или конструкцию по настоящему изобретению; и

(В) один или несколько других действующих агентов,

где каждый из компонентов (А) и (В) представлены в виде смеси с фармацевтически приемлемым адъювантом, разбавителем или носителем. В этом аспекте изобретения, комбинированный продукт

может представлять собой или один (комбинированный) состав, или набор из отдельных компонентов. Таким образом, этот аспект изобретения охватывает комбинированный состав, содержащий полипептид, фармацевтическую композицию или конструкцию по настоящему изобретению и другой терапевтический агент, смешанные с фармацевтически приемлемым адъювантом, разбавителем или носителем.

Изобретение также охватывает набор компонентов, включающий компоненты:

(i) полипептид, фармацевтическую композицию или конструкцию по настоящему изобретению в смеси с фармацевтически приемлемым адъювантом, разбавителем или носителем; и

(ii) состав, включающий один или несколько других действующих агентов в смеси с фармацевтически приемлемым адъювантом, разбавителем или носителем, причем каждый из компонентов (i) и (ii) представлен в форме, которая подходит для введения в сочетании с другими компонентами.

Компонент (i) из набора компонентов, таким образом, представляет собой компонент (A) из первого варианта, смешанный с фармацевтически приемлемым адъювантом, разбавителем или носителем. Аналогично, компонент (ii) представляет собой компонент (B) из первого варианта, смешанный с фармацевтически приемлемым адъювантом, разбавителем или носителем. Один или несколько других действующих агентов (то есть компонент (B) из первого варианта) могут представлять собой, например, любой из агентов, приведенных выше для лечения аутоиммунных заболеваний, таких как IBD (например, болезнь Крона и/или язвенный колит). Если компонент (B) включает более одного действующего агента, эти дополнительные действующие агенты могут быть представлены в виде единого препарата или введены в один препарат с компонентом (A), или они могут быть представлены в виде отдельных препаратов. В одном варианте осуществления компонент (B) представляет один дополнительный терапевтический агент. В другом варианте осуществления компонент (B) включает два других терапевтических агента. Комбинированный продукт (либо комбинированный препарат или набор из компонентов) по этому

аспекту настоящего изобретения может использоваться для лечения или профилактики аутоиммунных заболеваний (например, аутоиммунных заболеваний, указанных в настоящем документе).

Соответственно полипептид, фармацевтическая композиция или конструкция по настоящему изобретению предназначены для использования в качестве лекарственного средства и, более предпочтительно, для использования при лечении аутоиммунных и/или воспалительных заболеваний.

Аутоиммунные заболевания и/или воспалительные заболевания

Аутоиммунные заболевания развиваются, когда иммунная система отрицательно реагирует на нормальные ткани организма. Аутоиммунные заболевания могут привести к повреждению тканей организма, аномальному росту органов и/или изменению в функциях органов. Расстройство может затрагивать только один орган или тип ткани, или может повлиять на несколько органов и тканей. Органы и ткани, обычно страдающие от аутоиммунных заболеваний, включают компоненты крови, такие как эритроциты, кровеносные сосуды, соединительную ткань, эндокринные железы, такие как щитовидная железа или поджелудочная железа, мышцы, суставы и кожу. Воспалительное заболевание представляет собой заболевание, характеризующееся воспалением. Многие воспалительные заболевания являются аутоиммунными заболеваниями и наоборот.

Аутоиммунные заболевания и/или воспалительные заболевания ЖКТ

Хронические воспалительные заболевания кишечника (IBD) – болезнь Крона и язвенный колит, от которых страдают дети и взрослые, являются примерами аутоиммунных и воспалительных заболеваний ЖКТ (Hendrickson et al 2002 *Clin Microbiol Rev* 15(1):79–94, которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки). Язвенный колит определяется как состояние, при котором воспалительный ответ и морфологические изменения ограничиваются ободочной кишкой. Прямая кишка затронута у 95% больных. Воспаление преимущественно затрагивает слизистую оболочку и представляет собой непрерывный участок с воспалением разной тяжести с язвами, отеком и кровоизлиянием на протяжении ободочной кишки (Hendrickson et al 2002 *Clin. Microbiol Rev*

15(1):79-94, которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки). Язвенный колит обычно проявляется наличием крови и слизи, смешанных со стулом, наряду с спастическими болями в нижнем отделе живота, которые являются наиболее интенсивными при испражнении. Клинически, диарея с кровью и слизью отличает язвенный колит от синдрома раздраженного кишечника, при котором кровь отсутствует. В отличие от язвенного колита, проявления болезни Крона, как правило, менее выражены, что приводит к более поздней диагностике. Такие факторы, как местоположение, выраженность и тяжесть заболевания определяют степень желудочно-кишечных симптомов. У пациентов, у которых затронуты подвздошная и ободочная кишка, обычно наблюдается боль в животе после приема пищи, ощущаемая в правом нижнем квадранте, и иногда возникают воспалительные опухоли. Симптомы, связанные с болезнью Крона, затрагивающей желудок и 12-перстную кишку, включают раннее насыщение, тошноту, рвоту, боль в эпигастральной области или дисфагию. Распространенным является вариант заболевания, затрагивающий перианальную область, что сопровождается анальным полипами, глубокими анальными трещинами и свищами (Hendrickson et al 2002 *Clin Microbiol Rev* 15(1):79-94, которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки).

При этих заболеваниях TNF-альфа производится в *lamina propria*, находящейся под эпителием слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта. Целостность этого эпителия нарушается при IBD, что облегчает перенос варибельного домена иммуноглобулиновой цепи в *lamina propria* слизистой оболочки - место синтеза и биологического действия TNF-альфа при этих заболеваниях (см. пример 8). Другие болезни ЖКТ включают, например, воспалительное заболевание мукозит (соответственно, вызванный лекарственными препаратами и радиационный мукозит), при котором воспалительные поражения присутствуют в слизистой оболочке, разрушая эпителиальные плотные соединения, что также позволяет варибельному домену иммуноглобулиновой цепи получить доступ к месту продукции TNF-альфа. При мукозите язвы могут возникнуть в любом месте от рта до ануса, и при поражениях рта и пищевода может быть использованы жидкость для полоскания рта или

кремообразный препарат, содержащие переменный домен. При анальных и ректальных поражениях, для местного применения будут подходить суппозитории, кремы или пены, содержащие переменный домен. Переменный домен иммуноглобулиновой цепи будет выводиться из *lamina propria* или других участков воспаления путем абсорбции в кровоток в местах воспаления или через лимфоток и последующий ввод в кровоток. Таким образом, домены достигают печени через кровь и будут выводиться с помощью клубочковой фильтрации в почках. Таким образом, имеется хорошее обоснование, что домены будут иметь терапевтическую активность при таких заболеваниях, как аутоиммунный гепатит, диабет II типа и клубочковой нефрит.

Соответственно, полипептид, фармацевтическая композиция или конструкция по настоящему изобретению используются при лечении аутоиммунных и/или воспалительных заболеваний на ЖКТ (желудочно-кишечного тракта), где TNF-альфа вносит вклад в патогенез таких заболеваний.

Соответственно полипептид, фармацевтическая композиция или конструкция по настоящему изобретению предназначены для использования при лечении аутоиммунных и/или воспалительных заболеваний ЖКТ, выбранных из группы, состоящей из болезни Крона, язвенного колита, синдрома раздраженного кишечника, сахарного диабета II типа, гломерулонефрита, аутоиммунного гепатита, синдрома Шегрена, целиакии и лекарственно или радиационно-индуцированного мукозита (наиболее предпочтительно, болезни Крона).

Пероральная доставка переменного домена иммуноглобулиновой цепи будет идеально подходить для лечения воспалительных заболеваний, в патогенез которых вносит вклад TNF-альфа (по меньшей мере частично), и переменный домен иммуноглобулиновой цепи может получить доступ к ткани, где TNF-альфа является биологически активным.

Аутоиммунные заболевания и/или воспалительные заболевания кожи

Псориаз является изнурительным аутоиммунным дерматологическим заболеванием. Псориатические бляшки, наиболее

распространенная форма заболевания, характеризуются красной кожей, покрытой серебристыми чешуйками. Гистологическая картина представляет собой неупорядоченную дифференцировку и гиперпролиферацию кератиноцитов в пределах псориатической бляшки с инфильтратами воспалительных клеток (Ortonne, 1999 *Brit J Dermatol* 140(suppl 54):1-7). Псориатические поражения кожи представляют собой воспаленные, красные, имеющие четкую границу бляшки различной формы с характерным серебристым блестящими чешуйками. Термин псориаз включает в себя псориаз и симптомы псориаза, включая эритему, утолщение/выпуклость кожи и шелушение.

Биологические агенты, применяющиеся при лечении псориаза, включают анти-TNF-альфа терапию (такую как моноклональные антитела против TNF, например, адалимумаб и инфликсимаб или слитые белки с рецептором TNF-альфа, такие как этанерцепт), гуманизированные антитела к CD11a (эфализумаб) или агенты, которые связываются с CD2, такие как алефацепт (тем самым блокируя взаимодействие CD2 с LFA3). Следует отметить, что не все из биологических агентов, перечисленных выше, были одобрены для применения для лечения псориаза.

Полипептид по изобретению может быть включен в крем/мазь или другой носитель для местного применения для нанесения на воспалительные поражения кожи, при которых TNF-альфа способствует патологии таких поражений.

Соответственно, полипептид, фармацевтическая композиция или конструкция по настоящему изобретению предназначены для использования при лечении аутоиммунных и/или воспалительных заболеваний кожи, выбранных из группы, состоящей из пузырчатки, псориаза, экземы и склеродермии.

Соответственно, полипептид, фармацевтическая композиция или конструкция предназначены для использования при лечении других аутоиммунных/воспалительных заболеваний, при которых TNF-альфа отвечает за часть от наблюдаемой патологии.

Препаративные способы

Полипептиды по изобретению можно получить и работать с ними с помощью методов, описанных, например, в Green and Sambrook

2012 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 4th Edition Cold Spring Harbour Laboratory Press.

Моноклональные антитела могут быть получены с использованием гибридной технологии путем слияния продуцирующих специфичное антитело В-клеток с клетками миеломы (В-клеточного рака), которая была выбрана по своей способности расти в культуре и по отсутствию синтеза цепей антитела (Köhler and Milstein 1975 *Nature* 256:495-497 и Nelson et al 2000 *Molecular Pathology* 53(3):111-117, которые полностью включены в настоящее описание путем ссылки).

Моноклональное антитело, направленное против определенного антигена, может, например, быть получено:

а) иммортализацией лимфоцитов, полученных из периферической крови животного, ранее иммунизированного определенным антигеном, путем слияния с бессмертной клеткой и, предпочтительно, с клеткой миеломы, для того чтобы получить гибридому,

б) культивированием полученных иммортализованных клеток (гибридомы) и выделением клеток, продуцирующих антитела, обладающие желаемой специфичностью.

В альтернативном варианте не требуется использование гибридной клетки. Соответственно, моноклональные антитела могут быть получены способом, включающим следующие стадии:

а) клонирование в векторы, в частности, в фаги и, более конкретно, в нитчатые бактериофаги, последовательностей ДНК или кДНК, полученных из лимфоцитов, в частности, лимфоцитов периферической крови животного (предпочтительно, предварительно иммунизированного заданными антигенами),

б) трансформацию прокариотических клеток вышеуказанными векторами в условиях, позволяющих производство антител,

с) отбор антител с помощью аффинной селекции на антигене,

д) выделение антител, имеющих желаемую специфичность.

Способы иммунизации верблюдовых, клонирование VHH-репертуара В-клеток, циркулирующих в крови (Chomezynnski and Sacchi 1987 *Anal Biochem* 162:156-159) и выделение антиген-специфичных VHH из иммунизированных (Arbabi-Ghahroudi et al 1997 *FEBS Lett* 414:521-526) и неиммунизированных (Tanha et al 2002 *J*

Immunol Methods 263:97-109) библиотек с использованием фагового, дрожжевого или рибосомного дисплеев являются известными (W092/01047, Nguyen et al 2001 *Adv Immunol* 79:261-296 и Harmsen et al 2007 *Appl Microbiol Biotechnol* 77(1):13-22). Эти источники включены в данное описание путем ссылки во всей полноте.

Антигенсвязывающие фрагменты антител, такие как scFv- и Fv-фрагменты, могут быть выделены и проэкспрессированы в *E. coli* (Miethe et al 2013 *J Biotech* 163(2):105-111, Skerra et al 1988 *Science* 240(4855):1038-1041 и Ward et al *Nature* 1989 341:544-546, которые полностью включены в данное описание путем ссылки).

В ДНК или кДНК, которые кодируют полипептиды, могут быть введены мутации, которые не отражаются на аминокислотной последовательности полипептида, но которые обеспечивают предпочтительные кодоны для трансляции в конкретном хозяине. Предпочтительные кодоны для трансляции нуклеиновых кислот, например, в *E.coli* и *S.cerevisiae* являются известными.

Мутагенез полипептидов может быть достигнут, например, путем введения замены, добавления или делеции в нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид. Замены, добавления или делеции в нуклеиновую кислоту, кодирующую полипептид, могут быть введены многими способами, включая, например, подверженную ошибкам ПЦР, перетасовку нуклеотидов, олигонуклеотид-направленный мутагенез, сборочную ПЦР, ПЦР-мутагенез, *in vivo* мутагенез, каскадный мутагенез, рекурсивный множественный мутагенез, экспоненциальный множественный мутагенез, сайт-специфичный мутагенез (Ling et al 1997 *Anal Biochem* 254(2):157-178, которая полностью включена в настоящее описание путем ссылки), повторную сборку гена, насыщающий мутагенез по участку гена (GSSM), сборку лигированием синтетических блоков (SLR) или сочетание этих способов. Эти модификации, добавления или делеции в нуклеиновую кислоту могут также быть введены способом, включающим рекомбинацию, рекурсивную рекомбинацию последовательностей, мутагенез с использованием фосфоротиоато-модифицированной ДНК, мутагенез с использованием урацил-содержащих матриц, мутагенез с использованием дуплексов с разрывом, репарационный мутагенез с точечными несовпадениями, мутагенез в штамме-хозяине с

нарушенной репарацией, химический мутагенез, радиогенный мутагенез, делеционный мутагенез, мутагенез с рестрикционной селекцией, мутагенез с рестрикционной очисткой, множественный мутагенез, создание химерного нуклеотидного мультимера или их комбинацию.

В частности, может быть использован искусственный синтез гена (Nambiar et al 1984 *Science* 223:1299-1301, Sakamar and Khorana 1988 *Nucl. Acids Res* 14:6361-6372, Wells et al 1985 *Gene* 34:315-323 и Grundstrom et al 1985 *Nucl. Acids Res* 13:3305-3316, которые полностью включены в настоящее описание путем ссылки). Ген, кодирующий полипептид по изобретению, может быть получен синтетическим путем, например, твердофазным синтезом ДНК. Полноразмерные гены могут быть синтезированы *de novo*, без необходимости в матричной ДНК-предшественнике. Для получения желаемого олигонуклеотида, строительные блоки последовательно присоединяют к растущей цепи олигонуклеотида в порядке, требуемом последовательностью продукта. После завершения синтеза цепи, продукт высвобождают из твердой фазы в раствор, удаляют защитные группы, и выделяют продукт. Продукты могут быть выделены с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с получением желаемых олигонуклеотидов с высокой степенью чистоты (Verma and Eckstein 1998 *Annu Rev Biochem* 67:99-134).

Экспрессия переменных доменов иммуноглобулиновых цепей, таких как VH и VHH, может быть осуществлена с помощью подходящего экспрессионного вектора в клетке, такой как прокариотическая клетка, такой как бактерии, например, *E.coli* (например, в соответствии с протоколами, раскрытыми в W094/04678, которые включены в настоящее описание путем ссылки и подробно описаны ниже). Экспрессия переменных доменов цепей иммуноглобулинов, таких как VH и VHH, также может быть осуществлена с использованием эукариотических клеток, например, клеток насекомых, клеток CHO, клеток Vero или, предпочтительно, дрожжевых клеток, таких как дрожжи, принадлежащие к роду *Aspergillus*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Hansenula* или *Pichia*. Предпочтительно использовать *S.cerevisiae* (например, в соответствии с протоколами, описанными в W094/025591, которые

включены в настоящее описание путем ссылки и подробно описаны ниже).

В частности, VHH могут быть получены в соответствии со способами, описанными в WO94/04678, с использованием клеток *E.coli* способом, включающим следующие стадии:

а) клонирование в вектор Bluescript (Agilent Technologies) последовательности ДНК или кДНК, кодирующей VHH (например, полученной из лимфоцитов верблюдовых или полученной синтетически), необязательно, включающей His-тег,

б) выделение клонированного фрагмента после амплификации с использованием 5'-праймера, специфичного для VHH, содержащего сайт XhoI, и 3'-праймера, содержащего сайт SpeI, имеющего последовательность

TC TTA ACT AGT GAG GAG ACG GTG ACC TG (SEQ ID NO: 58),

с) клонирование выделенного фрагмента с сохранением рамки в вектор Immuno PBS (Huse et al 1989 *Science* 246 (4935):1275-1281, которая полностью включена в настоящее описание путем ссылки) после расщепления вектора рестрикционными ферментами XhoI и SpeI,

д) трансформация клеток-хозяев, в частности, *E.coli*, путем трансфекции рекомбинантным вектором Immuno PBS из стадии (с),

е) выделение продукта экспрессии VHH-кодирующей последовательности, например, путем аффинной очистки, например, путем хроматографии на колонке со смолой с белком А, катионообменной или никель-аффинной смолой, если VHH включает His-метку.

В альтернативном варианте, переменные домены цепей иммуноглобулинов, такие как VH и VHH, могут быть получены способом, включающим следующие стадии:

а) получение последовательности ДНК или кДНК, кодирующих VHH, имеющего заданный специфичный антигенсвязывающий сайт,

б) амплификации полученной ДНК или кДНК с использованием 5'-праймера, содержащего иницирующий кодон и сайт HindIII, и 3'-праймера, содержащего терминирующий кодон, имеющего сайт XhoI,

с) рекомбинации амплифицированной ДНК или кДНК в HindIII

(позиция 2650) и XhoI (позиция 4067) сайты плазмиды pMM984 (Merchlinsky et al 1983 *J. Virol.* 47:227-232, Faisst et al 1995 *J Virol* 69:4538-4543).

d) трансфекции перmissive клетки, в частности, клеток NB-E (Faisst et al 1995 *J Virol* 69:4538-4543, Faisst et al 1995 *J Virol* 69:4538-4543) с использованием рекомбинантной плазмиды,

e) выделения полученных продуктов.

Кроме того, переменные домены цепей иммуноглобулинов, такие как VHH или VH, могут быть получены с использованием *E.coli* или *S.cerevisiae*, в соответствии со способами, описанными в Frenken et al 2000 *J Biotech* 78:11-21 и W099/23221 (полностью включены в настоящее описание путем ссылки) следующим образом:

После отбора образца крови у иммунизированной ламы и обогащения популяции лимфоцитов на фиколе (нейтральном, высокоразветвленном, высокомолекулярном, гидрофильном полисахариде, который легко растворяется в водных растворах - Pharmacia), центрифугирования в ступенчатом градиенте, выделения тотальной РНК кислотной экстракцией в гуанидинтиоцианате (Chomezynski and Sacchi 1987 *Anal Biochem* 162:156-159) и синтеза первой цепи кДНК (например, с использованием набора для синтеза кДНК, такого как RPN 1266 (Amersham)), фрагменты ДНК, кодирующие фрагменты VH и VHH и часть короткой или длинной шарнирной области, амплифицируют с помощью ПЦР с использованием специфичных праймеров, подробно описанных на страницах 22 и 23 в W099/23221. После расщепления фрагментов ПЦР с помощью PstI и HindIII или BstEII, фрагменты ДНК длиной от 300 до 450 п.о. очищают с помощью электрофореза в агарозном геле и лигируют в фагемидный вектор pUR4536 *E. coli* или episomal экспрессионный вектор pUR4548 *S.cerevisiae*, соответственно. pUR4536 получена из pHEN (Hoogenboom et al 1991 *Nucl Acid Res* 19:4133-4137, которая полностью включена в настоящее описание путем ссылки) и содержит ген lacI^q и уникальные сайты рестрикции, позволяющие клонирование генов VHH и VH ламы. pUR4548 получена из pSY1 (Harmsen et al 1993 *Gene* 125:115-123, которая полностью включена в настоящее описание путем ссылки). Из этой плазмиды, удален сайт BstEII в гене leu2 с помощью ПЦР, и заменены сайты клонирования между

сигнальной последовательностью и терминатором SUC2 для облегчения клонирования фрагментов, кодирующих VH/VNN. VH/VNN имеют с-Мус-тег на С-конце для обнаружения. Индивидуальные колонии *E. coli* JM109 переносят в 96-луночные микротитровочные планшеты, содержащие 150 мкл среды 2TY, содержащей 1%-ю глюкозу и 100 мг/л ампициллина. После роста в течение ночи (при 37°C), планшеты дублируют в среде 2TY, содержащей 100 мг/л ампициллина и 0,1 мМ IPTG. После еще одной инкубации в течение ночи и необязательного замораживания и оттаивания, клетки осаждают центрифугированием, и супернатант может быть использован в ELISA. Индивидуальные колонии *S.cerevisiae* переносят в пробирки, содержащие селективную минимальную среду (содержащую 0,7% дрожжевого азотистого основания, 2% глюкозы с добавлением незаменимых аминокислот и оснований) и выращивают в течение 48 ч при 30°C. После этого культуру разбавляют в десять раз в среде YPGal (содержащей 1% дрожжевого экстракта, 2% бактопептона и 5% галактозы). Через 24 и 48 ч роста клетки осаждают, и культуральный супернатант может быть проанализирован с помощью ELISA. Необязательно, измеряют поглощение при 600 нм (OD600).

Кроме того, варьируемые домены цепей иммуноглобулинов, такие как VH/VNN, могут быть получены с использованием *S.cerevisiae* и с использованием нижеследующей процедуры:

Выделяют природную последовательность ДНК, кодирующую VH/VNN, или получают синтетическую последовательность ДНК, кодирующую VH/VNN, включающие 5'-UTR, сигнальную последовательность, стоп-кодоны, и фланкированные по бокам сайтами SacI и HindIII (такая синтетическая последовательность может быть получена, как описано выше, или, например, ее можно заказать у коммерческого поставщика, такого как Geneart (Life Technologies)).

Используют сайты рестрикции для переноса гена VH/VNN в вектор pUR8569 или pUR8542 для мультикопийной интеграции (MCI) следующим образом. Расщепляют последовательность ДНК, кодирующую VNN, необязательно содержащуюся в челночном векторе, кассете или другой синтетической генной конструкции, и вектор MCI с помощью

SacI и HindIII, используя: 25 мкл ДНК VNN (плазмиды Geneart или MCI-вектора), 1 мкл SacI, 1 мкл HindIII, 3 мкл подходящего буфера для двойного расщепления, такого как буфер NEB1 (New England Biolabs) в течение ночи при 37°C. Разгоняют 25 мкл расщепленной ДНК, кодирующей VNN, и 25 мкл расщепленного вектора MCI на 1,5% агарозном геле в 1xTAE буфере, а затем извлекают ДНК из геля, например, с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen)). Проводят лигирование расщепленного MCI-вектора и расщепленной ДНК, кодирующей VN/VNN, следующим образом: 100 нг вектора, 30 нг гена VNN, 1,5 мкл 10x лигазного буфера, 1 мкл T4-ДНК-лигазы и ddH₂O. Затем проводят лигирование в течение ночи при 16°C.

Затем трансформируют клетки *E.coli*. Для химически компетентных клеток XL-1 Blue, размораживают 200 мкл компетентных клеток XL-1 Blue и добавляют 5 мкл лигазной смеси на льду в течение примерно 30 минут, после чего проводят тепловой шок в течение 90 секунд при 42°C. Затем добавляют 800 мкл среды Лурия-Бертани с низким содержанием солей и 2%-й глюкозой и позволяют клеткам восстановиться в течение 2 часов при температуре 37°C. Клетки высевают на чашку с агаром Лурии-Бертани и ампициллином (100 мкг/мл) и оставляют на ночь при 37°C. Для электрокомпетентных клеток *E.coli* TG1 используют кюветы для электропорации. В кювете для электропорации: размораживают 50 мкл электрокомпетентных клеток TG1 и 1 мкл лигазной смеси на льду в течение приблизительно 15 минут. Помещают кювету в держатель и подают импульс тока. Добавляют 500 мкл среды 2TY и позволяют клеткам восстановиться в течение 30 минут при 37°C. Высевают 100 мкл клеток на чашку с агаром Лурии-Бертани, содержащим ампициллин (100 мкг/мл) и 2% глюкозы. Чашки оставляют при температуре 37°C на ночь.

После клонирования гена VN/VNN в *E.coli*, как подробно описано выше, *S.cerevisiae* могут быть трансформированы линеаризованным MCI-вектором. Перед трансформацией осуществляют некоторые процедуры: (i) форма ДНК должна быть изменена с кольцевой на линейную с помощью гидролиза, иначе ДНК не сможет

встроиться в геном дрожжей; и (ii) расщепленная ДНК должна быть очищена от примесей переосаждением этанолом. Кроме того, в ходе процесса трансформации дрожжевые клетки делают полупроницаемыми, так что ДНК может проходить через мембрану.

Подготовка к трансформации дрожжей: проводят расщепление HpaI мидипрепарата, полученного из выбранной колонии *E. coli*, экспрессирующей ген VN/VNN, следующим образом. Приготавливают 100 мкл раствора, содержащего 20 нг мидипрепарата, 5 мкл HpaI, 10 мкл соответствующего буфера, такого как буфер NEB4 (BioLabs), и ddH₂O.

ДНК расщепляют HpaI при комнатной температуре в течение ночи. Затем выполняют переосаждение этанолом (и сохраняют 5 мкл образца из расщепления HpaI). Добавить 300 мкл 100%-го этанола к 95 мкл расщепленного HpaI мидипрепарата, встряхивают на вортексе и центрифугируют при максимальной скорости в течение 5 минут. Когда присутствует осадок, аккуратно декантируют надосадочную жидкость, добавляет 100 мкл 70%-го этанола, и затем снова центрифугируют в течение 5 минут при максимальной скорости. Повторно декантируют надосадочную жидкость, и образец оставляют при 50-60°C, пока осадок не станет сухим. Ресуспендируют осадок в 50 мкл ddH₂O. Разделяют 5 мкл на геле вместе с 5 мкл образца после расщепления HpaI.

Трансформация дрожжей: подготавливают чашки YNBglu. Используют 10 г агара+425 мл воды (стерильной), 25 мл профильтрованной 20х YNB (3,35 г YNB (дрожжевого азотного основания) в 25 мл стерильной H₂O) и 50 мл стерильной 20%-й глюкозы и разливают по чашкам Петри. Выбирают одну дрожжевую колонию из основной чашки и растят в 3 мл YPD (дрожжевой экстракт, пептон, декстроза) в течение ночи при 30°C На следующий день готовят около 600 мл YPD и разливают по 3 колбам по 275 мл, 100 мл и 225мл YPD. В первую колбу добавляют 27,5 мкл дрожжевой культуры в YPD и осторожно перемешивают. Отбирают 75 мл из первой колбы и переносят во вторую колбу, аккуратно перемешивая. Отбирают 100 мл из второй колбы и переносят в третью, аккуратно перемешивая. Культуру выращивают до достижения OD₆₆₀ между 1 и

2. Разделяют содержимое колбы, достигнувшей этой OD, на 4 пробирки Falcon (центрифужные), приблизительно по 45 мл в каждой. Центрифугируют в течение 2 мин при 4200 об/мин. Надосадочную жидкость сливают. Осадок ресуспендируют в двух пробирках Falcon, в каждой в 45 мл H₂O (снижая количество пробирок с 4 до 2). Центрифугируют в течение 2 мин при 4200 об/мин. Осадок ресуспендируют в 45 мл H₂O (снижая количество пробирок 2 до 1). Центрифугируют в течение 2 мин при 4200 об/мин. Осторожно ресуспендируют осадок в 5 мл ацетата лития (LiAc) (100 мМ), и центрифугируют в течение нескольких секунд. Осторожно удаляют некоторое количество LiAc, сохраняя более половины LiAc в пробирке. Клетки встряхивают на вортексе, ДНК-носитель кипятят в течение 5 минут и быстро охлаждают в воде со льдом. Добавляют в 15-мл пробирку, содержащую: 240 мкл PEG, 50 мкл клеток, 36 мкл LiAc (1 М), 25 мкл ДНК-носителя, 45 мкл осажденных этанолом VN/VNH. Осторожно перемешивают после каждого этапа (отрицательный образец процессируют аналогично, только без осажденных этанолом VN/VNH). Инкубируют в течение 30 минут при 30°C, аккуратно переворачивая пробирку 3-4 раза, после чего клетки подвергают тепловому шоку в течение 20-25 минут при температуре 42°C. Центрифугируют на скорости до 6000 об/мин в течение короткого времени. Осторожно удаляют надосадочную жидкость и добавляют 250 мкл ddH₂O и перемешивают. Клетки высевают штрихом на чашки YNBglu до их высыхания и растят 4-5 дней при температуре 30°C. В конце, подготавливают чашки YNBglu, разделяя их на 6 равных частей, нумеруют части с 1 до 6, отбирают самую большую колонию и штрихуют под номером 1. Повторяют для других колоний от большой к малой с номерами от 1 до 6. Выращивают при 30°C в течение 3-4 дней до получения больших колоний. Клоны VN/VNH выращивают с использованием глюкозы в качестве источника углерода, а индукцию экспрессии VN/VNH осуществляют путем включения Galactose-7-промотора путем добавления 0,5% галактозы. Для тестирования колоний, культивирование проводят в маломасштабном 3-мл объеме, и выбирают одну колонию, имеющую лучшую экспрессию VN или VNH. Эту колонию затем используют в

очистке.

Очистка: VH/VNH очищают с помощью катионообменной хроматографии с сильным анионитом (таким как Capto S). В 1-й день заражают 5 мл среды YPD выбранной дрожжевой колонией, экспрессирующей VH/VNH (среда YP+2% глюкозы), и выращивают клетки в 25-мл закрытых стерильных пробирках при 30°C в течение ночи (при встряхивании при 180 об/мин). На 2-й день, 5 мл ночной культуры разводят в 50 мл свежеприготовленной среды YP+2% глюкозы+0,5% галактозы, выращивают клетки в 250-мл аэрируемых колбах, имеющих ребра, при 30°C в течение двух ночей (при встряхивании при 180 об/мин). На 4-й день клетки осаждают в центрифуге при 4200 об/мин в течение 20 мин. Стадия катионообменной очистки с использованием сильного анионита: подводят pH надосадочной жидкости, содержащей лиганд, до 3,5. 0,75 мл смолы (+/- 0,5 мл суспензии) в расчете на 50 мл супернатанта промывают 50 мл ddH₂O с последующими тремя промывками буфером для связывания. Добавляют промытую смолу к надосадочной жидкости и инкубируют суспензию при 4°C на шейкере в течение 1,5 часа. Осаждают связавшиеся со смолой VH/VNH центрифугированием при 500xg в течение 2 минут и промывают промывочным буфером. Декантируют надосадочную жидкость и ресуспендируют смолу в 10 мл буфера для связывания. В колонку PD-10 помещают фильтр, наливают смолу в колонку, и оставляют смолу оседать в течение некоторого времени, а затем над смолой помещают фильтр. Ожидают, пока не вытечет весь буфер для связывания. VH/VNH элюируют в 6x0,5 мл буфера для элюции. Элюируемые фракции собирают в пробирки Eppendorf (1,5 мл). Концентрацию белка в 6 элюированных фракциях измеряют, используя устройство NanoDrop. Объединяют фракции, содержащие VNH, и переносят раствор в диализную мембрану с отсечкой 3500 Да. Проводят диализ раствора очищенного белка против 3 л PBS в течение ночи при 4°C. На 5-й день проводят диализ раствора очищенного белка против 2 л свежего PBS в течение дополнительных 2 часов при 4°C. В конце рассчитывают конечную концентрацию с помощью BCA-анализа.

Несмотря на то, что описание дано для VH/VNH, описанные выше способы также могут быть использованы для scFv, Fab, Fv и других фрагментов антител, если это необходимо.

Несколько антигенсвязывающих фрагментов (предпочтительно, VH/VNH) могут быть слиты с помощью химической сшивки за счет взаимодействия аминокислотных остатков с органическим агентом, имеющим несколько реакционноспособных групп, таких, как описанные в Blattler et al *Biochemistry* 24:1517-1524 (которая полностью включена в настоящее описание путем ссылки). В альтернативном варианте, антигенсвязывающие фрагменты могут быть слиты генетически на уровне ДНК, т.е. на уровне полинуклеотидной конструкции, которая кодирует конструкцию полного полипептида, содержащего один или несколько антигенсвязывающих фрагментов. Один из способов соединения нескольких антигенсвязывающих фрагментов на уровне гена представляет собой связывание последовательностей, кодирующих антигенсвязывающие фрагменты, либо напрямую, либо с помощью пептидного линкера. Например, карбоксильный конец первого антигенсвязывающего фрагмента может быть связан с аминоконцом следующего антигенсвязывающего фрагмента. Это соединение антигенсвязывающих фрагментов может быть продолжено далее, чтобы получить три-, тетра- и т.д. функциональные конструкции. Способ получения поливалентных (таких, как двухвалентных) VNH-полипептидных конструкций описан в документе WO 96/34103 (полностью включенном в настоящее описание путем ссылки).

Соответственно, полипептид по изобретению (в частности, VNH по изобретению) может быть получен в грибах, таких как дрожжи (например, *S.cerevisiae*), включая выращивание грибов в среде, содержащей источник углерода, где 50-100 масс.% указанного источника углерода представляет собой этанол, в соответствии со способами, описанными в WO02/48382. Крупномасштабное производство VNH-фрагментов в *S.cerevisiae* описано в Thomassen et al 2002 *Enzyme and Micro Tech* 30:273-278 (которая полностью включена в настоящее описание путем ссылки).

В одном аспекте настоящего изобретения предложен способ получения полипептида или конструкции по настоящему изобретению,

включающий следующие стадии:

- i) клонирование в вектор, такой как плазмида, полинуклеотида по изобретению,
- ii) трансформацию клетки, такой как бактериальная клетка или дрожжевая клетка, способной продуцировать полипептид или конструкцию по настоящему изобретению, указанным вектором в условиях, обеспечивающих получение полипептида или конструкции,
- iii) выделение полипептида или конструкции, например, с помощью аффинной хроматографии.

Настоящее изобретение будет теперь дополнительно описано с помощью следующих неограничивающих примеров.

ПРИМЕРЫ

Пример 1: иммунизация лам, фаговый дисплей, отбор и размножение переменных доменов иммуноглобулиновых цепей

1.1 Протокол иммунизации 1

Сначала две ламы (лама 33 и лама 35) получили по 3 инъекции каждая (в дни 0-й, 14-й и 28-й) растворимого человеческого рекомбинантного TNF-альфа (100 мкг вводили внутримышечно, после смешивания в пропорции 1:1 с адъювантом Stimune) с последующими 2 инъекциями (в дни 56-й и 70-й) клетками THP-1, которые были предварительно активированы инкубацией с бактериальным липополисахаридом для усиления экспрессии TNF-альфа на мембране (10^7 клеток THP-1 вводили подкожно в 1 мл PBS). Финальную усиливающую иммунизацию как растворимым TNF-альфа, так и активированными клетками THP-1, проводили на 84-й день, и через 9 дней отбирали кровь для выделения лимфоцитов периферической крови и экстракции РНК для создания библиотеки.

1.2 Протокол иммунизации 2

После отдыха в течение четырех месяцев ламы были повторно иммунизированы двумя инъекциями с недельным интервалом клетками CHO Flp-In, которые были сконструированы для экспрессии нерасщепляемой трансмембранной формы TNF-альфа человека. Через две недели отбирали кровь для выделения лимфоцитов периферической крови и экстракции РНК для конструирования библиотек. Сывороточные иммунные ответы на иммунизацию оценивали для каждой лампы в нескольких временных точках, измеряя

связывание антител, содержащих только тяжелые цепи, с иммобилизованным TNF-альфа человека с использованием ELISA в планшетном формате и детекции кроличьей поликлональной сывороткой к варибельному домену и ослиными антителами к кроличьим IgG, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP). Полученные кривые титрования показали, что каждая из лам отвечала на первый раунд иммунизации, давая высокие титры связывающих TNF-альфа антител, состоящих из тяжелых цепей IgG. Повышенные титры антител в сыворотке крови также были отмечены после второго раунда иммунизации, хотя они были несколько ниже для обоих животных.

1.3 Конструирование фаговых библиотек

Клетки крови, собранные у каждой ламы в конце каждой фазы иммунизации, были использованы для создания четырех отдельных фаговых библиотек (#33, #35, #33NEW и #35NEW). Суммарную РНК экстрагировали из лимфоцитов периферической крови, которые были выделены у каждой из иммунизированных лам (ламы 33 и 35). РНК затем использовали для создания кДНК с использованием обратной транскриптазы и праймеров или случайных октамерных олигонуклеотидов. Затем проводили ПЦР для амплификации только области варибельного домена тяжелой цепи только антител, с использованием подходящих праймеров. Фрагменты кДНК, кодирующие репертуар варибельных доменов, клонировали в фагмидный вектор, и получали библиотеку в *E.coli*. Фаги выделяли из бактерий, содержащихся в библиотеке, путем заражения соответственно 40 и 51 мкл раствора в глицерине 50 мл среды, содержащей глюкозу и ампициллин. Когда культуры находились в лог-фазе, добавляли хелперный фаг для заражения культуры и получения фагов. На следующий день полученные фаги осаждали из супернатанта культуры с использованием раствора ПЭГ/NaCl. Количество фагов определяли титрованием раствора и заражением *E.coli* TG1 в лог-фазе с использованием различных разведений фагов. Наибольшее разведение, которое еще приводит к образованию колоний, использовали для расчета фаговых титров. Для селекции на sTNF-альфа (растворимом TNF-альфа), стерильные 96-луночные (например,

Maxisorp) планшеты покрывали в течение ночи при 4°C в количестве 1000, 250 или 63 нг/лунку или только PBS. На следующий день лунки планшета блокировали 4%-м Marvel в PBS, затем в лунки добавляли осажденные фаги, которые были предварительно проинкубированы с 2% Marvel/PBS. После тщательной промывки PBS-Tween и PBS, связанные фаги элюировали либо с использованием шока щелочным pH (в 0,1 М триэтиламине) в течение 15 минут и нейтрализации 1 М Трис-HCl, pH 7,5 (общая элюция), либо с помощью конкурентной элюции, используя 10-кратный избыток TNF-рецептора, в течение двух часов. Количество элюированных фагов определяли титрованием элюатов из различных лунок с последующим заражением *E.coli* TG1 в лог-фазе. Около половины элюированных фагов были выделены путем заражения TG1 в лог-фазе и отбора в среде, содержащей ампициллин и глюкозу.

1.4 Отбор из библиотеки фагов, способных связываться с TNF-альфа человека и яванского макака

Вариабельные домены с TNF-альфа антагонистической активностью были выделены из четырех библиотек фагового дисплея путем связывания фагов с TNF-альфа человека с последующим элюцией TNF-альфа-специфичных вариабельных доменов избытком растворимого слитого белка TNFR2-Fc (этанерцепта) или ступенчатой элюцией. Затем проводили второй раунд отбора путем связывания элюированных фагов, специфичных к TNF-альфа человека, с TNF-альфа яванского макака, так что можно было получить пул вариабельных доменов с межвидовой TNF-альфа-связывающей активностью.

1.4.1 Первый раунд скрининга фаговых библиотек, представляющих вариабельные домены, связывающие TNF-альфа человека

Фаговые библиотеки были получены из лампы 33 и лампы 35 для каждой стадии иммунизации (первая стадия иммунизации: библиотека #33 и библиотека #35; вторая стадия иммунизации: библиотека #33NEW и библиотека #35NEW). Первый раунд отбора проводили, чтобы выделить фаги, представляющие вариабельные домены с TNF-альфа-связывающей активностью, путем отбора на TNF-альфа

человека.

Растворимый рекомбинантный TNF-альфа человека (1000, 250 или 63 нг/лунку) вносили прямо в лунки гидрофилизированного полипропиленового микролуночного (HPM) планшета (например, Nunc MaxiSorp), и фагам позволяли прикрепиться. После тщательной промывки связанные фаги собирали с использованием либо (i) неселективной элюции с помощью шока щелочным pH, либо (ii) путем селективного замещения TNF-альфа-связанных фагов с помощью добавления TNFR2-Fc (этанерцепта в концентрации 100, 25 и 6,3 мкг/мл на 2 ч).

Библиотека #33 и библиотека #35 - число фагов, элюированных из контрольных лунок (без TNF-альфа и PBS-контрольных), было низким, и для обеих библиотек наблюдалось концентрационно зависимое обогащение фагов, элюированных из лунок, которые были предварительно покрыты TNF-альфа, с использованием любого из способов элюции. В целом, обогащение TNF-связывающих фагов, достигаемое в первом раунде отбора, было примерно 100-кратным для обеих библиотек #33 и #35.

Библиотека #33NEW и библиотека #35NEW - было обнаружено, что число клонов, выделенных из первых раундов отбора из библиотек, полученных из повторно иммунизированных лам, было низким. Это, возможно, отражает более низкий иммунный ответ лам на клетки mTNF-альфа-CHO (меньшее число TNF-альфа-реактивных клонов в общем), или реакция привела к образованию mTNF-альфа-реактивных клонов, но лишь ограниченное число из них перекрестно взаимодействует с растворимой формой TNF-альфа. Фаги, элюированные в первом раунде отбора с TNFR2-Fc (этанерцептом) из лунок, покрытых 1000 нг/мл TNF-альфа человека, были размножены, дав суспензии с титрами примерно 2×10^{12} фагов/мл.

1.4.2 Второй раунд отбора фагов, представляющих вариабельные домены цепей иммуноглобулинов, связывающихся с TNF- альфа человеком и яванского макака

Библиотека #33 и библиотека #35 - второй раунд отбора был проведен путем связывания отобранных фагов с растворимым TNF-альфа человека или яванского макака (500, 125 или 31 нг/лунку

или PBS), который был предварительно сорбирован на поверхности лунок НРМ-планшета. Фаги, связавшиеся с TNF-альфа человека, элюировали растворимым TNFR2-Fc (50, 12,5 и 3,1 мкг/мл, соответственно), тогда как фаги, связавшиеся с TNF-альфа яванского макака, элюировали с использованием шока щелочным pH. Выделение фагов после отбора на TNF-альфа яванского макака было более низким, чем для TNF-альфа человека, возможно, из-за более низкой частоты встречаемости в обеих библиотеках фагов, экспрессирующих переменные домены, которые являются перекрестно-реактивными с TNF-альфа как человека, так и яванского макака.

Библиотека #33NEW и библиотека #35NEW – второй раунд отбора был проведен путем связывания отобранных фагов с растворимым TNF-альфа яванского макака (1000, 250 или 63 нг/лунку или PBS), который был предварительно сорбирован на поверхности лунок НРМ-планшета. Связанные фаги элюировали с использованием шока щелочным pH.

Пример 2: первичная оценка периплазматических супернатантов из случайно отобранных клонов переменных доменов иммуноглобулиновых цепей

2.1 Размножение и получение периплазматических экстрактов для первичной оценки

Фаги, присутствующие в элюатах после первого раунда отбора на TNF-альфа человека и второго раунда отбора на TNF-альфа яванского макака, использовали для инфицирования клеток *E.coli* TG1. Колонии отбирали случайным образом (186 клонов из библиотек #33 и #35 в мастер-планшетах M60-M63; 96 клонов из библиотеки #33NEW и библиотеки #35NEW в мастер-планшете M65) и размножали для получения периплазматических супернатантов путем последовательного центрифугирования, ресуспендирования в 1×PBS, разрушения замораживанием-размораживанием и центрифугирования размноженных культур (M60-63 и M65, также указанных как «MP60-63» и «MP65» соответственно; периплазматические супернатанты также называются периплазматическими фракциями (PF) или экстрактами).

Периплазматические экстракты скринировали для проверки их способности к (i) ингибированию связывания растворимого TNF-альфа человека с TNFR2-Fc в ELISA-планшете и (ii) нейтрализации TNF-альфа-индуцированной цитотоксичности в анализе на L929 с фиксированной концентрацией. В анализе на L929 полагают, что цитотоксический эффект TNF-альфа (0,5 нм/мл) опосредован TNFR1, поэтому, ожидается, что вариабельные домены с ингибиторной активностью в обоих анализах (анализе связывания TNF-альфа с TNFR2 и анализе на L929) подавляют TNF-альфа-ответы, опосредованные любым рецептором.

2.2.1 Оценка связывания с TNF-альфа и нейтрализующей активности (мастер-планшеты M60-M63)

Анализ цитотоксичности на клетках L929 и ELISA проводили на всех 186 периплазматических фракциях, полученных из клонов, отобранных из библиотеки #33 и библиотеки #35. Клоны были распределены по 4 мастер-планшетах M60, M61, M62 и M63, и периплазматические фракции получали из этих мастер-планшетов. M60-61 содержали клоны, случайным образом отобранные из библиотек #33 и #35. M62-63 содержали клоны, отобранные из тех же библиотек после выполнения 2 последовательных стадий отбора следующим образом: (i) 10 мкг/мл hsTNF-альфа и этанерцепт для элюции; (ii) hsTNF-альфа (5 мкг/мл и 0,3 мкг/мл) или sTNF-альфа яванского макака (5 мкг/мл и 0,3 мкг/мл), с последующими либо селективной элюцией этанерцептом или полной элюцией триэтиламином. Все 186 периплазматических фракций анализировали с помощью концентрационно независимого анализа цитотоксичности на L929 с использованием резазурина.

2.2.2 Скрининг периплазматических супернатантов с помощью ELISA (мастер-планшеты M60-63)

Концентрация TNF-альфа, используемая для скрининга, составляла 1,25 нг/мл. Периплазматические супернатанты анализировали в разбавлении 1/20 (M60 и M61) или в разбавлении 1/10 (M62 и M63) в 1%-м BSA. TNF-альфа и периплазматические супернатанты были приготовлены с концентрацией в два раза выше необходимой для анализа, а затем их смешивали в соотношении 1:1. Для каждого супернатанта анализ проводился в трипликатах. Кроме

того, в качестве положительного контроля нейтрализующих антител использовали адалимумаб в концентрации 10 нМ. На каждом планшете ELISA также были включены точки для кривой доза-ответ (0-5 нг/мл) с лимитирующим TNF-альфа. ELISA-планшеты для анализа периплазматических супернатантов покрывали в течение ночи этанерцептом в количестве 0,7 мкг/мл, 50 мкл/лунку. После промывки и блокировки, добавляли смеси TNF-альфа и супернатанта и инкубировали в течение 2 ч. ELISA проявляли с использованием биотинилированного поликлонального кроличьего антитела к TNF-альфа человека, например, BAF210 (R&D Systems) при концентрации 0,2 мкг/мл с последующим добавлением mAvidin-HRP, а затем TMB.

Ни один из клонов на M60 или M61 не имел какой-либо значительной нейтрализующей активности в отношении TNF-альфа (все клоны показали около или менее 10% нейтрализации TNF-альфа). В противоположность этому, адалимумаб дал почти полное ингибирование в ELISA на всех планшетах, где он был включен. Многие из клонов на M62 (полученных из библиотеки 33) показали хорошую нейтрализацию TNF-альфа (11 клонов достигали 90% или большего % нейтрализации, и 45 клонов достигали 50% или большего % нейтрализации). Несколько хорошо нейтрализующих клонов также были обнаружены на M63 (полученной из библиотеки 35), но цифры были значительно ниже, чем для M62, даже несмотря на то, что способы отбора были идентичны (2 клон, достигающих 90% или большего % нейтрализации, и 7 клонов, достигающих 50% или большего % нейтрализации).

2.2.3 Скрининг периплазматических супернатантов (PS) в анализе цитотоксичности на L929 с фиксированной концентрацией (мастер-планшеты M60-M63)

Материалы

- клетки L929 (10000 клеток/лунку)
- фиксированная концентрация TNF-альфа человека в анализе: 500 пг/мл
- концентрация актиномицина D: 0,75 мкг/мл
- PS из мастер-планшетов M60-M63, разбавленные в тесте 1:10
- очищенный анти-TNF-альфа VHH в качестве положительного контроля: конечная концентрация 250 нМ

- короткая кривая доза-ответ для TNF-альфа человека: 500, 125, 31,25, 7,8 пг/мл
 - время инкубации: 24 ч
 - реагент для оценки жизнеспособности клеток: резазурин
- Способ

10000 клеток/лунку в 100 мкл высевали на 0-й день в 96-луночные микро-планшеты в полной среде DMEM и инкубировали в течение ночи при 37°C, 5% CO₂. На 1-й день подготавливали планшеты для разбавления (с объемами, достаточными для трех повторов (трипликатов) для каждой точки), и, кроме того, каждый планшет содержал в качестве контроля:

1. Полную среду DMEM+0,01% Triton X-100
2. Полную среду DMEM+0,75 мкг/мл актиномицина D
3. Кривую доза-ответ TNF-альфа+0,75 мкг/мл актиномицина D

Среду удаляли из каждой лунки микропланшета, и клетки инкубировали с 100 мкл полной среды DMEM, содержащий hTNF-альфа при 500 пг/мл+0,75 мкг/мл актиномицина D+PS (1:10) или по 100 мкл различных контролей. Через 24 ч инкубации при 37°C с 5% CO₂ в каждую лунку добавляли по 10 мкл резазурина, и клетки инкубировали в течение 2 ч при 37°C и 5% CO₂. Затем в каждую лунку добавляли по 50 мкл 3%-го SDS. Затем планшеты считывали на флуоресцентном планшетном ридере при возбуждении (Ex) 544 нм/эмиссии (Em) 590 нм.

Результаты

Ни один из периплазматических супернатантов M60-61 не показал защитное действие на клетках L929 в отношении TNF-альфа человека. Положительный контроль показал защиту от действия TNF-альфа, в то время как неспецифичные VNH этого не демонстрировали. Несколько периплазматических супернатантов из отобранных клонов M62-63 показали защитное действие на клетки L929 в отношении TNF-альфа (107 клонов, дающих 50% или больший % выживаемости). Положительный контроль показал нейтрализацию TNF-альфа (большую или равную 100%), в то время как неспецифичные VNH показывали менее 10% нейтрализации TNF-альфа.

2.3 Оценка активности связывания и нейтрализации TNF-альфа

(мастер-планшет M65)

Анализы ELISA и цитотоксичности на L929 проводили для M65 таким же образом, как описано выше в отношении M60-M63, если не указано иное.

2.3.1 Скрининг периплазматических супернатантов с помощью ELISA (мастер-планшет M65)

Периплазматические супернатанты из M65, содержащего клоны TNF-альфа-специфичных переменных доменов (всего 96), анализировали на ингибирование связывания TNFR-2 и TNF-альфа с помощью ELISA как сразу после размораживания, так и после инкубации в течение 18 ч при 37°C.

ELISA-планшеты покрывали этанерцептом 2 мкг/мл, 50 мкл/лунку при 4°C в течение ночи, промывали и затем блокировали в процессе подготовки для инкубации со смесями переменного домена TNF-альфа. Адалимумаб использовали в концентрации 10 нМ в качестве положительного контроля. Периплазматические супернатанты анти-TNF-альфа переменных доменов первоначально разводили 1:10 в 1%-м BSA, а затем смешивали 1:1 с 2,5 нг/мл TNF-альфа и добавляли в ELISA-планшеты. Последующий процессинг ELISA соответствовал протоколу, описанному выше в отношении M60-63.

Двадцать восемь супернатантов дали более 80% ингибирования связывания с TNF-альфа, из которых 18 сохранили большую часть или всю ингибирующую активность после инкубации при 37°C.

2.3.2 Скрининг периплазматических супернатантов с помощью анализа цитотоксичности на L929 (мастер-планшет M65)

Анализ цитотоксичности на L929 проводили в общем на 96 периплазматических супернатантах (PS), полученных из клонов, отобранных из 2 библиотек фагового дисплея (M65 - из #33NEW и #35NEW). Эти клоны были отобраны после выполнения (i) первого раунда отбора на hTNF-альфа (10 мкг/мл), этанерцепта и ТЕА для элюции, и (ii) второго раунда отбора на sTNF-альфа яванского макака (10 мкг/мл) с последующей полной элюцией с помощью триэтиламина. Все 96 PS были проанализированы с помощью анализа цитотоксичности на L929 с использованием резазурина.

Материалы

- клетки L929 (10000 клеток/лунку)
- фиксированная концентрация TNF-альфа человека для анализа: конечная концентрация 500 пг/мл
- разбавление PS в анализе: 1:10
- очищенный анти-TNF-альфа VHH в качестве положительного контроля: конечная концентрация 250 нМ
- супернатанты из M65
- короткая кривая доза-ответ для TNF-альфа человека: 500, 125, 7,8 пг/мл
- время инкубации: 22 ч
- реагент для оценки жизнеспособности клеток: резазурин

Способ

10000 клеток/лунку в 100 мкл высевали в 0-й день в 96-луночные микропланшеты Costar в полной среде DMEM и инкубировали в течение ночи при 37°C и 5% CO₂. На 1-й день подготавливали планшеты для разбавления (с объемами, достаточными для трипликатов для каждой точки) и, кроме того, каждый планшет содержал в качестве контроля:

1. Полную среду DMEM+0,01% Triton X-100
2. Полную среду DMEM+0,75 мкг/мл актиномицина D
3. Кривую доза-ответ TNF-альфа+0,75 мкг/мл актиномицина D

Среду удаляли из каждой лунки микропланшета, и клетки инкубировали с 100 мкл полной среды DMEM, содержащей hTNF-альфа в концентрации 500 пг/мл+0,75 мкг/мл актиномицина D+ПС (1:10) или со 100 мкл различных контролей. После 22 ч инкубации при 37°C, в каждую лунку добавляли по 10 мкл резазурина, и клетки инкубировали в течение 2 ч при 37°C, 5% CO₂. Затем в каждую лунку добавляли по 50 мкл 3%-го SDS. Затем планшеты считывали на флуоресцентном планшетном ридере при Ex544 нм/Em590 нм.

Множество периплазматических супернатантов из отобранных клонов из M65 показали защитное действие на клетки L929 в отношении h-TNF-альфа. Для 9 клонов, обработка периплазматическими фракциями показала более чем 120%-ю выживаемость клеток L929. В общей сложности 53 клон из 96

показали более чем 50%-ю нейтрализующую активность в отношении TNF-альфа в анализе на L929, и среди них 32 клон давали почти полную нейтрализацию.

2.3.3 Устойчивость к инаktivации трипсином и химотрипсином

Супернатанты (и очищенные образцы) были испытаны на устойчивость клонов переменных доменов к инаktivации трипсином и химотрипсином исходя из сохранения их TNF-связывающей активности в TNF-TNFR2 ELISA.

Способ

Трипсин и химотрипсин растворяли отдельно (в половине конечного объема) в 1 мМ Трис-HCl pH 8,0, 20 мМ CaCl₂ и затем смешивали вместе, чтобы получить конечную концентрацию, равную 3 мг/мл для каждого (3-кратная концентрация относительно используемой в анализе). 20 мкл каждого периплазматического экстракта инкубировали с 10 мкл PBS (неращепленный образец) или с 10 мкл 3 мг/мл смеси трипсина+химотрипсин (ращепленный образец) в течение 75 мин при 37°C. В каждый образец добавляли по 30 мкл охлажденного на льду 2х стоп-раствора для протеаз (2% BSA, 1хPBS, 5 мМ NaETDA, 4 мМ AEBSF, 0,6 мкМ апротинин, 260 мкМ бестатин, 2 мМ ЭДТА, 28 мкМ E-64, 2 мкМ лейпептин, 1 мМ PBSF), и затем к каждому образцу добавляли по 140 мкл 1х PBS, 1% BSA, чтобы достичь конечного 1:10 разбавления периплазматических экстрактов. Для каждого очищенного образца получали диапазон концентраций, включая верхнюю концентрацию 3 мкМ в 1% BSA. 10 мкл очищенного образца инкубировали с 10 мкл смеси трипсина и химотрипсина (или PBS для неращепленного образца) и 10 мкл трипсинового/химотрипсинового буфера. Периплазматические и очищенные образцы хранили в течение ночи при температуре -80°C и тестировали на следующий день в TNFR-2-TNF-альфа ELISA-анализе. ELISA-планшеты покрывали этанерцептом 0,7 мкг/мл, 50 мкл/лунку в течение ночи, промывали и затем блокировали в процессе подготовки к инкубации с образцами анти-TNF-альфа переменных доменов. Образцы анти-TNF-альфа переменных доменов смешивали 1:1 с 5 нг/мл h-TNF-альфа (чтобы получить концентрацию TNF-альфа в анализе 2,5 нг/мл, и образцы, разведенные 1:20) и добавляли по

50 мкл каждого образца в планшеты ELISA. После инкубации при 4°C, ELISA-планшеты промывали и инкубировали с 0,2 мкг/мл биотинилированного поликлонального кроличьего анти-h-TNF-альфа антитела в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем ELISA-планшеты промывали, инкубировали с разведенным 1:1000 конъюгатом модифицированного-авидина-HRP (mAvidin-HRP) (mAvidin, например, ExtrAvidin® (Sigma), представляет собой модифицированную форму яичного авидина, который сохраняет высокое сродство и специфичность авидина в отношении биотина, но не дает неспецифического связывания при физиологическом pH, которое наблюдается для авидина) в течение 1 ч при комнатной температуре, промывали еще раз, и к каждому образцу добавляли по 100 мкл ELISA-субстрата (TMB). Через 30 мин реакцию останавливали с помощью 50 мкл 0,5 М H₂SO₄, и оптическую плотность в лунках планшетов ELISA измеряли при длине волны 450 нм.

Результаты

11 переменных доменов (Q65B1-Q65F6) были из периплазматических супернатантов, и 4 переменных домена (Q62F2-Q62F11) были из очищенных образцов. Было обнаружено, что 10 переменных доменов в периплазматическом супернатанте и 2 очищенных переменных домена имеют хорошую или отличную устойчивость к трипсину и химотрипсину. Позже было найдено, что 10 из этих переменных доменов принадлежат к одному семейству (семейство 1, см. часть 2.4 ниже), и позже было найдено, что 2 из этих переменных доменов принадлежат к одному семейству (семейство 2, см. часть 2.4 ниже). Q62F11, который не относился ни к семейству 1, ни к семейству 2, не имел резистентности к протеазам. Результат с Q62F10, как полагают, наблюдался вследствие ошибки эксперимента (фиг.1).

2.4 Итоги первичной оценки

M62 и M63: из первоначально отобранных 186 клонов, 52 периплазматических супернатанта показали большую или равную 50% нейтрализацию человеческого растворимого TNF-альфа в анализе на цитотоксичность на клетках L929, а также большее или равное 50%

ингибирование связывания TNF-альфа-TNFR2 в анализе ELISA. Анализ последовательности, выполненный для 25 клонов переменных доменов с максимальной нейтрализующей активностью, показал, что они могут быть сгруппированы по семействам. Представительные клоны были отобраны из различных семейств. Последовательности ДНК переменных доменов были повторно клонированы для экспрессии на высоком уровне в *E.coli*, и были получены очищенные переменные домены для более детальной оценки.

М65: из первоначально отобранных 96 клонов, 53 периплазматических супернатанта показали более чем 50%-ю нейтрализующую активность в отношении человеческого растворимого TNF-альфа в анализе на цитотоксичность на клетках L929, а также большее или равное 50% ингибирование связывания TNF-альфа-TNFR2 в анализе ELISA, причем 32 периплазматических супернатанта показали практически полную нейтрализацию в обоих анализах. Для того, чтобы идентифицировать наиболее стабильные клоны, периплазматические супернатанты (всего 96) были проанализированы на ингибирование связывания TNFR-2-TNF-альфа в ELISA сразу после размораживания и после инкубации в течение 18 ч при 37°C. Восемнадцать супернатантов сохранили практически полную или полную ингибирующую активность в отношении связывания TNFR-2-TNF-альфа. Наиболее активные периплазматические супернатанты (28/96) были затем отобраны для проверки на ингибирование цитотоксичности L929, индуцированной TNF-альфа яванского макака. Анализ последовательностей, выполненный для 36 клонов переменных доменов с самой большой нейтрализующей TNF-альфа активностью и устойчивостью к протеазам, показал, что они могут быть сгруппированы с переменными доменами, полученными из М62 и М63, в семейства. Типичные полученные из М65 клоны были отобраны из различных семейств. Последовательности ДНК переменных доменов были повторно клонированы для экспрессии в *E.coli*, и были получены очищенные переменные домены для более детальной оценки.

Пример 3: оценка очищенных рекомбинантных переменных доменов, полученных в *E.coli*

3.1 Получение выбранных клонов переменных доменов в *E.coli*

ДНК-последовательности переменных доменов, отобранных из M62, M63 и M65, были повторно клонированы для получения в *E.coli*, а затем проэкспрессированные переменные домены были очищены следующим образом.

Отобранные переменные домены были субклонированы из фагмидного вектора в экспрессионную плазмиду pMEK222 (pMEK222 является версией фагмиды pUR8100 с удаленным *gene3*, в которой за клонированным переменным доменом следуют теги с-Мус и 6His, два стоп-кодона и последовательность терминатора из M13 (см. WO2013/064701)). Гены переменных доменов расщепляли с помощью SfiI и Eco91I и лигировали в pMEK222, расщепленную теми же рестриктазами. Штамм *E.coli* BL21 DE3 трансформировали лигатами и высевали на LB-чашки с агаром и добавленными ампициллином и 2%-й глюкозой. Трансформантов скринировали с использованием ПЦР на колониях. Амплификация с использованием праймеров M13.rev (SEQ ID NO: 81) и M13.fw (SEQ ID NO: 82) показывала образование плазмид, содержащих вставки 700 п.о. и приблизительно 350 п.о. (пустые плазмиды), наблюдаемых с помощью ПЦР.

Переменные домены получали из pMEK222 путем заражения свежей ночной культуры при разбавлении 1/100 800 мл 2X среды YT, содержащей 0,1% глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина, и культивированием в течение 2 ч при 37°C. После чего добавляли 1 мМ изопропил-бета-D-1-тиогалактопиранозид (IPTG), и культуру растили еще в течение 5 ч при 37°C. Бактерии собирали центрифугированием и ресуспендировали в 30 мл PBS. Бактерии замораживали при -20°C в течение ночи. Бактерии размораживали при комнатной температуре и фракционировали центрифугированием. К растворимой фракции, которая содержит переменный домен, добавляли Co²⁺-агарозные шарики, например, смолу Talon (Thermo Scientific), чтобы связать His-меченый переменный домен. После промывания шариков, связавшиеся переменные домены элюировали PBS с добавлением 150 мМ имидазола. Наконец, фракцию, содержащую переменные домены, диализовали против PBS, чтобы удалить

имидазол.

TNF-альфа-нейтрализующую активность очищенных переменных доменов оценивали несколькими методами анализа *in vitro*, чтобы оценить эффективность в отношении растворимых и мембранных форм TNF-альфа человека и растворимого TNF-альфа яванского макака.

3.2 Ингибирование TNF-альфа-индуцированной цитотоксичности на клетках клеток L929

Анализ переменных доменов на TNF-альфа-нейтрализующую активность проводили с использованием мышинной клеточной линии L929 и биологического ответа, основанного на индукции цитотоксичности растворимым TNF-альфа человека (или яванского макака). Клетки L929 (10000 клеток/лунку) культивировали в течение 24 ч в присутствии растворимого TNF-альфа (500 пг/мл) и актиномицина D (0,75 мкг/мл) вместе с разведениями очищенных переменных доменов. В конце эксперимента цитотоксичность определяли, используя резазурин. Ингибирование индуцируемой растворимым TNF-альфа человека цитотоксичности в отношении мышинных клеток L929 проверяли для определения TNF-альфа-нейтрализующей активности каждого из полученных в *E. coli* рекомбинантных переменных доменов серий Q62, Q63 и Q65 в отношении TNF человека и яванского макака.

3.2.1 Очищенные переменные домены иммуноглобулиновых цепей, отобранные из M62 и M63

Материалы

- клетки L929 (10000 клеток/лунку)
- стерильные полипропиленовые 96-луночные планшеты
- фиксированная концентрация h-TNF-альфа в анализе: 500 пг/мл
- концентрация актиномицина D: 0,75 мкг/мл
- очищенные переменные домены (из мастер-планшетов 62-63), включая Q62F2, Q62F1 1, Q62E10, Q62F10
- диапазон разведений очищенных переменных доменов: 300 нМ - 5 рМ (разведения 1:3)
- кривая доза-ответ для TNF-альфа человека: 3 нг/мл - 0,5 мкг/мл
- кривая доза-ответ для TNF-альфа яванского макака: 10

нг/мл - 0,2 пг/мл

- кривая доза-ответ для адалимумаба: 10 нМ - 0,5 пМ
- время инкубации: 22 ч
- реагент для оценки жизнеспособности клеток: резазурин

Способ

10000 клеток/лунку в 100 мкл высевали в 0-й день в 96-луночные микропланшеты в полной среде DMEM и оставляли на ночь при 37°C в 5% CO₂. В 1-й день приготавливали планшеты для разбавления (с объемами, достаточными для трипликатов для каждой точки), и, кроме того, каждый планшет содержал в качестве контроля:

1. Полную среду DMEM+0,75 мкг/мл актиномицина D
2. Полную среду DMEM+0,75 мкг/мл актиномицина D+0,5 нг/мл h-TNF-альфа
3. Полную среду DMEM+0,01% Triton X-100 (только в планшете, содержащем кривую доза-ответ для Cyno-TNF-альфа (яванского макака)).
4. Полную среду DMEM (только в планшете, содержащем кривую доза-ответ для Cyno-TNF-альфа, h-TNF-альфа и адалимумаба)

Среду удаляли из каждой лунки микропланшетов, и клетки инкубировали со 100 мкл каждого разбавления переменных доменов или со 100 мкл различных контролей. Через 22 ч инкубации при 37°C с 5% CO₂ в каждую лунку добавляли по 10 мкл резазурина, и клетки инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Затем в каждую лунку добавляли по 50 мкл 3%-го SDS. Затем планшеты считывали на флуоресцентном планшетном ридере при Ex544 нм/Em590 нм.

3.2.2 Очищенные переменные домены иммуноглобулиновых цепей, отобранные из M65

Материалы

- клетки L929 (10000 клеток/лунку)
- стерильные полипропиленовые 96-луночные планшеты
- DMEM
- концентрации TNF-альфа человека: 500 пг/мл
- концентрация TNF-альфа яванского макака: 500 пг/мл
- концентрация актиномицина D: 0,75 мкг/мл

- очищенные переменные домены из M65, включая Q65D1, Q65D3, Q65B1, Q65C7, Q65A3, Q65E12, Q65F6
- диапазон разведений очищенных переменных доменов: 300 нМ - 5 пМ (разведения 1:3)
- кривые доза-ответ для TNF-альфа человека и TNF-альфа яванского макака: 10 нг/мл - 0,5 пг/мл
- кривая доза-ответ для адалимумаба: 10 нМ - 0,5 пМ
- время инкубации: 22 ч
- реагент для определения жизнеспособности клеток: резазурин

Способ

10000 клеток/лунку в 100 мкл высевали в 0-й день в 96-луночные микропланшеты в полной среде DMEM, и оставляли на ночь при 37°C и 5% CO₂. В 1-й день готовили серийные разведения 1:3 (в DMEM+Act.D+TNF) для каждого очищенного переменного домена (с объемами, достаточными для трипликатов для каждой точки), начиная с верхней концентрации 300 нМ. Для адалимумаба верхняя используемая концентрация составляла 10 нМ.

В планшеты добавляли следующие контроли:

1. Полную среду DMEM+0,75 мкг/мл актиномицина D
2. Полную среду DMEM+0,75 мкг/мл актиномицина D+0,5 нг/мл h-TNF-альфа (человека) или cyno-TNF-alpha (яванского макака)
3. Полную среду DMEM+0,01% Triton X-100 (только в планшете, содержащем кривые доза-ответ для TNF-альфа).
4. Полную среду DMEM (только в планшетах, содержащем кривые доза-ответ для TNF-альфа)

Среду удаляли из каждой лунки микропланшетов, и клетки инкубировали со 100 мкл каждого разбавления переменных доменов или со 100 мкл различных контролей. Через 22 ч инкубации при 37°C с 5% CO₂ в каждую лунку добавляли по 10 мкл резазурина, и клетки инкубировали в течение 2 ч при 37°C. Затем в каждую лунку добавляли по 50 мкл 3%-го SDS. Затем планшеты считывали на флуоресцентном планшетном ридере при Ex544 нм/Em590 нм.

3.2.3 Результаты анализа цитотоксичности на клетках L929

Таблица 1(a)

Клоны анти-TNF-альфа, полученные из M62 и M63: ингибирование индуцированной TNF человека и яванского макака цитотоксичности в отношении клеток L929

Идентификационный номер клона	Семейство	Ингибирование индуцированной TNF человека и яванского макака цитотоксичности в отношении клеток L929, EC50 (нМ)	
		TNF человека	TNF яванского макака
Q62F2	1	1	0,8
Q62F11	–	6	1,5
Q62E10	2	0,2	<0,1
Q62F10	2	2	1,3

Таблица (1b)

Клоны анти-TNF-альфа, полученные из M65: ингибирование индуцированной TNF человека и яванского макака цитотоксичности в отношении клеток L929

Идентификационный номер клона	Семейство	Ингибирование индуцированной TNF человека и яванского макака цитотоксичности в отношении клеток L929, EC50 (нМ)	
		TNF человека	TNF яванского макака
Q65D3	1	0,15	0,1
Q65D1	1	0,1	0,06
Q65B1	1	0,04	0,01
Q65C7	1	0,15	0,03
Q65A3	2	0,15	0,04
Q65E12	2	4	4
Q65F6	2	1,5	1
адалимумаб		0,1	0,04

Можно видеть, что переменные домены, принадлежащие к семейству 1, как правило, показывают чрезвычайно эффективное ингибирование цитотоксичности, индуцированной TNF как человека, так и яванского макака, и переменные области, принадлежащие к семейству 2 также, как правило, показывали очень эффективное

ингибирование цитотоксичности, индуцированной TNF как человека, так и яванского макака. Ряд переменных доменов имел показатели, аналогичные адалимумабу.

3.3 Ингибирование связывания между TNF и TNFR2 (очищенными переменными доменами иммуноглобулиновых цепей, отобранными из M65)

Планшеты Maxisorb покрывали этанерцептом (50 мкл/лунку при концентрации 0,7 мкг/мл). Переменные домены разводили и смешивали с TNF-альфа человека или яванского макака (1,25 нг/мл), чтобы позволить связывание перед добавлением в ELISA-планшеты. TNF-альфа, связавшийся с этанерцептом, детектировали биотинилированными поликлональными кроличьими анти-TNF-альфа антителами (0,2 мкг/мл) и mAvidin-HRP с последующим добавлением TMB, и определяли уровень конкуренции переменных доменов за связывание TNF-альфа с этанерцептом. Определенные переменные домены были способны связываться с TNF-альфа человека и яванского макака, что приводило к ингибированию взаимодействия TNF-альфа и TNFR2.

3.3.1 Результаты анализов связывания TNF-TNFR2

Таблица 2 (а)

Анти-TNF-альфа-клоны, полученные из M62 и M63 – ингибирование связывания TNF-альфа человека и яванского макака с TNFR2

Идентификационный номер клона	Семейство	Ингибирование связывания TNF-альфа и TNFR2 (ELISA), EC50 (нМ)	
		TNF человека	TNF яванского макака
Q62F2	1	0,7	1,3
Q62F11	–	2,3	1,4
Q62E10	2	0,8	1,2
Q62F10	2	30	108
адалимумаб	–	0,3	

Таблица 2 (b)

Анти-TNF-альфа-клоны, полученные из M65 – ингибирование

связывания TNF-альфа человека и яванского макака с TNFR2

Идентификационный номер клона	Семейство	Ингибирование связывания TNF-альфа и TNFR2 (ELISA), EC50 (нМ)	
		TNF человека	TNF яванского макака
Q65D3	1	0,33	0,45
Q65D1	1	0,37	0,32
Q65B1	1	0,29	0,45
Q65C7	1	0,35	0,32
Q65A3	2	1,3	1,1
Q65E12	2	47	65
Q65F6	2	13	24

Можно видеть, что переменные домены, принадлежащие к семейству 1, в целом показали весьма эффективное ингибирование связывания TNFR2 с TNF-альфа как человека, так и яванского макака, и переменные домены, принадлежащие к семейству 2, также, как правило, показывали очень эффективное ингибирование связывания TNFR2 с TNF-альфа как человека, так и яванского макака. Ряд переменных доменов показал аналогичную или более высокую эффективность по сравнению с адалимумабом.

3.4 Ингибирование индуцируемой растворимым TNF-альфа активации репортерных клеток NF-κB/SEAP HEK-293

Силу действия отобранных переменных доменов первоначально измеряли на основе ингибирования цитотоксичности растворимого TNF-альфа в отношении мышечных клеток L929. Для того, чтобы подтвердить, что эти переменные домены также были эффективными и активными в анализе с использованием человеческих клеток, были проведены эксперименты с использованием репортерных клеток NF-κB/SEAP HEK-293. Клетки NF-κB/SEAP HEK-293, стабильно трансфицированные геном-репортером SEAP (секретируемой щелочной фосфатазы) под транскрипционным контролем элемента, отвечающего на NF-κB. Индукция гена-репортера с помощью растворимого человеческого TNF-альфа была подтверждена, и была продемонстрирована способность TNF-альфа-нейтрализующих антител

ингибировать этот ответ. В этих клетках активация репортерного гена SEAP зависит от сигнального пути NF- κ B, который активируется растворимым TNF-альфа через рецепторы TNFR1 на клеточной мембране.

В первом эксперименте были протестированы Q65B1 (семейство 1), Q65C7 (семейство 1), Q62E10 (семейство 2) и адалимумаб. Во втором эксперименте Q65D3 сравнивали с Q65B1.

3.4.1 Ингибирование, вызываемое Q65B1, Q65C7, Q62E10 и адалимумабом

Материалы

- клетки NF- κ B/SEAP HEK-293 (IMGENEX): $3,5 \times 10^4$ клеток/лунку, 2×10^4 клеток/лунку (ii), 10^4 клеток/лунку (ii)
 - стерильные 96-луночные планшеты
 - DMEM (Sigma, D6429) с добавлением 10% FBS, пенициллина/стрептомицина и 500 мкг/мл антибиотика генетицина (G418, Invitrogen, 10131027)
 - концентрация TNF-альфа человека (Invitrogen, PHC3015): 2 нг/мл
 - очищенные переменные домены иммуноглобулиновых цепей Q65B1, Q65C7, Q65D3, Q65E5, Q65E6 и Q62E10
 - диапазон разведений переменных доменов иммуноглобулиновых цепей и адалимумаба: 500 нМ - 2 пМ; 150 нМ - 1 пМ; (3,5-кратные разведения)
 - кривые доза-ответ для TNF-альфа человека: 10 нг/мл - 0,01 нг/мл
- Контроли на планшетах:
- клеточная среда (CM)
 - растворимый TNF-альфа человека («hs-TNF-альфа») в концентрации 2 нг/мл
 - 0,01% Triton X-100 (для кривой доза-ответ для TNF)
 - время инкубации: 22,5 ч
 - среда QuantiBlue (Invivogen): 200 мкл
 - тестируемый объем супернатантов: (i) 10 мкл, (ii) 10 мкл и 20 мкл
 - Время считывания планшетов: 2 ч 45 мин

- Планшетный ридер BioRad (620 нм)

Способы

Клетки NF- κ B/SEAP HEK-293 в количестве $3,5 \times 10^4$ клеток/лунку высевали в 100 мкл в 0-й день в 96-луночные плоскодонные стерильные микропланшеты и оставляли на ночь при 37°C и в 5% CO₂. В 1-й день готовили серийные разведения (3,5-кратные) для каждого очищенного вариабельного домена иммуноглобулиновой цепи (в объемах, достаточных для трипликатов) в 100 мкл HEK-среды, содержащей 2 нг/мл hs-TNF-альфа. Среду удаляли из аналитических планшетов и заменяли на 100 мкл каждого из разбавлений образцов. После 22,5 ч при 37°C и 5% CO₂, 10 мкл или 20 мкл каждого супернатанта смешивали с 200 мкл подогретой среды Quanti Blue (Invivogen) в 96-луночных плоскодонных NUNC-планшетах. После инкубации в течение 2 ч 45 мин при 37°C в темноте при встряхивании, активность продуцированной SEAP измеряли с помощью планшетного ридера BioRad при 620 нм.

Результаты показали, что Q65B1 (семейство 1), Q65C7 (семейство 1) и Q62E10 (семейство 2) достигали максимального ингибирования индуцированной активации клеток, вызываемой растворимым TNF-альфа человека. Результаты показали, что эти вариабельные домены иммуноглобулиновых цепей сильно и эффективно ингибируют ответ на растворимый TNF-альфа, опосредуемый TNFR-рецепторами, экспрессирующимися на клетках человека (фиг.2А).

3.4.2 Ингибирование, вызываемое Q65D3 и Q65B1 (оба из семейства 1)

Материалы и способы были такими же, как описанные выше в п.3.4.1, за исключением другого количества клеток на лунку ($3,5 \times 10^4$, 2×10^4 и 1×10^4) и других объемов клеточных супернатантов после стимуляции TNF (10 мкл и 20 мкл).

Результаты

Оба клона, Q65B1 и Q65D3, были способны полностью нейтрализовать активность растворимого TNF-альфа человека в отношении репортерных клеток NF- κ B/SEAP HEK-293 со значениями EC₅₀ примерно 0,2 нМ для Q65B1 и 0,6 нМ для Q65D3 (фиг.2В).

3.5 Ингибирование активации клеток, индуцированной

мембранным TNF-альфа

Оба, растворимый и мембраносвязанный TNF-альфа, могут индуцировать активацию клеток, экспрессирующих рецепторы TNF-альфа, и считаются, что обе формы обуславливают воспаление и патологию при болезни Крона. Вариабельные домены, способные связывать и нейтрализовать активность как растворимого, так и мембраносвязанного TNF-альфа, вероятно, будут наиболее эффективными.

Был разработан репортерный анализ при контакте клеток, чтобы обеспечить возможность идентификации вариабельных доменов, способных ингибировать индуцируемую мембраносвязанным TNF-альфа активацию клеток. Была создана линия клеток CHO, которая конститутивно экспрессирует нерасщепляемую трансмембранную форму TNF-альфа человека (mTNF-альфа-CHO). При совместном культивировании с клетками NF-κB/SEAP HEK-293, клетки mTNF-альфа-CHO индуцировали активацию репортерного гена. Таким образом может быть определена способность различных вариабельных доменов ингибировать активацию индуцируемых mTNF-альфа клеток.

3.5.1 Результаты анализа активации клеток, индуцированной мембранным TNF-альфа

Таблица 3 (a)

Анти-TNF-альфа-клоны, полученные из M62 и M63 - ингибирование индуцируемой mTNF-альфа активации репортерных клеток NF-κB/SEAP HEK-293

Идентификационный номер клона	Семейство	Ингибирование индуцируемого mTNF-альфа репортера HEK-NF-κB SEAP (EC50=нМ)
Q62F2	1	34
Q62F11	-	40
Q62E10	2	80
Q62F10	2	-
адалимуаб		1-3

Таблица 3 (b)

Клоны, полученные из M65 - ингибирование индуцируемой mTNF-альфа активации репортерных клеток NF-κB/SEAP HEK-293

Идентификационный номер клона	Семейство	Ингибирование индуцируемого mTNF-альфа репортера HEK-NF-κB SEAP (EC50=нМ)
Q65D3	1	16,0
Q65D1	1	15,3
Q65B1	1	10,9
Q65C7	1	14,1
Q65A3	2	23,9
Q65E12	2	173,8
Q65F6	2	109,6
Adalimumab		1,2

Можно видеть, что переменные домены, принадлежащие к семейству 1, как правило, показывали эффективное ингибирование mTNF-альфа, и переменные домены, принадлежащие к семейству 2, также, как правило, показывали ингибирование mTNF-альфа.

Пример 4: перекрестная реактивность с адалимумабом

Адалимумабом в концентрации 1 мкг/мл покрывали HRP-планшеты, которые затем инкубировали с TNF-альфа человека в отсутствие или в присутствии различных переменных доменов. После промывки для удаления свободных комплексов TNF-альфа-переменных доменов, TNF-альфа, остающийся связанным с иммобилизованными мАт, определяли с помощью инкубации с биотинилированными поликлональными кроличьими анти-hTNF-альфа-антителами, mAvidin-HRP, и последующего добавления ТМВ для колориметрической проявки ELISA.

Результаты

Q62E10 (семейство 2), Q62F2 (семейство 1), Q62F10 (семейство 2), Q65A3 (семейство 2), Q65B1 (семейство 1), Q65C7 (семейство 1), Q65D1 (семейство 1), Q65D3 (семейство 1), Q65E12 (семейство 2), Q65F6 (семейство 2) и Q62F1 1 (не принадлежит ни к семейству 1, ни к семейству 2) показали полное ингибирование связывания TNF-альфа с адалимумабом.

Пример 5: стабильность очищенных рекомбинантно полученных в *E.coli* анти-TNF-альфа переменных доменов иммуноглобулиновых

цепей в супернатантах из тонкого кишечника мыши

Очищенные переменные домены были протестированы в присутствии экстракта супернатанта, полученного из объединенного содержимого тонкого кишечника нескольких мышей. После инкубации переменных доменов в присутствии кишечного экстракта в течение различных периодов времени, TNF-альфа-связывающую активность «расщепленных» образцов переменных доменов анализировали с помощью h-TNF-альфа-TNFR2 ELISA.

Супернатанты из тонкого кишечника мышей

Вырезали тонкий кишечник мышей, удаляли твердое содержимое и промывали кишечник 1 мл 0,9%-го солевого раствора. Твердые и жидкие части объединяли в 1,5-мл микроцентрифужных пробирках, встряхивали на вортексе до гомогенности и центрифугировали при 16000×g в течение 10 минут при 4°C. Супернатанты удаляли и хранили при -80°C до использования.

Планшеты и антигены

Анти-TNF-альфа переменные домены анализировали в NPM-планшетах, покрытых 1 мкг/мл этанерцепта (50 мкл/лунку) в течение ночи при 4°C. Эти планшеты блокировали 1%-м BSA в течение минимум 1 часа перед использованием в анализе.

Стоп-раствор для протеаз

Таблетки коктейля протеазных ингибиторов растворяли в 5 мл протеазного стоп-буфера (2% BSA, 1xPBS, 5 mM NaEDTA), чтобы приготовить 20x стоковый раствор протеазных ингибиторов. 2x протеазный стоп-раствор (который описан в разделе 2.3.3) получали путем разбавления 20x раствора протеазного ингибитора 1 к 10 в протеазном стоп-буфере с разведенным 1:100 PMSF.

Способы

Расщепление

Стоковые растворы переменных доменов готовили в 0,4%-м BSA при концентрации 250 мкг/мл. К 55,2 мкл супернатанта тонкого кишечника на льду добавляли 4,8 мкл раствора переменного домена и смешивали на вортексе. 25 мкл сразу же удаляли и смешивали с 25 мкл охлажденного на льду протеазного стоп-раствора (нерасщепленный контроль) и замораживали при

температуре -80°C , вторую аликвоту 25 мкл переносили в одну лунку в поликарбонатном тонкостенном ПЦР-планшете и инкубировали в течение от 1 до 24 часов при температуре 37°C (расщепленный переменный домен). После инкубации образцы расщепленных переменных доменов помещали на лед и в каждую пробирку добавляли по 25 мкл охлажденного на льду протеазного стоп-раствора. Образцы замораживали при -80°C до проведения анализа.

ELISA

Переменные домены разводили в растворе 1%-го BSA+1x протеазный ингибитор, путем разбавления 20x стокового раствора протеазного ингибитора в 1%-м BSA, и смешивали 1:1 с 5 нг/мл h-TNF-альфа. Смесь с TNF-альфа переносили в блокированные HPME-планшеты для ELISA, покрытые 1 мкг/мл этанерцепта. Планшеты инкубировали в течение 2 ч, промывали 4 раза PBS с 0,5%-м PEG20 (PBST), высушивали и затем инкубировали с биотинилированными кроличьими поликлональными антителами против человеческого TNF-альфа (50 мкл/лунку, 0,27 мкг/мл) в течение 1 часа при комнатной температуре и встряхивании. Через 1 ч планшеты промывали 4 раза PBST, высушивали постукиванием и затем инкубировали с mAvidin-HRP (50 мкл/лунку, в разбавлении 1/1000) при встряхивании при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем планшеты 4 раза промывали PBST, высушивали постукиванием и проявляли с использованием 100 мкл TMB. Стандартные кривые для переменных доменов (в PBS) получали параллельно с расщепленными/нерасщепленными образцами. Верхняя концентрация переменных доменов, используемая в стандартных кривых и тестируемых образцах, составляла 300 нг/мл и 200 нг/мл соответственно.

Анализ данных

Уровень ингибирования, достигаемой переменными доменами, рассчитывали путем вычитания сигнала для расщепленных и нерасщепленных (контрольных) переменных доменов из контроля, содержащего только TNF (максимальный сигнал). Это давало снижение сигнала для каждого переменного домена, которое пропорционально количеству переменного домена в образце. %

устойчивости рассчитывали делением снижения сигнала от расщепленного вариабельного домена на снижение сигнала от нерасщепленного вариабельного домена для одного разведения.

Результаты

62F2 и 65B1 (оба принадлежат к семейству 1) показали более чем 80% устойчивости, 62E10 показал более чем 70% устойчивости (семейство 2), 65D1 и 65C7 (семейство 1) показали устойчивость около 50%.

Проводили исследование динамики для измерения активности через 1 ч, 3 ч и 7 ч. Результаты в целом согласовались с данными предыдущего исследования с супернатантами тонкой кишки.

Пример 6: оптимизация отобранных анти-TNF-альфа вариабельных доменов цепей иммуноглобулинов

Вариабельные домены, исследованные до сих пор, не были мутированными, и очищенные вариабельные домены содержали С-концевые метки (с-Мус-6His или Flag-6His). Были получены мутанты, чтобы выяснить, будут ли модификация N-концевых аминокислот или отсутствие С-концевых тегов в сочетании с мутациями в Q65B1 дополнительно повышать стабильность.

6.1 Конструкции и мутации

(i) Был создан ряд мономерных мутантов Q65B1 (ID7F-EV, ID8F-EV ID9F-EV, ID13F-EV, ID14F-EV и ID15F-EV, все включающие His-метку), чтобы исследовать влияние отдельных мутаций на резистентность к протеазам.

(ii) Был создан ряд двуглавых конструкций (ID22F-ID29F), которые включали мутированные варианты мономера Q65B1 и удаленный His-тэг.

(iii) Был создан ряд мономерных мутантов Q65B1, которые включали мутации в начале последовательности DVQLV и удаленный His-тэг, для изучения возможностей оптимизации будущей экспрессии в дрожжах (DVQLV-мутанты ID37F и ID38F в сравнении с EVQLV-эквивалентами ID32F (ID32F представляет собой ID8F-EV без His-тэга) и ID34F, соответственно).

Более подробная информация об этих конструкциях и мутациях показана в таблицах ниже. Мутации выделены подчеркиванием и полужирным шрифтом относительно последовательности родительского

мономера Q65B1.

Подробное описание конструкций и мутаций

	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
ID7F-EV	EVQLVESGGGLVQPGG A SLKLSC	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLITKYG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQKGLN	KGQGTQVTV
	AASGFDFS		WLS	DSVKG	TALYYCAR		SS
ID8F-EV	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLIT H YG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQKGLN	KGQGTQVTV
	AASGFDFS		WLS	DSVKG	TALYYCAR		SS
ID9F-EV	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLITKYG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQKGLN	KGQGTQVTV
	AASGFDFS		WLS	DSV H G	TALYYCAR		SS
ID13F-EV	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLITKYG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQ H GLN	KGQGTQVTV
	AASGFDFS		WLS	DSVKG	TALYYCAR		SS
ID14F-EV	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLITKYG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQKGLN	H GQGTQVTV
	AASGFDFS		WLS	DSVKG	TALYYCAR		SS
ID15F-EV	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLITKYG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQ H GLN	H GQGTQVTV
	AASGFDFS		WLS	DSVKG	TALYYCAR		SS
ID22F	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLITKYG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQKGLN	KGQGTQVTV
	AASGFDFS		WLS	DSVKG	TALYYCAR		SS
	GGGGSGGGSGGGSGGGSGG						
	GGSGGGGS						
	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLITKYG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQKGLN	KGQGTQVTV
	AASGFDFS		WLS	DSVKG	TALYYCAR		SS
ID23F	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLIT H YG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQKGLN	KGQGTQVTV
	AASGFDFS		WLS	DSVKG	TALYYCAR		SS
	GGGGSGGGSGGGSGGGSGG						
	GGSGGGGS						
	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLIT H YG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQKGLN	KGQGTQVTV
	AASGFDFS		WLS	DSVKG	TALYYCAR		SS
ID24F	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLIT H YG	RFTVSRNNAAN S MYLELTRLEPED	NQKGLN	KGQGTQVTV

	AASGFDFS		WLS	DSVKG	TALYYCAR		SS
	GGGGS						
	GGSGGGGS						
	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLIT <u>H</u> YG	RFTVSRNNAAN <u>S</u> MYLELTRLEPED	NQKGLN	KGQGTQVTV
	AASGFDFS		WLS	DSVKG	TALYYCAR		SS
ID25F	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLIT <u>H</u> YG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQ <u>H</u> GLN	KGQGTQVTV
	AASGFDFS		WLS	DSVKG	TALYYCAR		SS
	GGGGS						
	GGSGGGGS						
	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLIT <u>H</u> YG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQ <u>H</u> GLN	KGQGTQVTV
	AASGFDFS		WLS	DSVKG	TALYYCAR		SS
ID26F	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLIT <u>H</u> YG	RFTVSRNNAAN <u>S</u> MYLELTRLEPED	NQ <u>H</u> GLN	KGQGTQVTV
	AASGFDFS		WLS	DSVKG	TALYYCAR		SS
	GGGGS						
	GGSGGGGS						
	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLIT <u>H</u> YG	RFTVSRNNAAN <u>S</u> MYLELTRLEPED	NQ <u>H</u> GLN	KGQGTQVTV
	AASGFDFS		WLS	DSVKG	TALYYCAR		SS
ID27F	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLIT <u>H</u> YG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQKGLN	KGQGT <u>L</u> VTV
	AASGFDFS		WLS	DSV <u>H</u> G	TALYYCAR		SS
	GGGGS						
	GGSGGGGS						
	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLIT <u>H</u> YG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQKGLN	KGQGT <u>L</u> VTV
	AASGFDFS		WLS	DSV <u>H</u> G	TALYYCAR		SS
ID28F	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLITKYG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQKGLN	KGQGTQVTV
	AASGFDFS		WLS	DSV <u>H</u> G	TALYYCAR		SS
	GGGGS						
	GGSGGGGS						
	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC	SSHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLITKYG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQKGLN	KGQGTQVTV

	AASGFDF		WLS	DSV <u>H</u> G	TALYYCAR		SS
ID29F	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLITKYG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQ <u>H</u> GLN	KGQGTQVTV
	AASGFDFS		WLS	DSV <u>H</u> G	TALYYCAR		SS
	GGGSGGGSGGGSGGGSGG						
	GGSGGGGS						
	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLITKYG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQ <u>H</u> GLN	KGQGTQVTV
	AASGFDFS		WLS	DSV <u>H</u> G	TALYYCAR		SS
ID34F	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSC	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLIT <u>H</u> YG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQ <u>H</u> GLN	KGQGTQVTV
	AASGFDFS		WLS	DSVKG	TALYYCAR		SS
ID37F	<u>D</u> VQLVESGGGLVQPGGSLKLSC	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLIT <u>H</u> YG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQKGLN	KGQGTQVTV
	AASGFDFS		WLS	DSVKG	TALYYCAR		SS
ID38F	<u>D</u> VQLVESGGGLVQPGGSLKLSC	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLIT <u>H</u> YG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQ <u>H</u> GLN	KGQGTQVTV
	AASGFDFS		WLS	DSVKG	TALYYCAR		SS

6.2.1 Влияние на силу действия и резистентность к кишечным протеазам

(i) ID7F-EV, ID8F-EV ID9F-EV, ID13F-EV, ID14F-EV и ID15F-EV

Супернатант тонкого кишечника неиммунизированных мышей: содержимое тонкого кишечника семи самцов мышей C57BL/6 выделяли в 0,9%-м солевом растворе, объединяли, гомогенизировали и центрифугировали. Полученный супернатант удаляли, разделяли на аликвоты и замораживали.

Объединенные супернатанты фекальных масс человека: фекальные образцы превращали в суспензию добавлением 1х PBS. Суспензии затем собирали и центрифугировали, и супернатант удаляли, разделяли на аликвоты и хранили при -80°C . Этот процесс удаляет фекальный матрикс, включая любой клеточный материал.

Анти-TNF-альфа вариабельные домены анализировали на NPM-планшетах, покрытых 1 мкг/мл этанерцепта (50 мкл/лунку) в течение ночи. Эти планшеты блокировали 1%-м BSA в течение минимум 1 часа перед использованием в анализе. 2х стоп-раствор для протеаз получали, как описано в примере 5.

Расщепление

Стоковые растворы вариабельных доменов 250 мкг/мл готовили в 0,34%-м (3400 мкг/мл) BSA. К 55,2 мкл фекального супернатанта или супернатанта тонкого кишечника на льду добавляли 4,8 мкл вариабельного домена и смешивали встряхиванием на вортексе. 25 мкл сразу же удаляли и смешивали с 25 мкл охлажденного на льду протеазного стоп-раствора (нерасщепленный контроль) и замораживали при температуре -80°C . Аликвоты 25 мкл помещали в лунки поликарбонатного тонкостенного ПЦР-планшета и инкубировали в течение 17 ч или 7 ч, соответственно, при 37°C . После инкубации образцы расщепленных вариабельных доменов помещали на лед, и в каждую пробирку добавляли по 25 мкл охлажденного на льду стоп-раствора для протеаз. Образцы замораживали при -80°C до проведения анализа.

ELISA

Вариабельные домены разводили в 1%-м растворе BSA+1х протеазный ингибитор, как описано в примере 5, смешивали 1:1 с 5

нг/мл h-TNF-альфа и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Затем смесь переменных доменов и TNF-альфа вносили на заблокированные ELISA-планшеты, покрытые 1 мкг/мл этанерцепта, и инкубировали в течение 2 часов, встряхивая при комнатной температуре. Планшеты промывали 4 раза PBST, высушивали постукиванием и инкубировали с биотинилированными кроличьими поликлональными антителами против человеческого TNF-альфа (50 мкл/лунку, 0,3 мкг/мл) в течение 1 часа при комнатной температуре и встряхивании. Через 1 ч планшеты промывали как раньше и затем инкубировали с mAvidin-HRP (50 мкл/лунку, в разбавлении 1/1000) при встряхивании при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем планшеты промывали и высушивали как раньше и проявляли с использованием 100 мкл TMB. Стандартные кривые для переменных доменов (в PBS) получали параллельно с расщепленными/нерасщепленными образцами. Верхняя концентрация переменных доменов, используемая в стандартных кривых и тестируемых образцах, составляла 100 нг/мл.

Анализ данных

После расщепления, измеряли концентрации переменных доменов с использованием ELISA, в котором измеряют уменьшение связывания TNFR2 и TNF. В этом анализе переменные домены смешивают с TNF-альфа. Затем измеряется остаточный уровень TNF-альфа. Концентрация переменного домена выводится из количества TNF-альфа, выводимого из связывания с TNFR2-рецептором, который прикреплен к ELISA-планшете. Исходные значения OD450 были скорректированы на фоновые значения, полученные из лунок, содержащих только 1%-й BSA. Стандартные кривые строили с применением GraphPad Prism с использованием нелинейной регрессии для подгонки на четырех-параметрические кривые. Концентрации переменных доменов в исследуемых образцах вычисляли в GraphPad Prism с использованием стандартной кривой. Процент устойчивости рассчитывали делением средней концентрации переменного домена в лунках 0-й временной точки на среднюю концентрацию переменного домена для одного момента времени. Рассчитывали стандартную ошибку соотношения двух средних.

Результаты

Оценка мономеров переменных доменов Q65B1 показала, что включение этих мутаций на удивление не сильно влияет на силу нейтрализации TNF-альфа (в TNF-альфа-TNFR2 ELISA) модифицированными переменными доменами.

ID8F-EV и ID13F-EV показали улучшение устойчивости к инактивации под действием протеаз, присутствующих в кишечнике мыши и фекальных супернатантов человека (фиг.3).

(ii) Конструкции ID22F-ID29F

Материалы

- клетки HEK-293 NF-κB/SEAP: 10^4 клеток/лунку в 50 мкл
- 96-луночные планшеты
- DMEM, дополненная 10% FBS, Pen/Strep и 500 мкг/мл антибиотика генетицина (G418)
- концентрация TNF-альфа человека: 2 нг/мл
- очищенные гомодуголовые переменные домены: ID22F-ID29F
- разведения переменных доменов: 20 нМ - 2,1 пМ; 2,5-кратные разведения
- время инкубации: 23 ч
- среда с колориметрическим субстратом для SEAP: 200 мкл; объем тестируемых супернатантов: 20 мкл; время считывания: 2 ч
- планшетный ридер (620 нм)

Способы

10^4 клеток/лунку клеток NF-κB/SEAP HEK-293 высевали в 50 мкл в 96-луночные микропланшеты с плоским дном и инкубировали в течение ночи при 37°C и 5% CO₂. На следующий день готовили серийные разведения (2,5-кратные) для каждого очищенного переменного домена в удвоенной концентрации относительно необходимой для анализа (с объемами, достаточными для трипликатов) в 50 мкл HEK-среды, содержащей 4 нг/мл hs-TNF-альфа. Переменные домены и TNF-альфа инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и встряхивали перед добавлением 50 мкл каждого разведения в планшеты для анализа. После 23 ч при 37°C и 5% CO₂, 20 мкл каждого супернатанта смешивали с 200 мкл подогретой среды для SEAP в 96-луночных планшетах с плоским дном. После 2 ч инкубации при 37°C в темноте при встряхивании,

активность продуцированной SEAP измеряли на планшетном ридере при 620 нм.

Результаты

Гомодвуглавые производные Q65B1 (включая производные с изменениями K59N, K65N, K78S, K101N) были одинаково активными и эффективными со значениями EC50 между 0,02 нМ - 0,03 нМ в индуцированном растворимым TNF HEK293-NF-κB-SEAP репортерном анализе. Сила действия гомодвуглавых форм Q65B1 увеличивалась приблизительно в 10 раз по сравнению с мономером.

(iii) ID32F, ID34F, ID37F, ID38F

Для того чтобы избежать возможности получения продукта с циклизацией N-концевого глутамата при экспрессии в дрожжах, были исследованы эффекты изменения N-концевой аминокислоты в переменном домене на основе Q65B1 с остатка глутаминовой кислоты на остаток аспарагиновой кислоты (который является невосприимчивым к циклизации). На основе Q65B1 были созданы мутанты, чтобы получить соответствующий Q65B1 с N-концевым остатком D, и варианты, объединяющие каждый из них с мутациями, обеспечивающими устойчивость к действию протеаз.

sTNF-альфа-нейтрализующая способность ID-32F, 34F-ID, ID-37F и ID-38F с использованием NF-κB/SEAP HEK-293 клеточного репортерного анализа

Для подтверждения того, что ID-38F и ID-34F нейтрализуют растворимый человеческий TNF-альфа, эти переменные домены были протестированы NF-κB/SEAP HEK-293 клеточном репортерном анализе в сравнении с коммерческим анти-TNF-альфа антителом инфликсимабом (Ремикадом). Результаты были получены из двух отдельных экспериментов, проведенных в разные дни.

Материалы

- клетки NF-κB/SEAP HEK-293 (IMGENEX): 10⁴ клеток/лунку в 50 мкл
- стерильные 96-луночные планшеты
- DMEM (Sigma, D6429) с добавлением 10% FBS, Pen/Strep и 500 мкг/мл антибиотика генетицина (G418, Invitrogen, 10131027)
- концентрация TNF-альфа человека (Invitrogen, PHC3015): 2

нг/мл

- 5 очищенных переменных доменов: ID-32F, 34F-ID, ID-37F, 38F-ID и Q65B1
- разбавления инфликсимаба: 10 нМ - 1 пМ (1-й эксперимент.); 2 нМ - 1 пМ (2-й эксперимент.)
- разведения переменных доменов: 10 нМ - 1 пМ (1-й эксперимент.); 5 нМ - 1 пМ (2-й эксперимент.)
- время инкубации: 22 ч
- среда QuantiBlue (Invivogen): 200 мкл; объем тестируемых супернатантов: 20 мкл; время считывания: 2 ч
- планшетный ридер BioRad (620 нм)

Способы

10^4 клеток/лунку клеток NF- κ B/SEAP HEK-293 высевали в 50 мкл в 96-луночные стерильные плоскодонные микропланшеты и инкубировали в течение ночи при 37°C и 5% CO₂. На следующий день готовили серийные разведения переменных доменов и инфликсимаба (2,5-кратные) в двухкратной концентрации относительно используемой в анализе в HEK-среде, содержащей 4 нг/мл hs-TNF-альфа (для 1-го эксперимента). Во втором эксперименте приготавливали серийные разведения (1,9-кратные для переменных доменов и 2,2-кратные для адалимумаба) в 4-кратной концентрации относительно используемой для анализа в 120 мкл HEK-среды. 100 мкл каждого разведения затем разводили в соотношении 1:1 в 100 мкл HEK-среды, содержащей 8 нг/мл hsTNF-альфа (4х), чтобы иметь переменные домены и TNF-альфа в двойной концентрации относительно используемой в анализе. Переменные домены и TNF инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре и встряхивании перед добавлением 50 мкл каждого разбавления в планшеты для анализа. После 22 ч инкубации при 37°C и 5% CO₂, 20 мкл каждого супернатанта смешивали с 200 мкл подогретой среды Quanti Blue в 96-луночных плоскодонных планшетах NUNC. После 2-часовой инкубации при 37°C в темноте при встряхивании, активность продуцируемой SEAP измеряли на планшетном ридере BioRad при 620 нм.

Результаты

Результаты эксперимента 1 показаны на фиг.4А и результаты эксперимента 2 представлены на фиг.4В и 4С. Все переменные домены показывают полную нейтрализацию sTNF-альфа и аналогичную силу действия со значениями EC50 между 0,3 нМ и 0,5 нМ. Очевидно, что введение мутаций в эти переменные домены не влияет на активность этих переменных доменов в отношении нейтрализации sTNF-альфа. Инфликсимаб не дает полной нейтрализации sTNF-альфа в любом из экспериментов, показывая практически выходящие на плато кривые доза-ответ с приблизительно 80%-й максимальной нейтрализацией примерно при 2 нМ.

mTNF-альфа-нейтрализующая активность ID-34F, ID-38F, Q65B1, ID-8FEV, адалимумаба и инфликсимаба с помощью NF-κB/SEAP HEK-293 клеточного репортерного анализа

Для того, чтобы подтвердить, что ID-38F и 34F-ID нейтрализуют связанный с мембраной TNF-альфа, эти переменные домены были протестированы в NF-κB/SEAP HEK-293 клеточном репортерном анализе в сравнении с 2 предшественниками (Q65B1 и ID8F-EV). 2 коммерческих анти-TNF-альфа антитела (адалимумаб и инфликсимаб) были протестированы в том же самом анализе в качестве эталонов.

Материалы:

- концентрация клеток NF-κB/SEAP HEK-293 (IMGENEX): $3,5 \times 10^4$ клеток/лунку
- стабильная экспрессирующая TNF-альфа_DEL клеточная линия Flp-In CHO (Invitrogen&GeneArt, Life Technologies): 25×10^3 клеток/лунку
- 2 очищенных анти-TNF-альфа мутантных переменных домена: ID-34F и 38F-ID
- 2 очищенных анти-TNF-альфа переменных домена: Q65B1 и ID8F-EV
- 2 антитела: адалимумаб и инфликсимаб
- разведения переменного домена/антител: 300 нМ - 0,11 нМ (2,2-кратные разведения)
- время инкубации: 24 ч

- среда QuantiBlue (Invivogen): 200 мкл; объем тестируемого супернатанта: 10 мкл; временная точка считывания: 2 ч

- планшетный ридер BioRad (620 нм)

Способы:

$3,5 \times 10^4$ клеток/лунку клеток NF- κ B/SEAP HEK-293 высевали в 50 мкл в 0-й день в 96-луночные плоскодонные микропланшеты и оставляли на ночь при 37°C и в 5% CO₂. В 1-й день готовили серийные разведения для каждого очищенного вариабельного домена (с объемами, достаточными для трипликатов) с концентрациями, в три раза превышающими необходимые в анализе, в 50 мкл HEK-среды. 50 мкл каждого разведения вариабельных доменов (3х) добавляли в планшеты для анализа, а затем планшеты оставляли при температуре 37°C и 5% CO₂ на 1 ч или меньше. 50 мкл клеток m-TNF-альфа-CHO (25000 клеток/50 мкл), полученных в HEK-среде, добавляли в HEK-планшеты для анализа, чтоб получить конечную концентрацию в анализе вариабельных доменов (1х). Клетки инкубировали в течение 24 ч при 37°C и 5% CO₂. На 2-й день, 10 мкл каждого супернатанта смешивали с 200 мкл подогретой среды Quanti Blue (Invivogen). После 2 ч инкубации при 37°C в темноте с встряхиванием, активность продуцируемой SEAP измеряли с использованием планшетного ридера BioRad при 620 нм. Полученные кривые доза-ответ анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism.

Результаты

Таблица 4

Нейтрализация mTNF-альфа анти-TNF-альфа вариабельными доменами и коммерческими анти-TNF-альфа антителами

Вариабельный домен/антитело	EC50 (нМ)
ID-34F	4,71
ID-38F	5,16
Q65B1	8,72
ID8F-EV	7,69
Адалимумаб	3,14

Инфликсимаб	3,79
-------------	------

ID-34F и ID-38F имели аналогичную силу действия при нейтрализации связанного с мембраной TNF-альфа, показывая, что изменение N-концевой аминокислоты в вариабельном домене с E на D не влияет на активность вариабельного домена. ID-34F и ID-38F, кажется, являются немного более активными, чем родительские мономеры Q65B1 и ID-8FEV, в отношении mTNF. ID-34F и ID-38F являются лишь незначительно менее сильными, чем коммерческие антитела адалимумаб и инфликсимаб, в нейтрализации mTNF-альфа.

Сравнение ID38F в TNFR1-ELISA

Поскольку полагают, что TNFR1 также играет роль в патологии, обусловленной TNF-альфа, проводили ELISA для тестирования способности ID38F и адалимумаба предупреждать связывание TNF с TNFR1.

Способ

Стерильный 96-луночный микротитровочный планшет покрывали 50 мкл 0,5 мкг/мл hTNFR1 (R&D Systems) в каждой лунке в течение ночи при 4°C. Планшет промывали PBST с помощью устройства для промывки планшетов и блокировали в течение 1 часа в 200 мкл 1%-го BSA. Серии трехкратных разбавлений, начиная с 30 нМ для каждого антитела, инкубировали с 2,5 нг/мл TNF-альфа в течение 1 часа, и затем добавляли по 50 мкл/лунку в промытый планшет и инкубировали в течение 5 часов. Планшет промывали и инкубировали с 50 мкл/лунку разбавленными 1/1000 биотинилированными кроличьими анти-hTNF антителами (Peprotech P31AB7) в 1%-м BSA в течение ночи при 4°C. Планшет промывали и инкубировали с 50 мкл/лунку mAvidin-HRP, разведенного 1/1000 в 1%-м BSA, в течение 1 часа перед финальной промывкой и инкубацией с 100 мкл/лунку TMB-субстрата. Реакцию останавливали через 20 минут добавлением 50 мкл/лунку 0,5M H₂SO₄, и оптическую плотность измеряли при 450 нм. Значения EC₅₀ вычисляли из данных ELISA в GraphPad Prism.

Результаты

Таблица 5

Анти-TNF агент	EC50 (нМ)
ID38F	610,0

Адалimumаб	200,5
------------	-------

ID38F способен нейтрализовать связывание TNF-альфа с TNFR1 при субнаномолярной EC50. Более высокая активность адалimumаба в этом анализе может отражать тот факт, что эта молекула является двухвалентной, в то время как ID38F – моновалентная молекула.

Анализы TNFR2-ELISA и на стабильность

Оценка активности связывания TNF-альфа у мономеров переменных доменов в TNFR2-ELISA показал, что изменение N-концевой аминокислоты переменного домена с E на D не оказывало существенного влияния.

Стабильность мономеров переменных доменов была протестирована, как описано ранее, путем измерения их устойчивости к инактивации под действием протеаз, присутствующих в тонком кишечнике мыши и фекальных супернатантах человека. Изменение N-концевой аминокислоты переменного домена с E на D оказывало лишь очень незначительное влияние на резистентность к действию протеаз.

6.2.2 Итоги

Эти результаты показали, что мономер, родственник Q65B1, с N-концевой последовательностью DVQLV и аминокислотными заменами K59N и K101N («ID38F»), в частности, имеет высокую TNF-альфа-нейтрализующую активность, отличную устойчивость к инактивации протеазами тонкого кишечника и фекальных масс, и потенциал для производства продукта, который не содержит пироглутаматов при экспрессии в дрожжах.

Пример 7: устойчивость к кишечным и IBD-воспалительным протеазам

7.1 Свидетельство устойчивости к действию протеаз, присутствующих в воспаленной ткани при IBD

Протеолитическая активность, которая может привести к быстрой деградации терапевтических антител, повышается при болезни Крона (MMP3, MMP12, катепсин) (Biancheri et al ECCO, Dublin 2011 Abstract P007, который полностью включен в настоящее описание путем ссылки). Поэтому важно исследовать стабильность анти-TNF-альфа переменных доменов в присутствии очищенных

воспалительных протеаз и в присутствии более сложных по составу лизатов слизистой ткани при IBD.

Рекомбинантные MMP-3 и MMP-12 человека были получены от коммерческих поставщиков, например, от R&D Systems (кат.№№ 513-MP-010 и 917-MP-010, соответственно). Активацию ферментов и 22-часовую инкубацию проводили в TCNB-буфере для анализа: 50 mM Tris, 10 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 0,05% (вес/объем) полиоксиэтилен-(23)-лаурилового эфира, например, Brij-35, pH 7,5. Перед использованием в основном анализе MMP-протеазы активировали путем предварительной инкубации. Для активации rhMMP-3, фермент разбавляли до 20 мкг/мл в TCNB, содержащем 5 мкг/мл химотрипсина, и инкубировали при 37°C в течение 30 минут. После активации, химотрипсиновую активность ингибировали добавлением PMSF до конечной концентрации 2 mM. PMSF не должен отрицательно влиять на активность rhMMP-3. rhMMP-12 активировали путем разбавления до 50 мкг/мл в TCNB и инкубирования при 37°C в течение 30 часов. Никакие дополнительные добавки или ингибиторы не были использованы для активации rhMMP-12.

Материалы

Мономер ID34F, двуглавый ID25F, этанерцепт, адалимумаб и инфликсимаб.

Способы

Тестируемые соединения, полученные в буфере TCNB, смешивали с активированными rhMMP-3 и rhMMP-12 на льду. Тестируемые соединения присутствовали в начале анализа в концентрации 30 мкг/мл. rh-MMP-3 присутствовала в начальной концентрации для анализа 12 мкг/мл. rh-MMP-12 присутствовала в начальной концентрации для анализа 30 мкг/мл. Каждое соединение тестировали в присутствии обоих ферментов и только TCNB-буфера (контроль) для проверки фермент-независимой деградации в ходе анализа. Ферменты также инкубировали только с TCNB в качестве контроля «без тестируемых соединений». Конечный объем всех реакций в нулевой точке (t=0 ч) составлял 30 мкл. В нулевой точке 10 мкл исходного объема удаляли и добавляли к 10 мкл 2х раствора протеазных ингибиторов в протеазном стоп-буфере (1х

PBS, 2% BSA, 5 mM EDTA, как описано в примере 5) на льду, чтобы остановить реакцию. Образцы $t=0$ замораживали при -80°C . Оставшиеся 20 мкл реакционного объема запечатывали в планшете для ПЦР-анализа и инкубировали при 37°C в течение 22 часов.

После 22-часовой инкубации было обнаружено, что объем большинства реакций оставался приблизительно 20 мкл. Чтобы остановить реакцию, добавляли по 20 мкл 2х раствора протеазных ингибиторов в протеазном стоп-буфере (1х PBS, 2% BSA, 5 mM EDTA). Образцы $t=22$ ч замораживали при -80°C . Образцы анализировали с помощью Вестерн-блоттинга. Пробы разводили до эквивалента 6,6 нг/мкл тестируемого соединения в красителе для нанесения, и 15 мкл наносили (по 100 нг каждого испытуемого соединения/полосу, предполагая отсутствие изменений в концентрации тестируемого соединения по ходу эксперимента) на 10%-й Bis-Tris-гель. Также наносили эквивалентный объем контроля «без тестируемого соединения». Хемилюминесцентный белковый маркер молекулярных весов, например, Super signal (Pierce), добавляли в качестве стандарта в количестве 5 мкл/полосу. Образцы разделяли электрофорезом в буфере SDS-MES и переносили на нитроцеллюлозные мембраны, используя 7-минутную программу переноса на устройстве для полусухого блоттинга, например, iBiot. Мембраны блокировали в течение ночи при 4°C в блокирующем растворе (1% BSA, 2% сухого обезжиренного молока, 0,05% PEG20, 1х PBS, pH 7,4). Вариабельные домены детектировали с использованием: 1) первичных антител: кроличьих поликлональных анти-Q65B1(-Flag-6His) антител (сыворотки, полученной из терминального забора крови), разведенных 1/1000 в блокирующем растворе; и 2) вторичных антител: конъюгированных с HRP поликлональных свинных анти-IgG кролика антител, разведенных 1/1000 в блокирующем растворе плюс 1% нормальной козьей сыворотки. Этанерцепт, инфликсимаб и адалимумаб детектировали с помощью конъюгированных с пероксидазой антител против IgG человека, специфичных к гамма-цепям (Dako, P0214), разведенных 1/1000 в блокирующем растворе (без использования вторичных антител). Блоты промывали 6 раз в течение 5 минут в 25 мл PBST (1хPBS, 0,1% PEG20) между каждой

стадией инкубации, чтобы удалить неспецифически связавшиеся антитела. Для проявки блотов использовали Pierce Super-Signal ECL (34087), и проявку визуализировали с использованием ImageQuant (LAS4000), меняя время экспозиции при необходимости.

Результаты

ID34F (K59H- и K101H-вариант Q65B1) и ID25F (гомодвуглавая форма ID34F) являются полностью устойчивыми как к rh-MMP3, так и к rh-MMP12, *in vitro* после 22-часовой инкубации (фиг.5А). Для сравнения, каждый из используемых в клинике биологических агентов – этанерцепт, адалимумаб и инфликсимаб, претерпевает либо частичное, либо полное расщепление полноразмерной молекулы, образуя фрагменты меньшего молекулярного веса (фиг.5В и 5С). Анализы показывают полосы, соответствующие мономерной (15kDa) и двуглавой (30 кДа) формам, которые не изменяются при воздействии протеаз.

7.2 Свидетельство стабильности в кишечных жидкостях и фекальных экстрактах свиньи и обезьяны

Каждый вариабельный домен ID32F, ID34F, ID8F-EV и Q65B1 инкубировали в присутствии супернатантов: (а) свиной двенадцатиперстной кишки в течение 5 с половиной часов, (b) мышьиной тонкой кишки в течение 5 с половиной часов, и (с) фекалий человека в течение 21 ч. Протестированные вариабельные домены показали хорошую стабильность в экстрактах из различных регионов ЖКТ. Соответствующие приблизительные %% резистентности для каждого вариабельного домена были следующими:

Таблица 6

	Двенадцатиперс тный кишечник свиньи	Тонкий кишечник мыши	Фекалии человека
ID32F	80	55	40
ID34F	90	70	70
ID8F-EV	120	80	60
Q65B1	90	60	60

7.3 Устойчивость ID8F-EV в экстрактах, полученных из содержимого из различных областей желудочно-кишечного тракта

обезьяны

ID8F-EV инкубировали в течение 5 часов в супернатантах содержимого желудка, двенадцатиперстной кишки, тощей кишки и подвздошной кишки, и в течение 16 часов в супернатантах содержимого слепой кишки и ободочной кишки. После инкубации % устойчивости ID8F-EV составлял приблизительно от 60% до 90%.

Пример 8: местная доставка переменных доменов иммуноглобулиновых цепей в желудочно-кишечный тракт и доступ к *lamina propria* после перорального введения

Переменные домены по изобретению вряд ли связываются с мышиным TNF-альфа, однако, демонстрация местной доставки в желудочно-кишечный тракт и проникновение в собственную пластинку слизистой оболочки (*lamina propria*) после перорального введения в мышиную модель IBD свидетельствует о том, что нейтрализация TNF-альфа может быть достигнута в месте кишечного воспаления.

8.1 Проникновение 65B1 в эпителий ободочной кишки после инкубации ex vivo в просвете сегментов ободочной кишки, собранных у нормальных и имеющих DSS-колит мышей

Способы

DSS-колит индуцировали у двух мышей с использованием стандартного протокола. 2%-й декстрансульфат (MP biomedical) вводили в питьевой воде в течение 7 дней, после чего мышей держали еще в течение 3 дней, чтобы достигнуть пика развития заболевания. Затем мышей забивали вместе с 2 здоровыми мышами, и выделяли ободочную кишку. Содержимое просвета толстой кишки осторожно смывали PBS, а затем сегменты сшивали ниткой и процессировали, как показано ниже. В сегменты толстой кишки вносили 3 мкг/мл 65B1 в среде RPMI, содержащей 2% FCS и 15 мМ HEPES, затем открытые концы сегментов сшивали, и сегменты инкубировали при осторожном качании в RPMI+2% FCS+15 мМ HEPES в культуральной колбе при комнатной температуре в течение 1,75 ч. Сегменты толстой кишки затем разрезали, промывали в течение короткого времени, и либо фиксировали в параформальдегиде, либо погружали в оптимальное для температуры приготовления срезов соединение и мгновенно замораживали. Срезы ткани приготавливали из проксимальной ткани толстой кишки. 6-мкм срезы нарезали и

фикси́ровали в ледяном ацетоне в течение 90 секунд. Срезы высушивали на воздухе и хранили при -20°C до проведения анализа. Для окрашивания каждым набором антител использовали по два из серии срезов для каждой мыши.

Иммуногистохимия

Слайды размораживали, и срезы блокировали в 3%-м обезжиренном BSA (FAF-BSA) в PBS в течение 30 минут при комнатной температуре. Инкубацию с первичными антителами (кроличьими поликлональными антителами к переменным доменам или контрольными кроличьими поликлональными антителами) проводили в течение ночи (приблизительно 18 ч) при 4°C в увлажненной камере. Набор из трех слайдов для блока ткани каждой толстой кишки окрашивали следующим образом (один слайд на окрашивание):

- носитель (3% FAF-BSA в PBS, как описано выше)
- 10 мкг/мл аффинно очищенного контрольного поликлонального кроличьего антитела
- 10 мкг/мл аффинно очищенного поликлонального кроличьего антитела против переменных доменов (AB1219).

После инкубации каждый срез промывали три раза в течение трех минут ледяным PBS. Все срезы окрашивали конъюгированными с Alexa Fluor 594 козьими антителами к кроличьим IgG в концентрации 20 мкг/мл (Molecular Probes A11037) и Hoescht 33342 в концентрации 1 мкг/мл (для идентификации клеточных ядер) в носителе в течение шести часов в темноте при комнатной температуре. После инкубации с вторичным антителом срезы промывали, как описано ранее, с последующим финальным промыванием водой MilliQ. Срезы высушивали на воздухе в темноте, монтировали в защищающей от выгорания среде (Citifluor, AF1) и закрывали покровным стеклом. Слайды хранили в темноте при 4°C до проведения съемки. Слайды просматривали на следующий день под микроскопом Olympus AX70, и изображения получали последовательно для каждого флуорохрома (Alexa Fluor 488 и УФ), используя Image Pro-Plus (v7.0, Media Cybernetics). Уровни экспозиции выставляли с использованием срезов от контрольных или DSS-мышей, окрашенных

контрольными поликлональными кроличьими антителами, и снимали по меньшей мере два случайных поля из каждого слайда от каждого животного.

Результаты

В отличие от изображений ободочной кишки нормальных мышей, ассоциированная с 65B1 флуоресценция значительно увеличивалась на срезах ободочной кишки мышей с DSS-колитом. Окрашивание срезов гематоксилином и эозином (H&E) показало обширное воспаление, которое предположительно сильно нарушало барьерную функцию эпителия, обеспечивая 65B1 легкий доступ к собственной пластинке слизистой оболочки, находящейся под эпителием. В то время как в сегментах ободочной кишки от нормальных мышей трансэпителиальное проникновение 65B1 было низким или вообще не наблюдалось, в сегментах ободочной кишки мышей с DSS-колитом наблюдалось интенсивное проникновение. Полученные данные свидетельствуют о том, что индуцируемые болезнью изменения в барьерной функции эпителия позволили переменным доменам получить доступ к подслизистой ткани.

8.2 Исследование проникновения 65B1 в слизистую оболочку ободочной кишки у нормальных мышей и мышей DSS-колитом после перорального введения через зонд

Материалы и способы

- Q65B1 (3,35 мг/мл=222,3 мкМ)
- 1 М раствор бикарбоната натрия
- сухое молоко (Marvel)
- кроличье антитело к переменному домену, pAB 1219
- контрольное кроличье pAB
- конъюгированное с Alexa 594 козье антитело к кроличьему антителу (Molecular Probes, A11037)

DSS-колит индуцировали у 3 мышей C57BL/6 путем введения 2%-го декстрансульфата (MP biomedical) в питьевой воде в течение 7 дней, после чего мышей держали еще в течение 3 дней, чтобы позволить заболеванию достигнуть пика. В день введения соединений, всем мышам с DSS-колитом и 3 нормальным мышам давали по 100 мкл 0,1 М NaHCO₃, 450 мг/мл сухого молока, а затем приблизительно через 10 минут двум нормальным мышам и двум мышам

с наиболее выраженным DSS-колитом (судя по результатам взвешивания) давали по 150 мкл 0,1 М NaHCO_3 , содержащего 65B1 в конечной концентрации 33,6 мкМ (эквивалент 76 мкг) и 450 мг/мл сухого молока, в то время как две другие мыши (одна нормальная и одна с DSS-колитом) получали только носитель. Мышей забивали через 3,25–3,5 ч после введения дозы 65B1 и выделяли желудочно-кишечный тракт. Выделяли ободочную кишку, содержимое просвета аккуратно выдавливали и затем кишку быстро промывали в среде RPMI, содержащей 2% фетальной телячьей сыворотки, после чего быстро замораживали, как описано в прилагаемом протоколе.

Результаты

Ободочная кишка мышей, которые не получали 65B1, служила материалом для определения фоновой флуоресценции, относительно которой можно было оценить 65B1-специфичную флуоресценцию. Ассоциированная с VNN флуоресценция наблюдалась в красном канале, тогда как ядра клеток, помеченные Hoechst 33342, флуоресцировали синим цветом. Мышь 1, которая получила только носитель, давала фоновую флуоресценцию в ободочной кишке, в то время как мышам 2 и 3 вводили 65B1. Не наблюдалось практически никаких различий в красной флуоресценции в ободочной кишке у трех мышей, показывая, что проникновение 65B1 в ободочную кишку нормальной мыши является минимальным (как и ожидалось). Окрашенный H&E срез показал типичную структуру толстой кишки без очевидного воспаления. В отличие от нормальных мышей, у DSS-мышей наблюдались участки обширного воспаления и в некоторых местах имело место значительное повреждение эпителия. У мышей с DSS-колитом, получавших переменный домен, наблюдалось явное увеличение 65B1-ассоциированной флуоресценции по сравнению с мышами с DSS-колитом, получавшими только носитель, указывая на трансэпителиальное проникновение в собственную пластинку слизистой оболочки.

Этот результат демонстрирует, что перорально вводимый переменный домен может получить доступ к подслизистому слою ободочной кишки мышей с индуцированным колитом. Доступ к этому отделу ЖКТ у пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника является необходимым условием терапевтической эффективности

препарата.

Пример 9: влияние ID38F и инфликсимаба на фосфорилирование сигнальных белков, присутствующих в *ex vivo* культурах биопсии ткани при IBD

Вследствие того, что анти-TNF-альфа терапевтические средства на основе антител, как правило, не имеют перекрестной реактивности, например, с мышинным TNF-альфа, не было возможности оценить эффективность вариабельных доменов иммуноглобулиновых цепей по настоящему изобретению в мышинной доклинической модели IBD. Однако было показано, что местная кишечная доставка лактобацилл, секретирующих антитела против мышинного TNF-альфа домена, была достаточной для подавления воспаления ободочной кишки в мышинной модели IBD (Vandenbroucke et al 2010 *Mucosal Immunology* 3(1):49-56, полностью включена в настоящее описание путем ссылки). Результаты этих исследований обеспечивают доклиническую валидацию концепции подхода перорального введения доменов антител против TNF человека для профилактики или лечения IBD.

Инфликсимаб эффективен при лечении IBD. Предполагают, что инфликсимаб действует главным образом путем нейтрализации биологической активности TNF, что приводит к последующему ингибированию эффектов провоспалительных цитокинов. Активация в результате действия TNF множества различных типов клеток, присутствующих в пораженной ткани, и вторичных медиаторов воспаления включает в себя множество рецепторных сигнальных путей, приводящих к фосфорилированию рецепторов, протеинкиназ и факторов транскрипции. Эксперименты показали, что (i) картина фосфорилирования белков изменяется при IBD относительно нормальной ткани кишечника, и что (ii) картина фосфорилирования чувствительна к ингибиторам конкретных провоспалительных путей.

Было исследовано: (i) может ли TNF-нейтрализующая активность ID38F быть продемонстрирована в *ex vivo* культурах IBD-ткани на основе изменений в характере фосфорилирования белков в ткани; и (ii) сравнение эффекта ID38F с клинически эффективным анти-TNF моноклональным антителом инфликсимаб.

Культивирование органов

Образцы эндоскопически отобранной биопсии ободочной кишки или хирургически отобранные образцы слизистой оболочки подвздошной кишки от пациентов с активным IBD помещали (по одному образцу биопсии на лунку) в 24-луночные планшеты (VWR International, Lutterworth, UK) в 300 мкл бессывороточной среды HL-1 (Cambrex Bioscience, Wokingham, UK) с добавлением 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, и культивировали при 37°C, 5% CO₂ со следующими стимулами:

- IgG1, 10 мкг/мл
- инфликсимаб, 10 мкг/мл
- ID38F, 4 мкг/мл
- контрольный переменный домен иммуноглобулиновой цепи к другому антигену («не-анти-TNF-альфа»), 4 мкг/мл

После культивирования в течение 48 ч, образец биопсии и супернатанты замораживали и хранили при -70°C.

Процедура анализа массива фосфорилированных белков

Для анализа содержания фосфорилированных белков, образцы ткани при IBD оттаивали, лизировали в буфере RIPA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), дополненном коктейлем фосфатазных ингибиторов 2 (Sigma-Aldrich) и протеазных ингибиторов (Sigma-Aldrich), оба в количестве 1%. Концентрации белка в лизатах были определены с помощью анализа белка от Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hemel Hempstead, UK), и образцы разбавляли до 1,0 мг/мл в Array Diluent Buffer (буфере для разбавления). Анализ профилей фосфобелков проводили с использованием наборов PathScan RTK Signalling Antibody Array (Cell Signaling Technology с хемилюминесцентным ответом, кат.№ 7982). Данный мультиплексный анализ представляет собой анализ с использованием массива антител на слайдах, основанный на принципе сэндвич-иммуноанализа. Данный набор позволяет одновременное обнаружение 28 рецепторных тирозинкиназ и 11 важных сигнальных узлов, фосфорилированных по тирозину или другим остаткам (см. таблицу 7А). Мишень-специфичные антитела захвата, биотинилированный белок (положительный контроль) и неспецифичные IgG (отрицательный контроль) наносили в двух повторах на покрытые

нитроцеллюлозой стеклянные слайды. Анализ тканевых лизатов проводили в соответствии с инструкциями изготовителя с использованием предоставленных реагентов. Кратко, каждый разведенный лизат инкубировали на слайде с последующей инкубацией с коктейлем биотинилированных детектирующих антител. Конъюгированную с стрептавидином HRP и реагент LumiGLO® затем использовали для визуализации связавшихся детектирующих антител с помощью хемилюминесценции. Изображение слайда получали на стандартной хемилюминесцентно чувствительной пленке. Изображение пленки получали путем сканирования на цветном сканере HP LaserJet Pro 100, и количественно оценивали интенсивность пятен, используя программное обеспечение ImageJ.

Таблица 7А

Киназы и сигнальные белки, включенные в массив (пан - фосфорилирование по всем остаткам)

Рецепторные тирозинкиназы		Сигнальные узлы
EGFR/ErbB1 пан-Tyr	PDGFR пан-Tyr	Akt/PKB/Rac Thr308
HER2/ErbB2 пан-Tyr	c-Kit/SCFR пан-Tyr	Akt/PKB/Rac Ser473
HER3/ErbB3 пан-Tyr	FLT3/Flk2 пан-Tyr	p44/42 MAPK (ERK1/2) Thr202/Tyr204
FGFR1 пан-Tyr	M-CSFR/CSF-1R пан-Tyr	Рибосомный белок S6 Ser235/236
FGFR3 пан-Tyr	EphA1 пан-Tyr	c-Abl пан-Tyr
FGFR4 пан-Tyr	EphA2 пан-Tyr	IRS-1 пан-Tyr
InsR пан-Tyr	EphA3 пан-Tyr	Zap-70 пан-Tyr
IGF-IR пан-Tyr	EphB1 пан-Tyr	Src пан-Tyr
TrkA/NTRK1 пан-Tyr	EphB3 пан-Tyr	Lck пан-Tyr
TrkB/NTRK2 пан-Tyr	EphB4 пан-Tyr	Stat1 Tyr701
Met/HGFR пан-Tyr	Tyro3/Dtk пан-Tyr	Stat3 Tyr705
Ron/MST1R пан-Tyr	Axl пан-Tyr	
Ret пан-Tyr	Tie2/TEK пан-Tyr	
ALK пан-Tyr	VEGFR2/KDR пан-Tyr	

Анализ данных

Фоновый сигнал измеряли для каждого блота и вычитали из

нескорректированных фосфобелковых сигналов. Было отмечено, что для некоторых значений фосфобелков после вычета фона были получены отрицательные значения. Это, вероятно, являлось следствием способа, используемого для чтения массивов, который включал экспозицию с рентгеновской пленкой и сканирование негатива, а не прямое измерение светового сигнала. В тех случаях, когда сигнал от фосфобелка в лизате, обработанном ID38F (или инфликсимабом), давал отрицательное значение после коррекции фона, а скорректированное значение для соответствующей обработки контрольным не-анти-TNF-альфа варибельным доменом иммуноглобулиновой цепи (или IgG) было положительным, то уровень ингибирования оценивали, как $>50\%$.

Визуальная оценка массива данных показала, что оба белка, ID38F и инфликсимаб, оказывали ингибирующее действие на некоторые из фосфобелков в некоторых тканях. Для поиска эффектов действия анти-TNF агентов на каждый из различных фосфобелков, сигналы, полученные от массивов для ID38F и инфликсимаба, были сопоставлены напрямую с сигналами из соответствующих массивов для контрольного варибельного домена и IgG, и были вычислены соотношения сигналов (ID38F/контрольный варибельный домен и инфликсимаб/IgG). Для того, чтобы оценить, существует ли закономерность ингибирования с помощью анти-TNF антител в тканях от разных больных, были отобраны те фосфобелки, фосфорилирование которых подавлялось $\geq 50\%$ в тканях по меньшей мере у 3 из 4 больных болезнью Крана (см. таблицу 7B).

Таблица 7B

Ингибируемые ID38F или инфликсимабом фосфобелки ($\geq 50\%$ в 3 из 4 образцов биопсии IBD)

Биологические функции	Ингибируемые фосфобелки ($>50\%$ в 3 из 4 образцов биопсии IBD)	
	ID38F относительно контрольного варибельного домена	Инфликсимаб относительно IgG
Удаление	AXL	AXL

апоптотических клеток макрофагами	TYRO3	-
Т-клеточный сигнальный путь/Адгезия	EphA3 Lck	EphA3 ZAP70
Ангиогенез	VEGFR2 TIE2 EphB4	VEGFR2 TIE2 -
Боль/Нейрональная регуляция	EphB1	
Клеточная активация/Выживаемо сть /Передача сигнала	AKT ERK1/2 Рибосомный белок S6 -	AKT ERK1/2 Рибосомный белок S6 SRC ALK PDGFR
Гематопоз		FLT3
Регуляция эпителиальных клеток	EphA1 -	EphA1 EphA2

На основании этих критериев, анализ исходных данных массива показывает, что воздействие ID38F воспроизводимо ингибирует 12 из 39 фосфобелков, в то время как инфликсимаб ингибирует 14 из 39 фосфобелков, из которых 8 – совместно с ID38F. Функции этих белков являются актуальными для сигнальных путей и иммунологических процессов, которые могут иметь важное значение в воспалении и/или патологии при IBD. После сравнения результатов анализа с использованием «нескорректированных» и «нормализованных на контроль» данных, набор из 12 фосфобелков, ингибируемых ID38F, был одинаковым в обоих случаях; для инфликсимаба 12 фосфобелков были определены как общие для обоих анализов.

Для дальнейшего анализа данных массива, «нормализованные на контроль» значения, взятые из массивов ID38F и инфликсимаба,

сравнивали напрямую с «нормализованными на контроль» значениями из соответствующих массивов контрольного переменного домена и IgG, и вычисляли соотношения, как указано выше. Вновь была отмечена воспроизводимая картина ингибирования анти-TNF антителами исходя из этих фосфобелков, которые ингибировались $\geq 50\%$ в тканях по меньшей мере 3 из 4 пациентов с IBD (см. таблицу 7С).

Таблица 7С

Фосфобелки, идентифицированные путем вычисления соотношений из данных массива, нормализованных по среднему положительному контрольному сигналу на каждом массиве

Биологические функции	Ингибируемые фосфобелки (>50% в 3 из 4 образцов биопсии CD)	
	ID38F относительно контрольного переменного домена	Инфликсимаб относительно IgG
Удаление апоптотических клеток макрофагами	AXL TYRO3	AXL -
Т-клеточный сигнальный путь/Адгезия	EphA3 Lck	EphA3 -
Ангиогенез	VEGFR2 TIE2 EphB4	VEGFR2 TIE2 -
Боль/Нейрональная регуляция	EphB1	RET
Клеточная активация/Выживаемость /Передача сигнала	AKT ERK1/2 Рибосомный белок S6 -	AKT ERK1/2 Рибосомный белок S6 SRC PDGFR
Гематопоз		FLT3

		cKit
Регуляция	EphA1	EphA1
эпителиальных клеток	–	EphA2

Воздействие ID38F ингибировало 12 из 39 фосфобелков, в то время как инфликсимаб ингибирует 14 из 39 фосфобелков, из которых 8 совпадали с ID38F. После сравнения результатов анализа с использованием данных «нескорректированных» и «нормализованных на контроль», набор из 12 фосфобелков, ингибируемых ID38F, был одинаковым в обоих случаях; для инфликсимаба, 12 фосфобелков были определены как общие для обоих анализов.

Вывод

В культурах воспаленных IBD-тканей, отобранных у больных людей с активным заболеванием, *ex vivo* воздействие ID38F или клинически эффективного моноклонального антитела инфликсимаба может ингибировать фосфорилирование множества белков, которые включают рецепторные тирозинкиназы и мишени, участвующие в клеточной сигнализации. Данные о том, что воздействие структурно различных антител ингибирует фосфорилирование почти идентичного набора из 8 белков в 3 из 4 тканей, наводят на мысль о том, что эффекты обоих антител обусловлены нейтрализацией эндогенных процессов, запускаемых TNF. Ингибирование множества фосфобелков с помощью ID38F или инфликсимаба было отмечено в образцах биопсии, взятых по меньшей мере у 3 из 4 пациентов с IBD. Отсутствие ингибирования конкретных фосфобелков в одном из образцов IBD-ткани, возможно, отражает различия между пациентами при болезни и/или различия в клеточном составе образцов биопсии, взятых из различных участков воспаления.

Это исследование свидетельствует о том, что картина ингибирования ID38F фосфорилирования фосфобелков в ткани является практически идентичной той, которую получают с клинически значимой концентрацией инфликсимаба.

Пример 10: сравнение нейтрализующей активности ID38F (полипептида по настоящему изобретению) и анти-TNF-альфа полипептидов из предшествующего уровня техники

Нейтрализующую активность ID38F сравнивали в одном и том же

анализе со следующими анти-TNF-альфа полипептидами согласно предшествующему уровню техники:

TNF1 (VHH, раскрытый в WO2006122786, в нем SEQ ID NO: 52)

TNF3 (VHH, раскрытый в WO2006122786, в нем SEQ ID NO: 60)

TNF30 (VHH, раскрытый в WO2006122786, в нем SEQ ID NO: 96)

VHH#3E (VHH, раскрытый в WO2004041862, в нем SEQ ID NO: 4)

Адалimumаб (коммерчески доступное человеческое моноклональное антитело)

Материалы

клетки L929 (10^4 клеток/лунку)

96-луночные планшеты (Costar)

DMEM (Invitrogen) с добавлением пенициллина/стрептомицина+2 мМ L-глутамина

TNF-альфа человека (Invitrogen), концентрация: 500 пг/мл

Концентрация актиномицина D (Sigma): 0,75 мкг/мл

ID38F, очищенный из *S.cerevisiae*

Flag-His-меченый ID38F, очищенный из *E.coli*

Адалimumаб

TNF1, TNF3, TNF30, VHH#4E, очищенные из *E.coli* с Flag-His-тегом

Диапазон разведений: 5 пМ - 30 нМ (разведения 1:3)

Время инкубации: 23 ч

Реагент Alamar Blue для оценки жизнеспособности клеток (Invitrogen, DAL1100): 10 мкл/лунку

3%-й SDS

Микропланшетный ридер (Fluostar Optima) (OD590 нм)

Способ

10^4 клеток L929/лунку в 100 мкл высевали в 0-й день в 96-луночные микропланшеты (Costar) в полной среде DMEM и оставляли на ночь при 37°C и 5% CO₂. В 1-й день приготавливали серийные разведения 1:3 (в DMEM+Act.D) для каждого очищенного VHH/антитела в двухкратной концентрации относительно анализируемой (в объемах, достаточных для трипликатов), начиная с верхней концентрации 60 нМ. По 165 мкл каждого разведения затем разводили в соотношении 1:1 в 165 мкл 2х раствора hTNF-

альфа (1 нг/мл), приготовленного в DMEM+Act.D. 0,9 мл 2х TNF разводили в 0,9 мл CM (клеточной среды)+Act.D., чтобы иметь в анализе контроль «только TNF». Среду удаляли из каждой лунки аналитических микропланшетов, и клетки инкубировали со 100 мкл каждого разбавления TNF+VHN, CM+Act.D. или контроля «только TNF». После 23 ч инкубации при 37°C и в 5% CO₂, в каждую лунку добавляли по 10 мкл Alamar Blue, клетки инкубировали в течение 2 ч при 37°C и в 5% CO₂, а затем в каждую лунку добавляли по 50 мкл 3%-го SDS. После чего измеряли поглощение в лунках планшетов при длине волны 590 нм.

Результаты

Полученные кривые нейтрализации (полученные с помощью GraphPad Prism с использованием кривой 4-параметрической нелинейной регрессии) показаны на фиг.6. Значения EC50 приведены в таблице 8.

Таблица 8

Анти-TNF-альфа полипептид	EC50 (нМ)
TNF1	0,751
TNF3	0,631
TNF30	0,420
VHN#3E	1,110
ID38F-Flag-His (полученный в <i>E. coli</i>)	0,102
ID38F (полученный в <i>S. cerevisiae</i>)	0,127
Адалимумаб	0,091

Как можно увидеть из фиг.6 и таблицы 8, VHN#3E был наименее эффективным анти-TNF-альфа полипептидом в нейтрализации индуцированной растворимым TNF-альфа человека цитотоксичности в клетках L929. ID38F (полученный как в *E.coli*, так и в *S.cerevisiae*) имел приблизительно в 4-10-раз ниже EC50, чем анти-TNF-альфа VHN из предшествующего уровня техники.

Пример 11: получение анти-TNF-альфа ICVD (вариабельного домена иммуноглобулиновой цепи) по изобретению в виде фармацевтической композиции

Твердая фармацевтическая композиция, содержащая один из анти-TNF-альфа ICVD по настоящему изобретению, раскрытых в

данном описании, была получена в форме мини-таблеток с помощью сухого гранулирования и прессования. Этот анти-TNF-альфа ICVD представляет собой 115-аминокислотный полипептид с весом 12,6 кДа, рI 6,8 и растворимостью в воде, превышающей 30 мг/мл. ICVD связывается с высокой аффинностью и обладает высокой нейтрализующей активностью в отношении TNF-альфа как человека, так и яванского макака.

Мини-таблетка была представлена в различных вариантах, где каждый вариант содержал разное количество мини-таблеток в капсулах различного размера. Основным вариантом, используемым в примерах, описанных ниже, была капсула с размером 00 НРМСА, содержащая 15 покрытых энтеросолюбильной оболочкой мини-таблеток (всего 185 мг фармацевтически активного связывающего полипептида). Ядра мини-таблеток имели диаметр 3 мм (без учета толщины оболочки). Компоненты, содержащиеся в каждой мини-таблетке и, следовательно, в 15 мини-таблетках, содержащихся в капсуле, приведены в таблице 9 ниже.

Таблица 9

Наименование компонента мини-таблетки	Функция	% вес/вес в композиции	Количество (мг/капсулу) для дозы 185 мг (15 мини-таблеток)	Количество (мг) на дозу 12 мг (1 мини-таблетка)
Ядра мини-таблеток				
Общий полипептид	Активный фармацевтический ингредиент (API)	45,7	225	15
Маннит	Вещество, способствующее прессованию	12,0	59,25	3,95
Микрокристаллическая целлюлоза	Вещество, способствующее прессованию	14,6	72	4,8
Натриевая кросскармелоза	Вещество, хорошо способствующее	3,1	15	1

	распадаемости			
Стеарат магния	Смазывающее вещество	0,8	3,75	0,25
Внутренняя оболочка				
Гидроксипропилметил целлюлоза	Полимерная оболочка	3,8	18,75	1,25
pH-чувствительная энтеросолюбильная оболочка				
Eudragit® L100	Энтеросолюбильная полимерная оболочка	11,7	57,76	3,85
Триэтилцитрат	Пластификатор	2,3	11,51	0,77
Тальк	Вещество, препятствующее слипанию	5,9	28,93	1,93
Лаурилсульфат натрия	Поверхностно-активное вещество	0,04	0,20	0,01

Общий полипептид в композиции имеет чистоту примерно 70–90%, так что 225 мг полипептида содержат 185 мг фармацевтически активного связывающего полипептида.

Мини-таблетки были получены с помощью следующей методики.

Лиофилизированный полипептид смешивали с маннитом и частью стеарата магния и подвергали сухому комкованию для увеличения его плотности. Этот материал затем пропускали через сито, смешивали с другими наполнителями мини-таблетки (микrokристаллической целлюлозой, кроскармеллозой натрия и оставшимся стеаратом магния) и пресовали, получая мини-таблетки. Эти мини-таблетки затем покрывали 5%-м раствором гидроксипропилметилцеллюлозы в смеси этанол:вода (80:20), высушивали и удаляли растворитель, чтобы создать внутреннюю оболочку и более гладкую поверхность. Мини-таблетки затем покрывали полимером Eudragit® L100 вместе с триэтилцитратом, тальком и лаурилсульфатом натрия в виде органического раствора в изопропиловом спирте и воде и высушивали, чтобы создать pH-чувствительную энтеросолюбильную оболочку. Полученные в результате мини-таблетки с диаметром приблизительно 3 мм затем

помещали в капсулы в дозах, приведенных выше. pH-чувствительное энтеросолюбильное покрытие имеет толщину 100-170 мкм. Анти-TNF-альфа ICVD по изобретению, используемый в данной композиции, также указывается ниже как «фармацевтически активный связывающий полипептид», «ICVD» и «полипептид».

Пример 12: введение яванским макакам – концентрация полипептида в различных отсеках кишечного тракта и в фекалиях

12.1 Концентрация полипептида в различных отделах кишечного тракта

Было проведено исследование с целью оценки профиля высвобождения композиции, аналогичной приведенной в примере 11, в кишечном тракте при пероральном введении самкам яванского макака. Профиль высвобождения оценивали с помощью анализа концентрации полипептида в различных отделах кишечного тракта.

Одну капсулу, содержащую 11 мини-таблеток, вводили перорально каждой из трех яванских макак (обезьяны указаны как M234, M236 и M238). Композиция мини-таблеток отличалась от композиции из примера 11 тем, что каждая мини-таблетка содержала дополнительно 1 мг метиленового синего (краситель) и ICVD в дозе 141 мг. 8 из мини-таблеток также содержали 0,7 мг изопреналина. Краситель метиленовый синий предназначался для визуального анализа распределения растворенных мини-таблеток в желудочно-кишечном тракте (не обсуждается в данном описании), и изопреналин предназначался для использования в мониторинге исследования частоты сердечных сокращений (не обсуждается в данном описании).

Через четыре часа после перорального приема животных умерщвляли. Желудочно-кишечный тракт аккуратно удаляли, различные отделы ЖКТ сшивали, затем собирали содержимое и смывы из желудка и кишечного просвета. Количество нерастворившихся и частично растворившихся мини-таблеток записывали, и удаляли эти мини-таблетки. Затем образцы гомогенизировали и замораживали до анализа. После первоначального центрифугирования суспензий в течение 5 мин при 5000 об/мин при 10°C, 1 мл надосадочной жидкости удаляли из каждого образца и центрифугировали при 13300

об/мин в микроцентрифуге при той же температуре в течение 5 мин. Затем супернатанты снова центрифугировали при тех же условиях, но в течение 20 мин, после чего их анализировали с использованием стандартного конкурентного ELISA с антителами Хумира. Все разведения образцов и Хумира, а также стандарта ICVD готовили в PBS, содержащем 1% BSA, 0,6 М NaCl, 1% АВ-сыворотки человека, 0,05% Tween-20 и 2х протеазные ингибиторы. Концентрации ICVD интерполировали из стандартной кривой с использованием подгонки к уравнению 4-параметрической нелинейной кривой в GraphPad Prism. Концентрации ICVD в неразбавленных образцах ЖКТ были получены умножением среднего для наиболее хорошо интерполированных данных на коэффициент разбавления супернатанта.

В желудке, двенадцатиперстной кишке, тощей или подвздошной кишке животных M236 или M238 не было найдено неповрежденных мини-таблеток. У M234 были обнаружены 4 неповрежденные мини-таблетки в желудке, 1 в двенадцатиперстной кишке и 1 - в тощей кишке. Ни одной частично растворенной мини-таблетки не было найдено ни в одном отделе ЖКТ ни у одной обезьяны.

Приготовление суспензии супернатантов делает необходимым добавление больших объемов буфера, неизбежно разбавляя ICVD. На фиг.7 представлены ожидаемые просветные концентрации ICVD. Они были вычислены из предположения, что содержимое просветной части ЖКТ имеет удельный вес 1, путем умножения концентраций ICVD в супернатанте на кратность разведения при добавлении буфера. Как показано, очень высокие концентрации ICVD (0,1 -> 1 мМ), по-видимому, образуются в просветной части некоторых отделов ЖКТ обезьян.

ICVD был обнаружен в содержимом желудка только одной обезьяны яванского макака (M234). ICVD был также найден в высоких концентрациях в содержимом подвздошной кишки, слепой кишки и верхней части ободочной кишки всех обезьян. Кроме того, у M234 и M238 ICVD обнаруживался в высоких концентрациях в содержимом тощей кишки (фиг.7).

И, наконец, вычисляли % выделенного ICVD, предполагая, что фактическая доза через 4 ч была доставлена только мини-

таблетками, которые растворились. Как показано на фиг.8, между 51,5 и 74,9% дозы ICVD было в наличии.

Это исследование показало, что анти-TNF-альфа ICVD по изобретению может быть доставлен в высоких концентрациях в нижние отделы ЖКТ яванского макака. Тот факт, что некоторые мини-таблетки не растворялись через 4 ч после введения дозы свидетельствует о том, что доза будет доставляться в течение определенного периода времени, предполагая возможность пролонгированного воздействия. Если экстраполировать эти данные на лечение больных IBD с использованием анти-TNF-альфа-связывающего полипептида, разумно ожидать, что концентрация анти-TNF-альфа полипептида, достигаемая в нижних отделах ЖКТ, будет более чем достаточной для эффективной нейтрализации TNF-альфа.

12.2 Концентрация полипептида в фекалиях

Одну капсулу, содержащую 11 мини-таблеток, вводили перорально каждой из трех макаков. Композиция мини-таблеток отличалась от композиции из примера 11 тем, что каждая мини-таблетка содержала дополнительно 1 мг метиленового синего (краситель), и 8 мини-таблеток также содержали 0,7 мг изопреналина. Краситель метиленовый синий предназначался для визуального анализа распределения растворенных мини-таблеток в фекалиях, а изопреналин предназначался для использования в мониторинге исследования частоты сердечных сокращений (не обсуждается в данном описании).

Объединенные фекалии от обезьян были собраны через 8, 12, 20, 24 и 36 ч (ни один из образцов не был собран через 16 ч). Ни в одном из образцов кала не было найдено ни одной мини-таблетки. Образцы смешивали с буфером для экстракции (0,1% BSA, 0,6 M NaCl, 0,05% Tween 20, 1x протеазные ингибиторы, 5 mM EDTA в PBS) в соотношении 1 г фекалий/4мл буфера, а затем гомогенизировали, и суспензии замораживали при -80°C для хранения до проведения анализа. Визуальный осмотр показал голубую окраску в суспензиях от 12, 20, 24 и 36 ч. Предыдущие эксперименты *in vitro* (не показаны) показали, что увеличение концентрации метиленового

синего при растворении мини-таблеток прямо коррелирует с концентрацией ICVD.

Суспензии размораживали и центрифугировали в течение 5 мин при 4000 об/мин (3200×g), чтобы удалить большую часть твердых частиц. Около 1 мл каждого супернатанта переносили в пробирки Eppendorf и центрифугировали в микроцентрифуге при 13500 об/мин, 10°C в течение 5 мин, после чего супернатант помещали в новые пробирки и центрифугировали в течение 20 мин при 10°C. Супернатанты затем немедленно использованы для измерения ICVD с использованием конкурентного ELISA с Хумира.

Данные OD450, полученные в ELISA для различных фекальных супернатантов, показаны на фиг.9. Данные ясно показывают, что ICVD присутствует в супернатантах образцов фекалий во всех временных точках, с возможным исключением супернатанта от 36 ч (хотя можно отметить незначительную активность при самом низком разведении).

Интерполяция этих данных на стандартные кривые для ICVD с использованием GraphPad Prism и умножение на коэффициент разбавления добавленного буфера дали концентрации ICVD в каждом образце фекалий, с использованием предположения, что 1 г фекалий эквивалентен 1 мл объема жидкости, и что полипептид равномерно распределен в фекалиях. Они приведены на фиг.10.

С использованием объемов суспензий (рассчитанных на основе 1г фекалий=1 мл+объем буфера для экстракции) количество ICVD в мкг было определено в каждом образце (фиг.11)).

В итоге, стабильная высокая концентрация фармацевтически активного связывающего полипептида была достигнута в ЖКТ яванского макака более чем на 8 часов.

Пример 13: введение человеку – концентрация полипептида в илеоцекальном клапане и в фекалиях

13.1 Концентрация полипептида в илеоцекальном клапане

Целью данного исследования была демонстрация того, что анти-TNF-альфа ICVD по изобретению, включенный в композицию из примера 11, доставляется в высоких концентрациях в илеоцекальный клапан у человека, основной участок, затрагиваемый болезнью

Крона и проксимальной участок изъязвлений при болезни Крона в кишечнике у многих пациентов.

Каждый из четырех добровольцев с калоприемниками после илеостомии получал разовую пероральную дозу 1665 мг ICVD, в форме мини-таблеток внутри капсул с размером 00 (в общей сложности 9 капсул). У этих во всем остальном здоровых индивидуумов, все содержимое подвздошной кишки стекает в съёмный внешний приемник. Через каждый час после введения дозы, калоприемник, содержащий общий сток из подвздошной кишки, удаляли, замораживали и устанавливали новый приемник. Образцы из илеостомы собирали таким образом каждый час в течение 12 часов после введения дозы. После этого времени, образцы из илеостомы собирали каждые четыре часа до 24 часов после введения дозы. В качестве контроля также был отобран образец перед введением дозы (день -1). Любую частично растворенную мини-таблетку, замеченную в мешках, удаляли перед анализом, так что анализировали только полностью растворившийся ICVD. ICVD экстрагировали из жидкого содержимого подвздошной кишки, и концентрации активного ICVD определяли с помощью функционального ELISA, при условии, что 1 г жидкого содержимого подвздошной кишки эквивалентен 1 мл объема жидкости.

Данные показали высокие концентрации активного ICVD, присутствующего в калоприемниках после илеостомы, в диапазоне от 200 нМ до 1 мМ. Кроме того, высокие концентрации наблюдались в течение нескольких часов смены мешков для каждого субъекта (см. таблицу 10).

Таблица 10

Субъект	Время после введения дозы (ч)	Концентрация ICVD в жидком содержимом подвздошной кишки (нМ)
31001	2	406350
31001	3	305560
31001	4	791
31002	2	32780
31002	3	1130000

31002	4	792060
31002	5	81750
31002	6	12780
31002	7	1300
31002	8	422
31002	9	1410
31002	10	7520
31002	11	10080
31002	12	9210
31002	16	6980
31003	3	1060000
31003	4	496030
31003	5	7080
31003	8	46110
31003	9	75480
31003	10	16030
31003	11	72940
31003	12	15870
31003	16	881
31004	2	126190
31004	3	235
31004	4	11110
31004	5	3770
31004	6	6730

ICVD не детектировался ни в одном из образцов, отобранных в день перед введением дозы (-1), ни у одного субъекта.

Таким образом, стабильная и высокая концентрация фармацевтически активного связывающего полипептида была достигнута в илеоцекальном клапане у этих добровольцев.

13.2 Концентрация полипептида в фекалиях

Здоровым субъектам мужского пола в возрасте 18-45 лет перорально вводили разовую дозу 62, 555, 1665 или 4995 мг ICVD, с использованием композиции, описанной в примере 11. Каждую разовую дозу каждому субъекту вводили между 8:30 до 12:00 в день 1. Образцы кала собирали перед введением дозы (либо в день -1,

или перед введением дозы в 1-й день) и во все доступные промежутки времени после введения дозы вплоть до утра 4-го дня (конец исследования). ICVD экстрагировали из фекалий, и концентрацию активного ICVD определяли с помощью функционального ELISA, при условии, что 1 г фекалий эквивалентен 1 мл объема жидкости, и что полипептид равномерно распределен в фекалиях.

Высокие концентрации в диапазоне от 180 нМ до 724 мкМ были получены в фекалиях субъектов (таблица 11).

Таблица 11

Идентификационный номер (ID) субъекта	доза ICVD, мг	День сбора образцов кала	До или после введения дозы	Концентрация ICVD в фекалиях (нМ)
11001	62	-1	До введения дозы	0
11001		1	После введения дозы	1013
13001	555	-1	До введения дозы	0
13001		2	После введения дозы	1052
13003	555	-1	До введения дозы	0
13003		1	После введения дозы	1938
13003		2	После введения дозы	1511
14002	1665	-1	До введения дозы	0
14002		1	После введения дозы	5491
14002		2	После введения дозы	558
14004	1665	-1	До введения дозы	0
14004		2	После введения дозы	27532
14006	1665	-1	До введения дозы	0
14006		2	После введения дозы	62579
15001	4995	-1	До введения дозы	0
15001		1	После введения дозы	10047
15001		2	После введения дозы	135285
15001		3	После введения дозы	330
15004	4995	-1	До введения дозы	0
15004		3	После введения дозы	273
15005	4995	1	До введения дозы	0
15005		1	После введения дозы	724684

15005		2	После введения дозы	258703
15005		3	После введения дозы	3536
15006	4995	-1	До введения дозы	0
15006		1	После введения дозы	57120
15006		2	После введения дозы	358
15006		2	После введения дозы	186

Анти-TNF агенты, которые используются в клинике для лечения болезни Крона, такие как адалимумаб (Хумира) и инфликсимаб (Ремикад), вводят либо путем внутривенной инфузии или подкожной инъекции. В статье Ungar et al. (2016) *Clin Gastroenterol Hepatol.* 14(4):550-557 утверждается что, минимальные сывороточные уровни 56-83 нМ (8-12 мкг/мл) для адалимумаба и 42-70 нМ (6-10 мкг/мл) для инфликсимаба необходимы для достижения заживления слизистой оболочки у 80%-90% пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, и что эти концентрации можно рассматривать как «терапевтическое окно». Эти минимальные уровни в сыворотке также показаны на фиг.7 относительно расчетных концентраций анти-TNF-альфа ICVD в просвете отделов желудочно-кишечного тракта яванских макаков, установленных выше в п.12.1.

Концентрации анти-TNF-альфа ICVD, доставленные в илеоцекальный клапан (см. раздел 13.1 выше) и выделяемые из фекалий добровольцев во время клинических испытаний в этом разделе, были значительно выше этих уровней, и, таким образом, согласно прогнозу, будут эффективными в качестве лечения болезни Крона. Это позволяет предположить, что концентрации анти-TNF-альфа ICVD в кишечном просвете сопоставимы с сывороточными концентрациями доступных в продаже анти-TNF агентов в отношении доступа/проникновения в слизистую оболочку и подслизистую оболочку кишечника. Однако в дальнейшей экспериментальной работе было продемонстрировано (здесь не показано), что данные анти-TNF-альфа ICVD по изобретению, вводимые перорально мышам с DSS-колитом, способны проникать в собственную пластинку, где они удерживаются в течение нескольких часов, несмотря на отсутствие связывания с мишенью (TNF) у мышей.

Вместе с данными, представленными в п.13.1 выше, эти результаты демонстрируют успешную доставку ICVD в терапевтическом количестве в отделы от илеоцекального клапана до заднего прохода.

Пример 14: введение человеку - исследование иммуногенности

Белковые препараты, включая терапевтические антитела, могут вызывать иммунный ответ у пациентов. Вырабатываемые у пациентов антитела (нескольких классов Ig), которые распознают антигенные детерминанты белковых лекарственных средств, называются анти-лекарственными антителами (ADA). Наличие ADA может привести к потере эффективности/активности лекарственного средства или побочным эффектам у пациента (van Schie et al., *Ann Rheum Dis* 2015 74:311-314).

Было проведено исследование для оценки того, вызывает ли длительное пероральное введение человеку композиции из примера 11 ADA-ответ. Здоровым мужчинам в возрасте 18-45 лет вводили перорально три раза в день в течение 14 дней капсулы, содержащие 1665 мг ICVD (в общей сложности, 4995 мг в день) или плацебо, в форме мини-таблеток согласно примеру 11. Образцы сыворотки у субъектов собирали до введения дозы, в дни 7-й и 14-й после введения дозы, и, наконец, через 28 дней (через 14 дней после прекращения лечения). Эти образцы были проанализированы с помощью сэндвич-ELISA на наличие анти-ICVD антител (ADA-антител). Этот анализ показал ADA-положительные сыворотки, хотя и при низких титрах, у 4 добровольцев, двое из которых получали плацебо. У всех этих индивидуумов ADA присутствовали в каком-то количестве еще до введения ICVD (предсуществующие ADA).

Анализ активности ICVD в TNF-TNFR2 ELISA показал, что присутствие всех ADA-положительных образцов сыворотки человека в количестве 5% не влияет на активность ICVD в отношении TNF-альфа. Поэтому, никаких доказательств наличия ICVD-нейтрализующих ADA не было обнаружено в сыворотке крови ни одного добровольца ни в одной временной точке (см. таблицу 12).

Таблица 12

Идентификационный номер	Действующее вещество	Образец	Скрининг с помощью	Титр ADA/разведение	Нейтрализация ICVD
-------------------------	----------------------	---------	--------------------	---------------------	--------------------

(ID) субъекта	или плацебо		сэндвич- ELISA на ADA	сыворотки	
21001	Действующее	Перед введением дозы	Отрицательный		
21001	Действующее	День 7	Отрицательный		
21001	Действующее	День 14	Отрицательный		
21001	Действующее	День 28	Отрицательный		
21002	Действующее	Перед введением дозы	Отрицательный		
21002	Действующее	День 7	Отрицательный		
21002	Действующее	День 14	Отрицательный		
21002	Действующее	День 28	Отрицательный		
21003	Действующее	Перед введением дозы	Отрицательный		
21003	Действующее	День 7	Отрицательный		
21003	Действующее	День 14	Отрицательный		
21003	Действующее	День 28	Отрицательный		
21004	Плацебо	Перед введением дозы	Положительный	64	Нет
21004	Плацебо	День 7	Положительный	64	Нет
21004	Плацебо	День 14	Положительный	64	Нет
21004	Плацебо	День 28	Положительный	64	Нет
21005	Действующее	Перед введением дозы	Положительный	64	Нет
21005	Действующее	День 7	Положительный	32	Нет
21005	Действующее	День 14	Положительный	32	Нет
21005	Действующее	День 28	Положительный	32	Нет
21006	Действующее	Перед введением дозы	Отрицательный		
21006	Действующее	День 7	Отрицательный		
21006	Действующее	День 14	Отрицательный		
21006	Действующее	День 28	Отрицательный		
21007	Действующее	Перед введением дозы	Отрицательный		
21007	Действующее	День 7	Отрицательный		

21007	Действующее	День 14	Отрицательный		
21007	Действующее	День 28	Отрицательный		
21008	Действующее	Перед введением дозы	Положительный	4	Нет
21008	Действующее	День 7	Положительный	4	Нет
21008	Действующее	День 14	Положительный	8	Нет
21008	Действующее	День 28	Положительный	128	Нет
21009	Плацебо	Перед введением дозы	Положительный	8	Нет
21009	Плацебо	День 7	Положительный	8	Нет
21009	Плацебо	День 14	Положительный	16	Нет
21009	Плацебо	День 28	Положительный	8	Нет
21010	Действующее	Перед введением дозы	Отрицательный		
21010	Действующее	День 7	Отрицательный		
21010	Действующее	День 14	Отрицательный		
21010	Действующее	День 28	Отрицательный		

Положения изобретения

Набор положений, определяющих изобретение и его предпочтительные аспекты, приведен ниже:

1. Полипептид, содержащий переменный домен цепи иммуноглобулина, который связывается с TNF-альфа, где переменный домен цепи иммуноглобулина состоит из трех определяющих комплементарность областей (CDR1-CDR3) и четырех каркасных областей (FR1-FR4), где CDR1 содержит последовательность, имеющую 60% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 1, CDR2 содержит последовательность, имеющую 50% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 2, и

(a) CDR3 содержит последовательность, имеющую 80% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 3

или

(b) CDR3 содержит последовательность, имеющую 50% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 3, и где остаток CDR3, соответствующий остатку номер 3 из SEQ ID

NO: 3, представляет собой R, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y или V.

2. Полипептид по п.1, где остаток CDR3, соответствующий остатку номер 3 из SEQ ID NO: 3, представляет собой R, H, D, E, N, Q, S, T, Y, G, V, L, W, P, M, C, F или I.

3. Полипептид по п.2, где остаток CDR3, соответствующий остатку номер 3 из SEQ ID NO: 3 представляет собой H.

4. Полипептид по п.3, где CDR3 содержит SEQ ID NO: 3.

5. Полипептид по п.1, где последовательность CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 или SEQ ID NO: 72.

6. Полипептид по любому одному из пп.1-5, где CDR1 содержит последовательность, имеющую 80% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 1.

7. Полипептид по п.6, где CDR1 содержит SEQ ID NO: 1.

8. Полипептид по п.6, где последовательность CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 60.

9. Полипептид по любому одному из пп.1-8, где CDR2 содержит последовательность, имеющую 55% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 60% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 70% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 75% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 80% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 85% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 90% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 2.

10. Полипептид по п.9, где CDR2 содержит SEQ ID NO: 2.

11. Полипептид по п.9, где последовательность CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69.

12. Полипептид по любому одному из пп.1-11, который содержит последовательность, имеющую 50% или больший процент

идентичности по последовательности, например, имеющую 55% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 60% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 65% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 70% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 75% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 80% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 85% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 90% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 95% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 96% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 97% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 98% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 99% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 8.

13. Полипептид по п.12, который содержит SEQ ID NO: 8.

14. Полипептид по любому одному из пп.1-13, который выбран из списка, состоящего из: VNH, VH, VL, V-NAR, Fab-фрагмента и F(ab')₂-фрагмента.

15. Полинуклеотид, кодирующий полипептид по любому одному из пп.1-14, в частности, где полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, имеющей 70% или больший %, например, 80% или больший %, например, как 90% или больший %, например, 95% или больший %, например, 99% или больший % идентичности по последовательности с любой одной из SEQ ID NO: 83-88, или, более конкретно, где полинуклеотид содержит или состоит из любой одной из SEQ ID NO: 83-88.

Разное

Все ссылки, указанные в настоящей заявке, включая патенты и патентные заявки, включены в данное описание путем ссылки в максимально возможной степени.

В описании и формуле изобретения, которая следует ниже,

если контекст не требует иного, слово «содержат» и его вариации, такие как «содержит» и «содержащий», следует понимать, как подразумевающие включение указанных целого числа, стадии, группы целых чисел или группы стадий, но не исключение любого другого целого числа, стадии, группы целых чисел или группы стадий.

Заявка, частью которой являются это описание и формула, может быть использована в качестве основы для приоритета в отношении любой последующей заявки. Пункты формулы такой последующей заявки могут быть направлены на любой признак или комбинацию признаков, описанных в настоящей заявке. Они могут принимать форму заявки на продукт, композицию, способ или использование и могут включать в себя, например, и без ограничения, нижеследующую формулу изобретения.

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

Название (SEQ ID NO)	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
<u>Семейство последовательностей 1</u>							
Q65F2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS SHWMY GFD FS		WVRQAPGKGLE WVS	EINTNGLITSYVD SVKG	RFTVSRDNAANTLYLEMTSLEPED TALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTV SS
(23)							
Q65F3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS SHWMY GFD FS		WVRQAPGKGLE WVS	EINTNGLITKYID SVRG	RFTASRDNAANTLYLEMTNLEPED TALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTV SS
(24)							
Q62F2	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS SHWMY GFD FN		WVRQAPGKGLE WVS	EINTNGLITNYVD SVKG	RFTVSRDNAANTLYLEMTSLKPED TALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTV SS
(25)							
Q65G1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVAS SHWMY GFD FY		WVRQAPGKGLE WVS	EINTNGLITKYID SVRG	RFTVSRDNAANTLYLEMTNLEPED TALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTV SS
(26)							
Q65H6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVAS SHWMY GFD FY		WVRQAPGKGLE WVS	EINTNGLITKYID SVRG	RFTVSRDNAANTLYLEMTNLEPED TALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTV SS
(27)							
Q65F1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS VHWMY GFD FG		WVRQAPGKGLE WVS	EINTNGLITKYID SVGG	RFTVSRDNAANRLYLEMTNLEPED TALYYCAR	NQMGLN	KGQGTQVTV SS
(28)							
Q65D1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS NHWMC GFD FD		WVRQAPGKGLE WVS	EINTNGLITKYAD FVKG	RFTVSRDNAANTLYLQITRLKPED TALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTV SS
(29)							
Q65C7	EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCTAS SHWMY GFD FS		WVRQAPGKGLE WVS	EINTNGLITKYAD FVKG	RFTVSRDNAANTLYLEITRLEPED TALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTV SS
(30)							
Q65D3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVAS SHWMY GFD FS		WVRQAPGKGLE WVS	EINTNGLITKYAD STKG	RFTVSRDNAANMLNLEMTSLEPED TALYYCAR	NERGLN	KGQGTQVTV SS
(31)							
Q65B1	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS SHWMY GFD FS		WVRQAPGKELE WLS	EINTNGLITKYGD SVKG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED TALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTV SS
(32)							
<u>Семейство последовательностей 2</u>							
Q65F6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS IHWMY GFD FG		WVRQAPGKELE WVA	EINTNGLITLYSD SVRG	RFTASRDNANNALFLQMNDLKPED TAVYYCAK	SRNGAA	KGQGTQVTV SS
(33)							

Q65F11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS IHWMY GFDFG	WVRQAPGKELE WVA	EINTNGLITLYAD SVKG	RFTASRDNAKNALFLQMNDLKPED TAVYYCAK	ARNGAA	KGQGTQVTV SS
(34)						
Q65E12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSAS IHWMY GFDFS	WVRQAPGKELE WVA	EINTNGLITLYAD SVKG	RFTASRDNAKNALFLQMNDLKPED TAVYYCAK	SRNGAA	GGQGTQVTV SS
(35)						
Q65C12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS IHWMY GFPPD	WVRQAPGKELE WVA	EINTNALITTYAD SVKG	RFTISRDNANKNTLFLQMNDLKPED TAVYYCTH	SRNGAA	KGQGTQVTV SS
(36)						
Q65A6	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTAS IHWMY GLDFG	WVRQAPGKELE WVA	EINTNGLITHYTD SVSG	RFTISRDNANKNTLFLQMNDLKPED TAVYACAT	SRNGAA	KGQGTQVTV SS
(37)						
Q65A3	EVQLVESGGGLVQPGGSLRPSCCTS IHWMY GLDFG	WVRQAPGKELE WVA	EINTNALITKYAD SVKG	RFTISRDNANKNTLFLQMNDLKSED TAVYYCSN	TQNGAA	KGQGVQVTV SS
(38)						
Q62E10	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTTS IHWMY GLDFG	WVRQAPGKELE WVA	EINTNALITKYAD SVKG	RFTISRDNANKNTLFLQMNDLKSED TAVYYCSN	TQNGAA	KGQGVQVTV SS
(22)						
Q62F10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVAS IHWMY GFDFN	WVRQAPGKELE WVA	EINTNGLITVYPD SVKG	RFTISRDNANKNTLFLQMNNLKPED TAVYYCTN	TQNGKT	KGQGTQVTV SS
(39)						
<u>Конструкции и мутанты на основе Q65B1</u>						
ID7F-EV	EVQLVESGGGLVQPGASLKLSCAAS SHWMY GFDFS	WVRQAPGKELE WLS	EINTNGLITKYGD SVKG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED TALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTV SS
(41)						
ID9F-EV	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS SHWMY GFDFS	WVRQAPGKELE WLS	EINTNGLITKYGD SVHG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED TALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTV SS
(43)						
ID13F-EV	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS SHWMY GFDFS	WVRQAPGKELE WLS	EINTNGLITKYGD SVKG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED TALYYCAR	NQHGLN	KGQGTQVTV SS
(44)						
ID14F-EV	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS SHWMY GFDFS	WVRQAPGKELE WLS	EINTNGLITKYGD SVKG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED TALYYCAR	NQKGLN	HGQGTQVTV SS
(45)						
ID15F-EV	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS SHWMY GFDFS	WVRQAPGKELE WLS	EINTNGLITKYGD SVKG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED TALYYCAR	NQHGLN	HGQGTQVTV SS
(46)						
ID22F	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS SHWMY GFDFS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS GGGGS	WVRQAPGKELE WLS	EINTNGLITKYGD SVKG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED TALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTV SS
	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLITKYGD	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQKGLN	KGQGTQVTV

(47)	GFDFS		WLS	SVKG	TALYYCAR		SS
ID23F	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLITHYGD	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQKGLN	KGQGTQVTV
	GFDFS		WLS	SVKG	TALYYCAR		SS
	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS						
	GGGGS						
	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLITHYGD	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQKGLN	KGQGTQVTV
	GFDFS		WLS	SVKG	TALYYCAR		SS
(48)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS		SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLITHYGD	RFTVSRNNAANSMYLELTRLEPED	NQKGLN
ID24F	GFDFS		WLS	SVKG	TALYYCAR		KGQGTQVTV
	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS						SS
	GGGGS						
	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLITHYGD	RFTVSRNNAANSMYLELTRLEPED	NQKGLN	KGQGTQVTV
	GFDFS		WLS	SVKG	TALYYCAR		SS
(49)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS		SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLITHYGD	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQHGLN
ID25F	GFDFS		WLS	SVKG	TALYYCAR		KGQGTQVTV
	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS						SS
	GGGGS						
	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLITHYGD	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQHGLN	KGQGTQVTV
	GFDFS		WLS	SVKG	TALYYCAR		SS
(50)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS		SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLITHYGD	RFTVSRNNAANSMYLELTRLEPED	NQHGLN
ID26F	GFDFS		WLS	SVKG	TALYYCAR		KGQGTQVTV
	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS						SS
	GGGGS						
	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLITHYGD	RFTVSRNNAANSMYLELTRLEPED	NQHGLN	KGQGTQVTV
	GFDFS		WLS	SVKG	TALYYCAR		SS
(51)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS		SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLITHYGD	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQKGLN
ID27F	GFDFS		WLS	SVHG	TALYYCAR		KGQGTLVTV
	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS						SS
	GGGGS						
	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLITHYGD	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQKGLN	KGQGTLVTV
	GFDFS		WLS	SVHG	TALYYCAR		SS
(52)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS		SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLITKYGD	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQKGLN
ID28F	GFDFS		WLS	SVHG	TALYYCAR		KGQGTQVTV
	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS						SS
	GGGGS						
	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS	SHWMY	WVRQAPGKELE	EINTNGLITKYGD	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED	NQKGLN	KGQGTQVTV

(53)	GFDFS	WLS	SVHG	TALYYCAR		SS
ID29F	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS SHWMY GFDFS GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS GGGS	WVRQAPGKELE WLS	EINTNGLITKYGD SVHG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED TALYYCAR	NQHGLN	KGQGTQVTV SS
(54)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS SHWMY GFDFS	WVRQAPGKELE WLS	EINTNGLITKYGD SVHG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED TALYYCAR	NQHGLN	KGQGTQVTV SS
ID8F-EV	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS SHWMY GFDFS	WVRQAPGKELE WLS	EINTNGLITHYGD SVKG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED TALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTV SS
(42)	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS SHWMY GFDFS	WVRQAPGKELE WLS	EINTNGLITHYGD SVKG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED TALYYCAR	NQHGLN	KGQGTQVTV SS
ID34F	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS SHWMY GFDFS	WVRQAPGKELE WLS	EINTNGLITHYGD SVKG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED TALYYCAR	NQHGLN	KGQGTQVTV SS
(56)	DVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS SHWMY GFDFS	WVRQAPGKELE WLS	EINTNGLITHYGD SVKG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED TALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTV SS
ID37F	DVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS SHWMY GFDFS	WVRQAPGKELE WLS	EINTNGLITHYGD SVKG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED TALYYCAR	NQKGLN	KGQGTQVTV SS
(57)	DVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS SHWMY GFDFS	WVRQAPGKELE WLS	EINTNGLITHYGD SVKG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED TALYYCAR	NQHGLN	KGQGTQVTV SS
ID38F	DVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS SHWMY GFDFS	WVRQAPGKELE WLS	EINTNGLITHYGD SVKG	RFTVSRNNAANKMYLELTRLEPED TALYYCAR	NQHGLN	KGQGTQVTV SS
(8)	<u>Сравнительные примеры</u>					
Q62F11	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS DYVMG GFSFS	WFRQAPGKERE FVG	FIRWDGLVTRYAD AVKG	RFTISRDNARNTLSLQTIIGLLAED TAVYYCAA	SGGGSGPVNAGS YEY	WGQGTQVTV SS
(40)						

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Vhsquared Limited

<120> Полипептиды

<130> VHS-P1859PC

<160> 88

<170> BiSSAP 1.3

<210> 1

<211> 5

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ID38F CDR1

<400> 1

Ser	His	Trp	Met	Tyr
1				5

<210> 2

<211> 17

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ID38F CDR2

<400> 2

Glu	Ile	Asn	Thr	Asn	Gly	Leu	Ile	Thr	His	Tyr	Gly	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 3

<211> 6

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ID38F CDR3

<400> 3

Asn	Gln	His	Gly	Leu	Asn
1				5	

<210> 4

<211> 30

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ID38F FR1

<400> 4

Asp	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asp	Phe	Ser		
			20					25					30		

<210> 5
<211> 14
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ID38F FR2

<400> 5
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu Ser
1 5 10

<210> 6
<211> 32
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ID38F FR3

<400> 6
Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr Leu Glu
1 5 10 15
Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 7
<211> 11
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ID38F FR4

<400> 7
Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 8
<211> 115
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ID38F

<400> 8
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His
20 25 30
Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Gly Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr
65 70 75 80
Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asn Gln His Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser

<210> 9
 <211> 157
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Растворимый TNF-альфа человека

<400> 9
 Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val
 1 5 10 15
 Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
 20 25 30
 Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
 35 40 45
 Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
 50 55 60
 Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Thr His Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala
 85 90 95
 Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys
 100 105 110
 Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys
 115 120 125
 Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
 130 135 140
 Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 145 150 155

<210> 10
 <211> 233
 <212> Белок
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Мембраносвязанный TNF-альфа человека

<400> 10
 Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Glu Ala
 1 5 10 15
 Leu Pro Lys Lys Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys Leu Phe
 20 25 30
 Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe
 35 40 45
 Cys Leu Leu His Phe Gly Val Ile Gly Pro Gln Arg Glu Glu Phe Pro
 50 55 60
 Arg Asp Leu Ser Leu Ile Ser Pro Leu Ala Gln Ala Val Arg Ser Ser
 65 70 75 80
 Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro
 85 90 95
 Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu
 100 105 110
 Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser
 115 120 125
 Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly
 130 135 140
 Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala
 145 150 155 160
 Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro
 165 170 175
 Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu

			180					185				190			
Pro	Ile	Tyr	Leu	Gly	Gly	Val	Phe	Gln	Leu	Glu	Lys	Gly	Asp	Arg	Leu
		195					200					205			
Ser	Ala	Glu	Ile	Asn	Arg	Pro	Asp	Tyr	Leu	Asp	Phe	Ala	Glu	Ser	Gly
	210					215					220				
Gln	Val	Tyr	Phe	Gly	Ile	Ile	Ala	Leu							
225					230										

<210> 11

<211> 157

<212> Белок

<213> Macaca fascicularis

<220>

<223> Растворимый TNF-альфа яванского макака

<400> 11

Val	Arg	Ser	Ser	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Asp	Lys	Pro	Val	Ala	His	Val
1			5						10					15	
Val	Ala	Asn	Pro	Gln	Ala	Glu	Gly	Gln	Leu	Gln	Trp	Leu	Asn	Arg	Arg
		20					25					30			
Ala	Asn	Ala	Leu	Val	Ala	Asn	Gly	Val	Glu	Leu	Thr	Asp	Asn	Gln	Leu
	35					40					45				
Val	Val	Pro	Ser	Glu	Gly	Leu	Tyr	Leu	Ile	Tyr	Ser	Gln	Val	Leu	Phe
	50				55					60					
Lys	Gly	Gln	Gly	Cys	Pro	Ser	Asn	His	Val	Leu	Leu	Thr	His	Thr	Ile
65				70					75						80
Ser	Arg	Ile	Ala	Val	Ser	Tyr	Gln	Thr	Lys	Val	Asn	Leu	Leu	Ser	Ala
			85					90						95	
Ile	Lys	Ser	Pro	Cys	Gln	Arg	Glu	Thr	Pro	Glu	Gly	Ala	Glu	Ala	Lys
		100					105					110			
Pro	Trp	Tyr	Glu	Pro	Ile	Tyr	Leu	Gly	Gly	Val	Phe	Gln	Leu	Glu	Lys
	115					120					125				
Gly	Asp	Arg	Leu	Ser	Ala	Glu	Ile	Asn	Leu	Pro	Asp	Tyr	Leu	Asp	Phe
	130					135				140					
Ala	Glu	Ser	Gly	Gln	Val	Tyr	Phe	Gly	Ile	Ile	Ala	Leu			
145					150					155					

<210> 12

<211> 233

<212> Белок

<213> Macaca fascicularis

<220>

<223> Мембраносвязанный TNF-альфа яванского макака

<400> 12

Met	Ser	Thr	Glu	Ser	Met	Ile	Gln	Asp	Val	Glu	Leu	Ala	Glu	Glu	Ala
1			5						10					15	
Leu	Pro	Arg	Lys	Thr	Ala	Gly	Pro	Gln	Gly	Ser	Arg	Arg	Cys	Trp	Phe
		20					25					30			
Leu	Ser	Leu	Phe	Ser	Phe	Leu	Leu	Val	Ala	Gly	Ala	Ala	Thr	Leu	Phe
	35					40					45				
Cys	Leu	Leu	His	Phe	Gly	Val	Ile	Gly	Pro	Gln	Arg	Glu	Glu	Phe	Pro
	50				55				60						
Lys	Asp	Pro	Ser	Leu	Ile	Ser	Pro	Leu	Ala	Gln	Ala	Val	Arg	Ser	Ser
65				70					75					80	
Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Asp	Lys	Pro	Val	Ala	His	Val	Val	Ala	Asn	Pro
			85					90						95	
Gln	Ala	Glu	Gly	Gln	Leu	Gln	Trp	Leu	Asn	Arg	Arg	Ala	Asn	Ala	Leu
		100					105					110			
Val	Ala	Asn	Gly	Val	Glu	Leu	Thr	Asp	Asn	Gln	Leu	Val	Val	Pro	Ser
	115						120					125			
Glu	Gly	Leu	Tyr	Leu	Ile	Tyr	Ser	Gln	Val	Leu	Phe	Lys	Gly	Gln	Gly
	130					135					140				

Cys	Pro	Ser	Asn	His	Val	Leu	Leu	Thr	His	Thr	Ile	Ser	Arg	Ile	Ala
145					150					155					160
Val	Ser	Tyr	Gln	Thr	Lys	Val	Asn	Leu	Leu	Ser	Ala	Ile	Lys	Ser	Pro
				165					170						175
Cys	Gln	Arg	Glu	Thr	Pro	Glu	Gly	Ala	Glu	Ala	Lys	Pro	Trp	Tyr	Glu
			180					185							190
Pro	Ile	Tyr	Leu	Gly	Gly	Val	Phe	Gln	Leu	Glu	Lys	Gly	Asp	Arg	Leu
		195					200					205			
Ser	Ala	Glu	Ile	Asn	Leu	Pro	Asp	Tyr	Leu	Asp	Phe	Ala	Glu	Ser	Gly
	210					215					220				
Gln	Val	Tyr	Phe	Gly	Ile	Ile	Ala	Leu							
225						230									

<210> 13

<211> 156

<212> Белок

<213> Mus musculus

<220>

<223> Растворимый TNF-альфа мыши

<400> 13

Leu	Arg	Ser	Ser	Ser	Gln	Asn	Ser	Ser	Asp	Lys	Pro	Val	Ala	His	Val
1				5					10					15	
Val	Ala	Asn	His	Gln	Val	Glu	Glu	Gln	Leu	Glu	Trp	Leu	Ser	Gln	Arg
			20					25						30	
Ala	Asn	Ala	Leu	Leu	Ala	Asn	Gly	Met	Asp	Leu	Lys	Asp	Asn	Gln	Leu
		35					40					45			
Val	Val	Pro	Ala	Asp	Gly	Leu	Tyr	Leu	Val	Tyr	Ser	Gln	Val	Leu	Phe
	50					55					60				
Lys	Gly	Gln	Gly	Cys	Pro	Asp	Tyr	Val	Leu	Leu	Thr	His	Thr	Val	Ser
65					70					75					80
Arg	Phe	Ala	Ile	Ser	Tyr	Gln	Glu	Lys	Val	Asn	Leu	Leu	Ser	Ala	Val
				85					90					95	
Lys	Ser	Pro	Cys	Pro	Lys	Asp	Thr	Pro	Glu	Gly	Ala	Glu	Leu	Lys	Pro
		100						105					110		
Trp	Tyr	Glu	Pro	Ile	Tyr	Leu	Gly	Gly	Val	Phe	Gln	Leu	Glu	Lys	Gly
		115					120					125			
Asp	Gln	Leu	Ser	Ala	Glu	Val	Asn	Leu	Pro	Lys	Tyr	Leu	Asp	Phe	Ala
	130					135					140				
Glu	Ser	Gly	Gln	Val	Tyr	Phe	Gly	Val	Ile	Ala	Leu				
145					150					155					

<210> 14

<211> 235

<212> Белок

<213> Mus musculus

<220>

<223> Мембраносвязанный TNF-альфа мыши

<400> 14

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

Ala	Asn	His	Gln	Val	Glu	Glu	Gln	Leu	Glu	Trp	Leu	Ser	Gln	Arg	Ala
			100					105					110		
Asn	Ala	Leu	Leu	Ala	Asn	Gly	Met	Asp	Leu	Lys	Asp	Asn	Gln	Leu	Val
		115					120					125			
Val	Pro	Ala	Asp	Gly	Leu	Tyr	Leu	Val	Tyr	Ser	Gln	Val	Leu	Phe	Lys
	130					135					140				
Gly	Gln	Gly	Cys	Pro	Asp	Tyr	Val	Leu	Leu	Thr	His	Thr	Val	Ser	Arg
145					150					155					160
Phe	Ala	Ile	Ser	Tyr	Gln	Glu	Lys	Val	Asn	Leu	Leu	Ser	Ala	Val	Lys
				165					170					175	
Ser	Pro	Cys	Pro	Lys	Asp	Thr	Pro	Glu	Gly	Ala	Glu	Leu	Lys	Pro	Trp
			180					185					190		
Tyr	Glu	Pro	Ile	Tyr	Leu	Gly	Gly	Val	Phe	Gln	Leu	Glu	Lys	Gly	Asp
		195					200					205			
Gln	Leu	Ser	Ala	Glu	Val	Asn	Leu	Pro	Lys	Tyr	Leu	Asp	Phe	Ala	Glu
	210					215					220				
Ser	Gly	Gln	Val	Tyr	Phe	Gly	Val	Ile	Ala	Leu					
225					230					235					

<210> 15

<211> 5

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Q62E10 CDR1

<400> 15

Ile	His	Trp	Met	Tyr
1				5

<210> 16

<211> 17

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Q62E10 CDR2

<400> 16

Glu	Ile	Asn	Thr	Asn	Ala	Leu	Ile	Thr	Lys	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	
Gly															

<210> 17

<211> 6

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Q62E10 CDR3

<400> 17

Thr	Gln	Asn	Gly	Ala	Ala
1				5	

<210> 18

<211> 30

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Q62E10 FR1

<400> 18
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Leu Asp Phe Gly
20 25 30

<210> 19
<211> 14
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Q62E10 FR2

<400> 19
Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 20
<211> 32
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Q62E10 FR3

<400> 20
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln
1 5 10 15
Met Asn Asp Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Asn
20 25 30

<210> 21
<211> 11
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Q62E10 FR4

<400> 21
Lys Gly Gln Gly Val Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 22
<211> 115
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Q62E10

<400> 22
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Thr Ser Gly Leu Asp Phe Gly Ile His
20 25 30
Trp Met Tyr Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Glu Ile Asn Thr Asn Ala Leu Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Thr	Leu	Phe
65					70					75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Asp	Leu	Lys	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85					90						95	
Ser	Asn	Thr	Gln	Asn	Gly	Ala	Ala	Lys	Gly	Gln	Gly	Val	Gln	Val	Thr
			100					105					110		
Val	Ser	Ser													
		115													

<210> 23

<211> 115

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Q65F2

<400> 23

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

<210> 24

<211> 115

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Q65F3

<400> 24

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

<210> 25

<211> 115

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Q62F2

<400> 25

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

<210> 26

<211> 115

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Q65G1

<400> 26

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

<210> 27

<211> 115

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Q65H6

<400> 27

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly		
1				5					10					15			
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Val	Ala	Ser	Gly	Phe	Asp	Phe	Tyr	Ser	His		
			20					25					30				
Trp	Met	Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val		
		35					40					45					

Ser	Glu	Ile	Asn	Thr	Asn	Gly	Leu	Ile	Thr	Lys	Tyr	Ile	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Arg	Gly	Arg	Phe	Thr	Val	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Ala	Asn	Thr	Leu	Tyr
65					70				75						80
Leu	Glu	Met	Thr	Asn	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Asn	Gln	Lys	Gly	Leu	Asn	Lys	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr
			100					105					110		
Val	Ser	Ser													
		115													

<210> 28

<211> 115

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Q65F1

<400> 28

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

<210> 29

<211> 115

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Q65D1

<400> 29

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

<210> 30

<211> 115
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Q65C7

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

<210> 31
<211> 115
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Q65D3

<400> 31
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His
20 25 30
Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Thr
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Ala Asn Met Leu Asn
65 70 75 80
Leu Glu Met Thr Ser Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asn Glu Arg Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 32
<211> 115
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Q65B1

<400> 32
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His
20 25 30

<210> 35
<211> 115
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Q65E12

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

<210> 36
<211> 115
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Q65C12

<400> 36
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Pro Phe Asp Ile His
20 25 30
Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Glu Ile Asn Thr Asn Ala Leu Ile Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Asp Leu Lys Phe Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr His Ser Arg Asn Gly Ala Ala Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 37
<211> 115
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Q65A6

<400> 37
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

<210> 38

<211> 115

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Q65A3

<400> 38

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

<210> 39

<211> 115

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Q62F10

<400> 39

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

Val Ser Ser
115

<210> 40

<211> 124

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Q62F11

<400> 40

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly		
1				5					10					15			
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Phe	Ser	Asp	Tyr		
			20					25					30				
Val	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Arg	Glu	Phe	Val		
		35					40					45					
Gly	Phe	Ile	Arg	Trp	Asp	Gly	Leu	Val	Thr	Arg	Tyr	Ala	Asp	Ala	Val		
	50				55						60						
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Arg	Asn	Thr	Leu	Ser		
65					70				75						80		
Leu	Gln	Thr	Ile	Gly	Leu	Leu	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
			85						90					95			
Ala	Ala	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Pro	Val	Asn	Ala	Gly	Ser	Tyr	Glu		
			100					105					110				
Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
		115					120										

<210> 41

<211> 115

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ID7F-EV

<400> 41

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

<210> 42

<211> 115

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ID8F-EV

<400> 42

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

<210> 43

<211> 115

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ID9F-EV

<400> 43

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

<210> 44

<211> 115

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ID13F-EV

<400> 44

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

Ala	Arg	Asn	Gln	His	Gly	Leu	Asn	Lys	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr
			100					105					110		
Val	Ser	Ser													
			115												

<210> 45

<211> 115

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ID14F-EV

<400> 45

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

<210> 46

<211> 115

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ID15F-EV

<400> 46

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

<210> 47

<211> 260

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ID22F

<400> 47

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly		
1			5					10						15			
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asp	Phe	Ser	Ser	His		
		20						25					30				
Trp	Met	Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Leu	Glu	Trp	Leu		
		35					40					45					
Ser	Glu	Ile	Asn	Thr	Asn	Gly	Leu	Ile	Thr	Lys	Tyr	Gly	Asp	Ser	Val		
	50					55					60						
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Val	Ser	Arg	Asn	Asn	Ala	Ala	Asn	Lys	Met	Tyr		
65					70					75					80		
Leu	Glu	Leu	Thr	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90					95			
Ala	Arg	Asn	Gln	Lys	Gly	Leu	Asn	Lys	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr		
			100					105						110			
Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly		
		115					120						125				
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly		
	130					135					140						
Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly		
145					150					155					160		
Gly	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asp	Phe	Ser	Ser		
			165						170					175			
His	Trp	Met	Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Leu	Glu	Trp		
			180					185					190				
Leu	Ser	Glu	Ile	Asn	Thr	Asn	Gly	Leu	Ile	Thr	Lys	Tyr	Gly	Asp	Ser		
		195					200					205					
Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Val	Ser	Arg	Asn	Asn	Ala	Ala	Asn	Lys	Met		
	210					215					220						
Tyr	Leu	Glu	Leu	Thr	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr		
225					230					235					240		
Cys	Ala	Arg	Asn	Gln	Lys	Gly	Leu	Asn	Lys	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val		
			245						250					255			
Thr	Val	Ser	Ser														
			260														

<210> 48

<211> 260

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ID23F

<400> 48

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly		
1			5					10						15			
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asp	Phe	Ser	Ser	His		
		20						25					30				
Trp	Met	Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Leu	Glu	Trp	Leu		
		35					40					45					
Ser	Glu	Ile	Asn	Thr	Asn	Gly	Leu	Ile	Thr	His	Tyr	Gly	Asp	Ser	Val		
	50					55					60						
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Val	Ser	Arg	Asn	Asn	Ala	Ala	Asn	Lys	Met	Tyr		
65					70					75					80		
Leu	Glu	Leu	Thr	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90					95			
Ala	Arg	Asn	Gln	Lys	Gly	Leu	Asn	Lys	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr		
			100					105						110			
Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly		
		115					120						125				
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly		
	130					135						140					

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

<210> 49

<211> 260

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ID24F

<400> 49

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asp	Phe	Ser	Ser	His
			20					25					30		
Trp	Met	Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Leu	Glu	Trp	Leu
		35					40					45			
Ser	Glu	Ile	Asn	Thr	Asn	Gly	Leu	Ile	Thr	His	Tyr	Gly	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Val	Ser	Arg	Asn	Asn	Ala	Ala	Asn	Ser	Met	Tyr
65					70					75					80
Leu	Glu	Leu	Thr	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Arg	Asn	Gln	Lys	Gly	Leu	Asn	Lys	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr
			100					105					110		
Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
		115					120					125			
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
	130					135					140				
Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly
145					150					155					160
Gly	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asp	Phe	Ser	Ser
			165						170					175	
His	Trp	Met	Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Leu	Glu	Trp
			180					185					190		
Leu	Ser	Glu	Ile	Asn	Thr	Asn	Gly	Leu	Ile	Thr	His	Tyr	Gly	Asp	Ser
		195					200					205			
Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Val	Ser	Arg	Asn	Asn	Ala	Ala	Asn	Ser	Met
	210					215					220				
Tyr	Leu	Glu	Leu	Thr	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr
225					230					235					240
Cys	Ala	Arg	Asn	Gln	Lys	Gly	Leu	Asn	Lys	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val
				245					250					255	
Thr	Val	Ser	Ser												
			260												

<210> 50

<211> 260

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ID25F

<400> 50

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly		
1				5					10					15			
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asp	Phe	Ser	Ser	His		
			20					25					30				
Trp	Met	Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Leu	Glu	Trp	Leu		
		35					40					45					
Ser	Glu	Ile	Asn	Thr	Asn	Gly	Leu	Ile	Thr	His	Tyr	Gly	Asp	Ser	Val		
	50					55					60						
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Val	Ser	Arg	Asn	Asn	Ala	Ala	Asn	Lys	Met	Tyr		
65					70					75					80		
Leu	Glu	Leu	Thr	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90					95			
Ala	Arg	Asn	Gln	His	Gly	Leu	Asn	Lys	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val	Thr		
			100					105					110				
Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly		
		115					120					125					
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly		
	130					135					140						
Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly		
145					150					155					160		
Gly	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asp	Phe	Ser	Ser		
				165					170					175			
His	Trp	Met	Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu	Leu	Glu	Trp		
			180					185					190				
Leu	Ser	Glu	Ile	Asn	Thr	Asn	Gly	Leu	Ile	Thr	His	Tyr	Gly	Asp	Ser		
		195				200						205					
Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Val	Ser	Arg	Asn	Asn	Ala	Ala	Asn	Lys	Met		
	210					215					220						
Tyr	Leu	Glu	Leu	Thr	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr		
225					230					235					240		
Cys	Ala	Arg	Asn	Gln	His	Gly	Leu	Asn	Lys	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val		
				245					250					255			
Thr	Val	Ser	Ser														
			260														

<210> 51

<211> 260

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ID26F

<400> 51

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

<210> 53
<211> 260
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ID28F

<400> 53
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His
20 25 30
Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Gly Asp Ser Val
50 55 60
His Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr
65 70 75 80
Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
130 135 140
Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
145 150 155 160
Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser
165 170 175
His Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp
180 185 190
Leu Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Gly Asp Ser
195 200 205
Val His Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met
210 215 220
Tyr Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr
225 230 235 240
Cys Ala Arg Asn Gln Lys Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val
245 250 255
Thr Val Ser Ser
260

<210> 54
<211> 260
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ID29F

<400> 54
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser His
20 25 30
Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Gly Asp Ser Val
50 55 60
His Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr
65 70 75 80

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

<210> 55

<211> 115

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Q62E10-DVQLV

<400> 55

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

<210> 56

<211> 115

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ID34F

<400> 56

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	
Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asp	Phe	Ser	Ser	His
			20					25					30		

Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Ser Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Gly Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asn Asn Ala Ala Asn Lys Met Tyr
 65 70 75 80
 Leu Glu Leu Thr Arg Leu Glu Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Gln His Gly Leu Asn Lys Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
 100 105 110
 Val Ser Ser
 115

<210> 57

<211> 115

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> ID37F

<400> 57

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

<210> 58

<211> 28

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 3'-праймер с сайтом Spe

<400> 58

tcttaactag tgaggagacg gtgacctg

28

<210> 59

<211> 5

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Q65F1 CDR1

<400> 59

Val His Trp Met Tyr
1 5

<210> 60

<211> 5
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Q65D1 CDR1

<400> 60
Asn His Trp Met Cys
1 5

<210> 61
<211> 17
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ID27F CDR2

<400> 61
Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Gly Asp Ser Val His
1 5 10 15
Gly

<210> 62
<211> 17
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> ID28F CDR2

<400> 62
Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Gly Asp Ser Val His
1 5 10 15
Gly

<210> 63
<211> 17
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Q65F2 CDR2

<400> 63
Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Ser Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 64
<211> 17
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Q65F3 CDR2

<400> 64
Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Ile Asp Ser Val Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 65

<211> 17

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Q62F2 CDR2

<400> 65

Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Asn Tyr Val Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 66

<211> 17

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Q65F1 CDR2

<400> 66

Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Ile Asp Ser Val Gly
1 5 10 15

Gly

<210> 67

<211> 17

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Q65D1 CDR2

<400> 67

Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Phe Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 68

<211> 17

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Q65D3 CDR2

<400> 68

Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Thr Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 69

<211> 17

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Q65B1 CDR2

<400> 69
Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Lys Tyr Gly Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 70
<211> 6
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Q65F2 CDR3

<400> 70
Asn Gln Lys Gly Leu Asn
1 5

<210> 71
<211> 6
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Q65F1 CDR3

<400> 71
Asn Gln Met Gly Leu Asn
1 5

<210> 72
<211> 6
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Q65D3 CDR3

<400> 72
Asn Glu Arg Gly Leu Asn
1 5

<210> 73
<211> 17
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Q65F6 CDR2

<400> 73
Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Leu Tyr Ser Asp Ser Val Arg
1 5 10 15
Gly

<210> 74
<211> 17
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Q65F11 CDR2

<400> 74

Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 75

<211> 17

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Q65C12 CDR2

<400> 75

Glu Ile Asn Thr Asn Ala Leu Ile Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 76

<211> 17

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Q65A6 CDR2

<400> 76

Glu Ile Asn Thr Asn Gly Leu Ile Thr His Tyr Thr Asp Ser Val Ser
1 5 10 15
Gly

<210> 77

<211> 17

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Q65A3 CDR2

<400> 77

Glu Ile Asn Thr Asn Ala Leu Ile Thr Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 78

<211> 6

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Q65F6 CDR3

<400> 78

Ser Arg Asn Gly Ala Ala
1 5

<210> 79

<211> 6
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Q65F11 CDR3

<400> 79
Ala Arg Asn Gly Ala Ala
1 5

<210> 80
<211> 6
<212> Белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Q62F10 CDR3

<400> 80
Thr Gln Asn Gly Lys Thr
1 5

<210> 81
<211> 17
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> M13.rev

<400> 81
caggaaacag ctagac 17

<210> 82
<211> 16
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> M13.fw

<400> 82
gtaaaacgac ggccag 16

<210> 83
<211> 345
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Полинуклеотидная кодирующая последовательность ID38F, оптимизированная по кодонам для экспрессии в дрожжах

<400> 83
gatgttcaat tgggtgaatc tgggtggtggt ttggttcaac cagggtggttc tttgaaattg 60
tcttgtgctg cttctgggtt cgatttctct tctcattgga tgtactgggt tagacaagct 120
ccagggtaaag aattggaatg gttgtctgaa atcaacacca acggtttgat taccattat 180
ggtgattctg tcaagggtag attcactgtc tctagaaaca atgctgctaa caagatgtac 240

ttggaattga ccagattgga accagaagat actgccttgt attactgcgc tagaaatcaa	300
catggtttga acaaagggtca aggtactcaa gttaccgttt cctca	345

<210> 84
 <211> 345
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полинуклеотидная кодирующая последовательность Q62E10, оптимизированная по кодонам для экспрессии в дрожжах

<400> 84	
caagtccaat tgcaagaatc tgggtggtggt ttggttcaac caggtgggttc tttgagattg	60
tcttgtacta cttctggttt ggatttcggt atccattgga tgtactgggt tagacaagct	120
ccaggtaaag aattggaatg ggttgctgaa atcaacacca atgctttgat taccaagtac	180
gccgattctg ttaagggtag attcaccatt tctagagata acgctaagaa caccttggtc	240
ttgcaaatga acgacttgaa gtctgaagat accgctgttt actactgttc taacactcaa	300
aatggtgctg ctaaagggtca aggtgtacaa gttactgttt cctcc	345

<210> 85
 <211> 345
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полинуклеотидная кодирующая последовательность ID38F, оптимизированная по кодонам для экспрессии в E.coli

<400> 85	
gatgttcagc tggttgaaag cgggtggtggt ctggttcagc ctggtggtag cctgaaactg	60
agctgtgcag caagcggttt tgatttttagc agccattgga tgtattgggt tcgtcaggca	120
ccgggtaaag aactggaatg gctgagcgaa attaacacca atggtctgat taccattat	180
ggcgatagcg ttaaagggtcg ttttaccgtt agccgtaata atgcagccaa caaatgtat	240
ctggaactga cccgtctgga accggaagat accgcaactgt attattgtgc acgtaatcag	300
catggtctga ataaagggtca gggcacccag gttaccgtga gcagc	345

<210> 86
 <211> 345
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Полинуклеотидная кодирующая последовательность Q62E10, оптимизированная по кодонам для экспрессии в E.coli

<400> 86	
caggttcagc tgcaagaaag cgggtggtggt ctggttcagc ctggtggtag cctgcgtctg	60

agctgtacca ccagtgggtct ggatttttggg attcattgga tgtattgggtt tcgtcaggca	120
ccgggtaaag aactggaatg ggttgcagaa attaacacca atgcactgat taccaaatat	180
gccgatagcg tgaaagggtcg ttttaccatt agccgtgata atgccaaaaa taccctgttt	240
ctgcagatga acgatctgaa aagcgaagat accgcagtgt attattgtag caatacccag	300
aatgggtgcag caaaagggtca ggggtgttcag gttaccgtta gcagc	345

<210> 87

<211> 501

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полинуклеотид, состоящий из открытой рамки считывания ID38F для экспрессии в *E. coli*
(от лидерной последовательности PelB до с-мус-6His-тега и 2х стоп-кодона)

<400> 87

atgaaatatc tgctgccgac cgcagcagcg ggtctgctgc tgctggcagc acagcctgca	60
atggcagatg ttcagctggg tgaaagcggg ggtgggtctgg ttcagcctgg tggtagcctg	120
aaactgagct gtgcagcaag cggttttgat tttagcagcc attggatgta ttgggttcgt	180
caggcaccgg gtaaagaact ggaatggctg agcgaaatta acaccaatgg tctgattacc	240
cattatggcg atagcgtaa aggtcgtttt accgttagcc gtaataatgc agccaacaaa	300
atgtatctgg aactgacccg tctggaaccg gaagataccg cactgtatta ttgtgcacgt	360
aatcagcatg gtctgaataa aggtcagggc acccagggtta ccgtgagcag cgcagcagcc	420
agcggtagcc tggaacagaa actgattagc gaagaggatc tgaatgggtgc agcacatcat	480
catcaccatc atgggtgccgc a	501

<210> 88

<211> 486

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Полинуклеотид, состоящий из открытой рамки считывания ID38F для экспрессии в *E. coli*
(от лидерной последовательности PelB до Flag-6His-тега и 2х стоп-кодона)

<400> 88

atgaaatacc tattgcctac ggcagccgct ggattgttat tactcgcggc ccagccgggc	60
atggccgatg ttcagctggg tgaaagcggg ggtgggtctgg ttcagcctgg tggtagcctg	120
aaactgagct gtgcagcaag cggttttgat tttagcagcc attggatgta ttgggttcgt	180
caggcaccgg gtaaagaact ggaatggctg agcgaaatta acaccaatgg tctgattacc	240
cattatggcg atagcgtaa aggtcgtttt accgttagcc gtaataatgc agccaacaaa	300
atgtatctgg aactgacccg tctggaaccg gaagataccg cactgtatta ttgtgcacgt	360

aatcagcatg gtctgaataa aggtcagggc acccaggtca cegtctctc agcggcgcga	420
gactacaaag acgacgacga caaaggggct gcacatcacc atcatcacca cggggctgca	480
taataa	486

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, содержащий переменный домен цепи иммуноглобулина, который связывается с TNF-альфа, где переменный домен цепи иммуноглобулина состоит из трех определяющих комплементарность областей (CDR1-CDR3) и четырех каркасных областей (FR1-FR4), где CDR1 содержит последовательность, имеющую 60% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 1, CDR2 содержит последовательность, имеющую 50% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 2, и

(a) CDR3 содержит последовательность, имеющую 80% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 3

или

(b) CDR3 содержит последовательность, имеющую 50% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 3, и где остаток CDR3, соответствующий остатку номер 3 из SEQ ID NO: 3, представляет собой R, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y или V.

2. Полипептид по п.1, где CDR3 содержит последовательность, имеющую 80% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 3.

3. Полипептид по п.2, где CDR3, состоит из последовательности, имеющей 80% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 3.

4. Полипептид по любому из п.2 или 3, где любые остатки CDR3, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 3, представляют собой консервативные замены относительно соответствующих им остатков.

5. Полипептид по любому из п.2 или 3, где остаток CDR3, соответствующий остатку номер 3 из SEQ ID NO: 3, представляет собой R, H, D, E, N, Q, S, T, Y, G, A, V, L, W, P, M, C, F или I, например, представляет собой R, H, D, E, N, Q, S, T, Y, G, V, L, W, P, M, C, F или I.

6. Полипептид по п.5, где остаток CDR3, соответствующий остатку номер 3 из SEQ ID NO: 3, представляет собой H.

7. Полипептид по п.6, где остаток CDR3, соответствующий остатку номер 3 из SEQ ID NO: 3, представляет собой Н, и любые другие остатки CDR3, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 3, представляют собой консервативные замены относительно соответствующих им остатков.

8. Полипептид по п.2, где CDR3 содержит SEQ ID NO: 3.

9. Полипептид по п.3, где CDR3 состоит из SEQ ID NO: 3.

10. Полипептид по п.1, где CDR3 содержит последовательность, имеющую 50% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 3, и где остаток CDR3, соответствующий остатку номер 3 из SEQ ID NO: 3, представляет собой R, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y или V, например, представляет собой R, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y или V.

11. Полипептид по п.10, где CDR3 содержит последовательность, имеющую 60% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 80% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 3, и где остаток CDR3, соответствующий остатку номер 3 из SEQ ID NO: 3 представляет собой R, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y или V, например, представляет собой R, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y или V.

12. Полипептид по п.11, где CDR3 состоит из последовательности, имеющей 60% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 80% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 3, и где остаток номер 3 из SEQ ID NO: 3 представляет собой R, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, K, M, F, P, S, T, W, Y или V, например, представляет собой R, D, N, C, E, Q, G, H, I, L, M, F, P, S, T, W, Y или V.

13. Полипептид по любому одному из пп.10-12, где остаток номер 3 из SEQ ID NO: 3 представляет собой Н или консервативную замену Н.

14. Полипептид по п.13, где остаток номер 3 из SEQ ID NO: 3 представляет собой Н.

15. Полипептид по любому одному из пп.10-12, где остаток номер 3 из SEQ ID NO: 3 представляет собой Н или консервативную

замену Н, и любые другие остатки CDR3, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 3, представляют собой консервативные замены.

16. Полипептид по п.15, где остаток номер 3 из SEQ ID NO: 3 представляет собой Н, и любые другие остатки CDR3, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 3, представляют собой консервативные замены.

17. Полипептид по п.12, где последовательность CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71 или SEQ ID NO: 72.

18. Полипептид по любому одному из пп.1-17, где CDR1 содержит последовательность, имеющую 80% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 1.

19. Полипептид по п.18, где CDR1 состоит из последовательности, имеющей 80% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 1.

20. Полипептид по любому одному из пп.1-19, где любые остатки CDR1, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 1, представляют собой консервативные замены относительно соответствующих им остатков.

21. Полипептид по п.18, где CDR1 содержит SEQ ID NO: 1.

22. Полипептид по п.19, где CDR1 состоит из SEQ ID NO: 1.

23. Полипептид по пп.1-17, где последовательность CDR1 представляет собой SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 60.

24. Полипептид по любому одному из пп.1-23, где CDR2 содержит последовательность, имеющую 55% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 60% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 70% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 75% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 80% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 85% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 90% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 2.

25. Полипептид по п.24, где CDR2 состоит из последовательности, имеющей 55% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 60% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 70% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 75% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 80% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 85% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 90% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 2.

26. Полипептид по любому одному из пп.1-25, где остаток CDR2, соответствующий остатку номер 10 из SEQ ID NO: 2, представляет собой R, H, D, E, N, Q, S, T, Y, G, A, V, L, W, P, M, C, F или I.

27. Полипептид по п.26, где остаток CDR2, соответствующий остатку номер 10 из SEQ ID NO: 2, представляет собой H.

28. Полипептид по любому одному из пп.1-25, где любые остатки CDR2, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 2, представляют собой консервативные замены относительно соответствующих им остатков.

29. Полипептид по п.24, где CDR2 содержит SEQ ID NO: 2.

30. Полипептид по п.25, где CDR2 состоит из SEQ ID NO: 2.

31. Полипептид по любому одному из пп.1-23, где последовательность CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69.

32. Полипептид по любому одному из пп.1-31, где FR1 включает последовательность, имеющую 5% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 12% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 18% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 26% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 32% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 38% или больший процент идентичности по

последовательности, например, имеющей 75% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 78% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 82% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 85% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 90% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 95% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 4.

34. Полипептид по любому одному из пп.1-33, где остаток FR1, соответствующей остатку номер 1 из SEQ ID NO: 4, представляет собой G, A, V, L, I, F, P, S, T, Y, C, M, K, R, H, W, D, E или N.

35. Полипептид по п.34, где остаток FR1, соответствующий остатку номер 1 из SEQ ID NO: 4, представляет собой D или E.

36. Полипептид по п.35, где остаток FR1, соответствующий остатку номер 1 из SEQ ID NO: 4, представляет собой D.

37. Полипептид по любому одному из пп.1-36, где остаток FR1, соответствующей остатку номер 5 из SEQ ID NO: 4, представляет собой G, A, V, L, I, F, P, S, T, Y, C, M, K, R, H, W, D, E или N.

38. Полипептид по п.37, где остаток FR1, соответствующий остатку номер 5 из SEQ ID NO: 4, представляет собой V.

39. Полипептид по любому из п.37 или 38, где остатки FR1, соответствующие остаткам с номерами 1-5 из SEQ ID NO: 4, представляют собой DVQLV.

40. Полипептид по любому одному из пп.1-39, где остаток FR1, соответствующий остатку номер 20 из SEQ ID NO: 4, представляет собой аминокислоту, которая является гидрофобной.

41. Полипептид по п.40, где остаток FR1, соответствующий остатку номер 20 из SEQ ID NO: 4, представляет собой L.

42. Полипептид по любому одному из пп.1-41, где остаток FR1, соответствующий остатку номер 24 из SEQ ID NO: 4, представляет собой аминокислоту, которая является гидрофобной.

43. Полипептид по п.42, где остаток FR1, соответствующий остатку номер 24 из SEQ ID NO: 4, представляет собой A.

44. Полипептид по любому одному из пп.1-43, где остаток FR1, соответствующий остатку номер 29 из SEQ ID NO: 4, представляет собой F.

45. Полипептид по любому одному из пп.1-33, где любые остатки FR1, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 4, представляют собой консервативные замены относительно соответствующих им остатков.

46. Полипептид по п.32, где FR1 содержит SEQ ID NO: 4.

47. Полипептид по п.33, где FR1 состоит из SEQ ID NO: 4.

48. Полипептид по любому одному из пп.1-47, где FR2 содержит последовательность, имеющую 10% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 15% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 25% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 30% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 40% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 45% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 55% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 60% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 70% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 75% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 85% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 90% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 5.

49. Полипептид по п.48, где FR2 состоит из последовательности, имеющей 10% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 15% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 25% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 30% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 40% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 45% или больший процент идентичности по последовательности, например,

имеющей 55% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 60% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 70% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 75% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 85% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 90% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 5.

50. Полипептид по любому одному из пп.1-49, где остатки FR2, соответствующие остаткам с номерами 8-11 из SEQ ID NO: 5, представляют собой KEXE, где X представляет собой R или L.

51. Полипептид по п.50, где X представляет собой L.

52. Полипептид по п.50, где X представляет собой R.

53. Полипептид по любому одному из пп.1-49, где остатки FR2, соответствующие остаткам с номерами 9-12 из SEQ ID NO: 5, представляют собой GLEW.

54. Полипептид по любому одному из пп.1-49, где любые остатки FR2, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 5, представляют собой консервативные замены относительно соответствующих им остатков.

55. Полипептид по п.48, где FR2 содержит SEQ ID NO: 5.

56. Полипептид по п.49, где FR2 состоит из SEQ ID NO: 5.

57. Полипептид по любому одному из пп.1-56, где FR3 содержит последовательность, имеющую 8% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 15% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 20% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 26% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 32% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 40% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 45% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 52% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 58% или больший процент идентичности по

последовательности, например, имеющей 95% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 6.

59. Полипептид по любому одному из пп.1-58, где остаток FR3, соответствующий остатку номер 26 из SEQ ID NO: 6, представляет собой аминокислоту, которая является гидрофобной.

60. Полипептид по п.59, где остаток FR3, соответствующий остатку номер 26 из SEQ ID NO: 6, представляет собой А.

61. Полипептид по любому одному из пп.1-60, где любые остатки FR3, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 6, представляют собой консервативные замены относительно соответствующих им остатков.

62. Полипептид по п.57, где FR3 содержит SEQ ID NO: 6.

63. Полипептид по п.58, где FR3 состоит из SEQ ID NO: 6.

64. Полипептид по любому одному из пп.1-63, где FR4 содержит последовательность, имеющую 5% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 10% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 20% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 30% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 40% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 50% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 60% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 70% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 80% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 90% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 7.

65. Полипептид по п.64, где FR4 состоит из последовательности, имеющей 5% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 10% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 20% или большой идентичности последовательности, например, имеющей 30% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 40% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 50% или больший процент

идентичности по последовательности, например, имеющей 60% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 70% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 80% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 90% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 7.

66. Полипептид по любому одному из пп.1-65, где любые остатки FR4, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 7, представляют собой консервативные замены относительно соответствующих им остатков.

67. Полипептид по п.64, где FR4 содержит SEQ ID NO: 7.

68. Полипептид по п.65, где FR4 состоит из SEQ ID NO: 7.

69. Полипептид по любому одному из пп.1-68, который содержит последовательность, имеющую 50% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 55% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 60% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 65% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 70% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 75% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 80% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 85% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 90% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 95% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 96% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 97% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 98% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 99% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 8.

70. Полипептид по п.69, который состоит из последовательности, имеющей 50% или больший процент идентичности

по последовательности, например, имеющей 55% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 60% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 65% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 70% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 75% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 80% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 85% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 90% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 95% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 96% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 97% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 98% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 99% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 8.

71. Полипептид по любому одному из пп.1-70, где N-конец полипептида представляет собой D.

72. Полипептид по п.69, который содержит SEQ ID NO: 8.

73. Полипептид по п.70, который состоит из SEQ ID NO: 8.

74. Полипептид, содержащий переменный домен цепи иммуноглобулина, который связывается с TNF-альфа, где переменный домен цепи иммуноглобулина содержит три определяющие комплементарности области (CDR1-CDR3) и четыре каркасные области (FR1-FR4), где CDR1 содержит последовательность, имеющую 60% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 15, CDR2 содержит последовательность, имеющую 50% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 16, и CDR3 содержит последовательность, имеющую 50% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 17.

75. Полипептид по п.74, где CDR3 содержит последовательность, имеющую 60% или больший процент идентичности по последовательности, например, 80% или больший процент

идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 17.

76. Полипептид по п.75, где CDR3 состоит из последовательности, имеющей 60% или больший процент идентичности по последовательности, например, 80% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 17.

77. Полипептид по любому одному из пп.74-76, где любые остатки CDR3, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 17, представляют собой консервативные замены относительно соответствующих им остатков.

78. Полипептид по п.74, где последовательность CDR3 представляет собой SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 80.

79. Полипептид по п.75, где CDR3 содержит SEQ ID NO: 17.

80. Полипептид по п.76, где CDR3 состоит из SEQ ID NO: 17.

81. Полипептид по любому одному из пп.74-80, где CDR1 содержит последовательность, имеющую 80% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 15.

82. Полипептид по любому одному из пп.74-80, где CDR1 состоит из последовательности, имеющей 80% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 15.

83. Полипептид по любому одному из пп.74-82, где любые остатки CDR1, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 15, представляют собой консервативные замены относительно соответствующих им остатков.

84. Полипептид по п.81, где CDR1 содержит SEQ ID NO: 15.

85. Полипептид по п.82, где CDR1 состоит из SEQ ID NO: 15.

86. Полипептид по любому одному из пп.74-85, где CDR2 содержит последовательность, имеющую 55% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 60% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 70% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 75% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 80% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 85% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 90% или больший процент

идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 16.

87. Полипептид по п.86, где CDR2 состоит из последовательности, имеющей 60% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 70% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 75% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 80% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 85% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 90% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 16.

88. Полипептид по любому одному из пп.74-87, где остаток CDR2, соответствующий остатку номер 10 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R, H, D, E, N, Q, S, T, Y, G, A, V, L, W, P, M, C, F или I.

89. Полипептид по п.88, где остаток CDR2, соответствующий остатку номер 10 из SEQ ID NO: 16, представляет собой H.

90. Полипептид по любому одному из пп.74-89, где остаток CDR2, соответствующий остатку номер 16 из SEQ ID NO: 16, представляет собой R, H, D, E, N, Q, S, T, Y, G, A, V, L, W, P, M, C, F или I.

91. Полипептид по п.90, где остаток CDR2, соответствующий остатку номер 16 из SEQ ID NO: 16, представляет собой H.

92. Полипептид по любому одному из пп.74-87, где любые остатки CDR2, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 16, представляют собой консервативные замены относительно соответствующих им остатков.

93. Полипептид по п.86, где CDR2 содержит SEQ ID NO: 16.

94. Полипептид по п.87, где CDR2 состоит из SEQ ID NO: 16.

95. Полипептид по п.74, где последовательность CDR2 представляет собой SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77 или SEQ ID NO: 16.

96. Полипептид по любому одному из пп.74-95, где FR1 включает последовательность, имеющую 5% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 12% или больший процент идентичности по последовательности, например,

[illegible]

97. Полипептид по п.96, где FR1 состоит из последовательности, имеющей 5% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 12% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 18% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 26% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 32% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 38% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 46% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 52% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 58% или больший процент идентичности по последовательности, например,

имеющей 62% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 66% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 68% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 72% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 75% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 78% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 82% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 85% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 90% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 95% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 18.

98. Полипептид по любому одному из пп.74-97, где остаток FR1, соответствующей остатку номер 1 из SEQ ID NO: 18, представляет собой G, A, V, L, I, F, P, S, T, Y, C, M, K, R, H, W, D, E или N.

99. Полипептид по п.98, где остаток FR1, соответствующий остатку номер 1 из SEQ ID NO: 18, представляет собой D или E.

100. Полипептид по п.99, где остаток FR1, соответствующий остатку номер 1 из SEQ ID NO: 18, представляет собой D.

101. Полипептид по любому одному из пп.74-100, где остаток FR1, соответствующей остатку номер 5 из SEQ ID NO: 18, представляет собой G, A, V, L, I, F, P, S, T, Y, C, M, K, R, H, W, D, E или N.

102. Полипептид по п.101, где остаток FR1, соответствующий остатку номер 5 из SEQ ID NO: 18, представляет собой V.

103. Полипептид по любому одному из пп.96-102, где остатки FR1, соответствующие остаткам с номерами 1-5 из SEQ ID NO: 18, представляют собой DVQLV.

104. Полипептид по любому одному из пп.74-101, где остаток FR1, соответствующий остатку номер 20 из SEQ ID NO: 18, представляет собой аминокислоту, которая является гидрофобной.

105. Полипептид по п.101, где остаток FR1, соответствующий остатку номер 20 из SEQ ID NO: 18, представляет собой L.

106. Полипептид по любому одному из пп.74-105, где остаток FR1, соответствующий остатку номер 29 из SEQ ID NO: 18, представляет собой F.

107. Полипептид по любому одному из пп.74-97, где любые остатки FR1, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 18, представляют собой консервативные замены относительно соответствующих им остатков.

108. Полипептид по п 96, где FR1 содержит SEQ ID NO: 18.

109. Полипептид по п.97, где FR1 состоит из SEQ ID NO: 18.

110. Полипептид по любому одному из пп.74-109, где FR2 содержит последовательность, имеющую 10% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 15% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 25% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 30% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 40% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 45% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 55% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 60% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 70% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 75% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 85% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 90% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 19.

111. Полипептид по п.110, где FR2 состоит из последовательности, имеющей 10% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 15% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 25% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 30% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 40% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 45% или больший процент идентичности по последовательности, например,

имеющей 55% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 60% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 70% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 75% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 85% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 90% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 19.

112. Полипептид по любому одному из пп.74-111, где остатки FR2, соответствующие остаткам с номерами 8-11 из SEQ ID NO: 19, представляют собой KELE.

113. Полипептид по любому одному из пп.74-111, где любые остатки FR2, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 19, представляют собой консервативные замены относительно соответствующих им остатков.

114. Полипептид по п.110, где FR2 содержит SEQ ID NO: 19.

115. Полипептид по п.111, где FR2 состоит из SEQ ID NO: 19.

116. Полипептид по любому одному из пп.74-115, где FR3 содержит последовательность, имеющую 8% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 15% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 20% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 26% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 32% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 40% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 45% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 52% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 58% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 65% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 70% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 76% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 80% или больший процент

идентичности по последовательности, например, имеющую 82% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 85% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 90% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 92% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 95% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 20.

117. Полипептид по п.116, где FR3 состоит из последовательности, имеющей 8% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 15% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 20% или большой идентичности последовательности, например, имеющей 26% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 32% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 40% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 45% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 52% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 58% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 65% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 70% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 76% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 80% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 82% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 85% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 90% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 92% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 95% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 20.

118. Полипептид по любому одному из пп.74-117, где остаток FR3, соответствующий остатку номер 26 из SEQ ID NO: 20, представляет собой аминокислоту, которая является гидрофобной.

119. Полипептид по п.118, где остаток FR3, соответствующий остатку номер 26 из SEQ ID NO: 20, представляет собой А.

120. Полипептид по любому одному из пп.74-117, где любые остатки FR3, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 20, представляют собой консервативные замены относительно соответствующих им остатков.

121. Полипептид по п.116, где FR3 содержит SEQ ID NO: 20.

122. Полипептид по п.117, где FR3 состоит из SEQ ID NO: 20.

123. Полипептид по любому одному из пп.74-122, где FR4 содержит последовательность, имеющую 5% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 10% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 20% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 30% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 40% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 50% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 60% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 70% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 80% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 90% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 21.

124. Полипептид по п.123, где FR4 состоит из последовательности, имеющей 5% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 10% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 20% или большой идентичности последовательности, например, имеющей 30% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 40% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 50% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 60% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 70% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 80% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 90% или

больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 21.

125. Полипептид по любому одному из пп.74-124, где остаток FR4, соответствующий остатку номер 1 из SEQ ID NO: 21, представляет собой R, H, D, E, N, Q, S, T, Y, G, A, V, L, W, P, M, C, F или I.

126. Полипептид по п.125, где остаток FR4, соответствующий остатку номер 1 из SEQ ID NO: 21, представляет собой H.

127. Полипептид по любому одному из пп.74-126, где любые остатки FR4, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 21, представляют собой консервативные замены относительно соответствующих им остатков.

128. Полипептид по п.123, где FR4 содержит SEQ ID NO: 21.

129. Полипептид по п.124, где FR4 состоит из SEQ ID NO: 21.

130. Полипептид по любому одному из пп.74-129, который содержит последовательность, имеющую 50% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 55% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 60% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 65% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 70% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 75% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 80% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 85% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 90% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 95% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 96% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 97% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 98% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющую 99% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 22.

131. Полипептид по п.130, который состоит из

последовательности, имеющей 50% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 55% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 60% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 65% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 70% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 75% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 80% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 85% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 90% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 95% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 96% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 97% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 98% или больший процент идентичности по последовательности, например, имеющей 99% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 22.

132. Полипептид по п.130, который содержит SEQ ID NO: 22.

133. Полипептид по п.131, который состоит из SEQ ID NO: 22.

134. Полипептид по любому одному из пп.74-133, где N-конец полипептида представляет собой D.

135. Полипептид по любому одному из пп.1-134, где полипептид представляет собой антитело.

136. Полипептид по любому одному из пп.1-135, где полипептид представляет собой фрагмент антитела.

137. Полипептид по п.136, который выбран из группы, состоящей из: VNH, VH, VL, V-NAR, Fab-фрагмента и F(ab')₂-фрагмента.

138. Полипептид по п.137, где полипептид представляет собой VNH.

139. Полипептид по п.137, где полипептид представляет собой VH.

140. Конструкция, содержащая два или несколько одинаковых полипептидов по любому одному из пп.1-139.

141. Конструкция, содержащая по меньшей мере один полипептид по любому одному из пп.1-139 и, по меньшей мере, один другой полипептид, причем другой полипептид связывается с TNF-альфа.

142. Конструкция, содержащая по меньшей мере один полипептид по любому одному из пп.1-139 и по меньшей мере один другой полипептид, причем другой полипептид связывается с другой мишенью, помимо TNF-альфа.

143. Конструкция по любому одному из пп.140-142, где полипептиды соединены по меньшей мере одним расщепляемым протеазой линкером.

144. Конструкция по п.143, где расщепляемый протеазой линкер имеет формат



где

J представляет собой лизин или аргинин;

x составляет от 1 до 10;

y составляет от 1 до 10;

z составляет от 1 до 10;

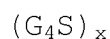
B составляет от 0 до 5 аминокислотных остатков, выбранных из R, H, N, Q, S, T, Y, G, A, V, L, W, P, M, C, F, K или I; и

B' составляет от 0 до 5 аминокислотных остатков, выбранных из R, H, N, Q, S, T, Y, G, A, V, L, W, M, C, F, K или I.

145. Конструкция по п.144, где J представляет собой лизин, B=0, x=1, y=1 и z=1.

146. Конструкция по любому одному из пп.140-142, где полипептиды все соединены устойчивыми к протеазам линкерами.

147. Конструкция по п.146, где устойчивые к протеазам линкеры имеют формат



где

x составляет от 1 до 10.

148. Конструкция по п.147, где x равен 6.

149. Полипептид или конструкция по любому одному из пп.1-148, которые нейтрализуют цитотоксичность TNF-альфа человека в

стандартном анализе на L929 с EC50 1 нМ или ниже, такой как 0,9 нМ или ниже, такой как 0,8 нМ или ниже, такой как 0,7 нМ или ниже, такой как 0,6 нМ или ниже, такой как 0,5 нМ или ниже, такой как 0,4 нМ или ниже, такой как 0,3 нМ или ниже, такой как 0,2 нМ или ниже, такой как 0,1 нМ или ниже, такой как 0,09 нМ или ниже, такой как 0,08 нМ или ниже, такой как 0,07 нМ или ниже, такой как 0,06 нМ или ниже, такой как 0,05 нМ или ниже, такой как 0,04 нМ или ниже.

150. Полипептид или конструкция по любому одному из пп.1-149, которые нейтрализуют цитотоксичность TNF-альфа яванского макака в стандартном анализе на L929 с EC50 1 нМ или ниже, такой как 0,9 нМ или ниже, такой как 0,8 нМ или ниже, такой как 0,7 нМ или ниже, такой как 0,6 нМ или ниже, такой как 0,5 нМ или ниже, такой как 0,4 нМ или ниже, такой как 0,3 нМ или ниже, такой как 0,2 нМ или ниже, такой как 0,1 нМ или ниже, такой как 0,09 нМ или ниже, такой как 0,08 нМ или ниже, такой как 0,07 нМ или ниже, такой как 0,06 нМ или ниже, такой как 0,05 нМ или ниже, такой как 0,04 нМ или ниже, такой как 0,03 нМ или ниже, такой как 0,02 нМ или ниже, такой как 0,01 нМ или ниже.

151. Полипептид или конструкция по любому одному из пп.1-150, которые являются по существу устойчивыми к одной или нескольким протеазам.

152. Полипептид или конструкция по п.151, где одна или несколько протеаз присутствуют в желудке или тонком или толстом кишечнике.

153. Полипептид или конструкция по п.152, где одна или несколько протеаз присутствуют в тонком кишечнике.

154. Полипептид или конструкция по п.151, где одну или несколько протеаз выбирают из группы, состоящей из энтеропептидазы, трипсина, химотрипсина и воспалительных протеаз воспалительного заболевания кишечника.

155. Полипептид или конструкция по п.154, где одну или несколько протеаз выбирают из группы, состоящей из трипсина, химотрипсина и воспалительных протеаз воспалительного заболевания кишечника.

156. Полипептид или конструкция по любому п.154 или 155,

где воспалительные протеазы воспалительного заболевания кишечника представляют собой одну или несколько протеаз, выбранных из группы, состоящей из MMP3, MMP12 и катепсина.

157. Полипептид или конструкция по п.155, где протеазы представляют собой трипсин и химотрипсин.

158. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептид или конструкцию по любому одному из пп.1-157 и один или несколько фармацевтически приемлемых разбавителей или носителей.

159. Фармацевтическая композиция по п.158, где композиция представлена в покрытой энтеросолюбильной оболочкой форме.

160. Фармацевтическая композиция по любому п.158 или 159, содержащая по меньшей мере один действующий агент.

161. Фармацевтическая композиция по п.160, где по меньшей мере один дополнительный действующий агент выбран из списка, состоящего из: 5-аминосалициловой кислоты или ее пролекарственных форм (например, сульфасалазина, олсалазина или бисалазина); кортикостероидов (например, преднизолона, метилпреднизолона или будесонида); иммунодепрессантов (например, циклоспорина, такролимуса, метотрексата, азатиоприна или 6-меркаптопурина); анти-TNF-альфа антител (например, инфликсимаба, адалимумаба, цертолизумаба пегола или голимумаба); анти-IL-12/IL23 антител (например, устекинумаба); анти-IL6R антител или низкомолекулярных ингибиторов IL-12/IL23 (например, апилимода); анти-альфа-4-бета-7 антител (например, ведолизумаба); MAdCAM-1-блокаторов (например, PF-00547659); антител против молекулы клеточной адгезии альфа-4-интегрин (например, натализумаба); антител против альфа-субъединицы рецептора IL-2 (например, даклизумаба или базиликсимаба); ингибиторов JAK3 (например, тофацитиниба или R348); ингибиторов Syk и их пролекарственных форм (например, фостаматиниба и P-406); ингибиторов фосфодиэстеразы-4 (например, тетомиласта); HMPL-004; пробиотиков; дерсалазина; семапимода/CPSI-2364; и ингибиторов протеинкиназы C (например, AEB-071).

162. Фармацевтическая композиция по п.161, где по меньшей мере один дополнительный действующий агент представляет собой 5-аминосалициловую кислоту.

163. Полипептид, фармацевтическая композиция или конструкция по любому одному из пп.1-162 для использования в качестве лекарственного средства.

164. Полипептид, фармацевтическая композиция или конструкция по п.163 для использования в лечении аутоиммунных и/или воспалительных заболеваний.

165. Полипептид, фармацевтическая композиция или конструкция по п.164, где аутоиммунное и/или воспалительное заболевание выбирают из списка, состоящего из болезни Крона, язвенного колита, воспалительной болезни кишечника, диабета II типа, гломерулонефрита, аутоиммунного гепатита, синдрома Шегрена, целиакии или лекарственно или радиационно-индуцированного мукозита, пузырчатки, псориаза, экземы и склеродермии.

166. Полипептид, фармацевтическая композиция или конструкция для использования по п.165, где аутоиммунное и/или воспалительное заболевание представляет собой болезнь Крона.

167. Полипептид, фармацевтическая композиция или конструкция для использования по любому одному из пп.163-166, которые вводят перорально.

168. Полипептид, фармацевтическая композиция или конструкция для использования по любому одному из пп.163-166, которые наносят местно на кожу.

169. Применение полипептида, фармацевтической композиции или конструкции по любому одному из пп.1-162 в производстве лекарственного средства для лечения аутоиммунных и/или воспалительных заболеваний.

170. Применение полипептида, фармацевтической композиции или конструкции по п.169, где аутоиммунное и/или воспалительное заболевание выбирают из списка, состоящего из болезни Крона, язвенного колита, воспалительной болезни кишечника, диабета II типа, гломерулонефрита, аутоиммунного гепатита, синдрома Шегрена, целиакии или лекарственно или радиационно-индуцированного мукозита, пузырчатки, псориаза, экземы и склеродермии.

171. Применение по п.170, где аутоиммунное и/или

воспалительное заболевание представляет собой болезнь Крона.

172. Применение по любому одному из пп.169-171, где лекарственное средство вводят перорально.

173. Применение по любому одному из пп.169-171, где лекарственное средство вводят местно на кожу.

174. Способ лечения аутоиммунных и/или воспалительных заболеваний, включающий введение человеку, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества полипептида, фармацевтической композиции или конструкции по любому одному из пп.1-162.

175. Способ лечения аутоиммунных и/или воспалительных заболеваний по п.174, где аутоиммунное и/или воспалительное заболевания выбирают из списка, состоящего из болезни Крона, язвенного колита, синдрома воспаленного кишечника, диабета II типа, гломерулонефрита, аутоиммунного гепатита, синдрома Шегрена, целиакии или лекарственно или радиационно-индуцированного мукозита, пузырчатки, псориаза, экземы и склеродермии.

176. Способ лечения аутоиммунного заболевания по п.175, где аутоиммунное заболевание представляет собой болезнь Крона.

177. Способ лечения аутоиммунного заболевания по любому одному из пп.174-176, где полипептид, фармацевтическую композицию или конструкцию вводят перорально.

178. Способ лечения аутоиммунного заболевания по любому из пп.174-176, где полипептид, фармацевтическую композицию или конструкцию наносят местно на кожу.

179. Полипептид, фармацевтическая композиция, конструкция, применение или способ по любому одному из пп.163-178, где полипептид, фармацевтическую композицию или конструкцию вводят последовательно, одновременно или по отдельности по меньшей мере с одним действующим агентом, выбранным из списка, состоящего из: 5-аминосалициловой кислоты или ее пролекарственных форм (например, сульфасалазина, олсалазина или бисалазина); кортикостероидов (например, преднизолона, метилпреднизолона или будесонида); иммунодепрессантов (например, циклоспорина, такролимуса, метотрексата, азатиоприна или 6-меркаптопурина);

анти-TNF-альфа антител (например, инфликсимаба, адалимумаба, цертолизумаба пегола или голимумаба); анти-IL-12/IL23 антител (например, устекинумаба); анти-IL6R антител или низкомолекулярных ингибиторов IL-12/IL23 (например, апилимода); анти-альфа-4-бета-7 антител (например, ведолизумаба); MAdCAM-1-блокаторов (например, PF-00547659); антител против молекулы клеточной адгезии альфа-4-интегрина (например, натализумаба); антител против альфа-субъединицы рецептора IL-2 (например, даклизумаба или базиликсимаба); ингибиторов JAK3 (например, тофацитиниба или R348); ингибиторов Syk и их пролекарственных форм (например, фостаматиниба и P-406); ингибиторов фосфодиэстеразы-4 (например, тетомиласта); HMPL-004; пробиотиков; дерсалазина; семапимода/CPSI-2364; и ингибиторов протеинкиназы C (например, AEB-071).

180. Полипептид, фармацевтическая композиция, конструкция или способ по п.179, в котором полипептид, фармацевтическую композицию или конструкцию вводят последовательно, одновременно или по отдельности с инфликсимабом, адалимумабом, цертолизумабом пеголом или голимумабом.

181. Полинуклеотид, содержащий или состоящий из последовательности, имеющей 70% или больший %, например, 80% или больший %, например, как 90% или больший %, например, 95% или больший %, например, 99% или больший % идентичности по последовательности с любым одним участком любой одной из SEQ ID NO: 83-86, которые кодируют CDR1, CDR2 или CDR3 кодируемого переменного домена цепи иммуноглобулина.

182. Полинуклеотид, кодирующий полипептид или конструкцию по любому одному из пп.1-157.

183. Полинуклеотид по п.182, где полинуклеотид содержит или состоит из последовательности, имеющей 70% или больший %, например, 80% или больший %, например, 90% или больший %, например, 95% или больший %, например, 99% или больший % идентичности по последовательности с любой одной из SEQ ID NO: 83-88.

184. Полинуклеотид по п.183, где полинуклеотид содержит или состоит из любой одной из SEQ ID NO: 83-88.

185. кДНК, содержащая полинуклеотид по любому одному из пп.182-184.

186. Вектор, содержащий полинуклеотид или кДНК по любому одному из пп.182-185.

187. Клетка-хозяин, трансформированная вектором по п.186, и которая способна экспрессировать полипептид или конструкцию по любому одному из пп.1-157.

188. Клетка-хозяин, трансформированная вектором по п.187, где клетка-хозяин представляет собой клетку дрожжей, таких как *S.cerevisiae*.

189. Клетка-хозяин, трансформированная вектором по п.187, где клетка-хозяин представляет собой клетку бактерий, таких как *E.coli*.

190. Способ получения полипептида или конструкции по любому одному из пп.1-157, включающий в себя следующие стадии:

i) клонирование в вектор, такой как плазмида, полинуклеотида по любому одному из пп.182-184,

ii) трансформацию клетки, такой как бактериальная клетка или дрожжевая клетка, способной продуцировать полипептид или конструкцию по любому одному из пп.1-157, указанным вектором в условиях, обеспечивающих получение полипептида или конструкции,

iii) выделение полипептида или конструкции, например, с помощью аффинной хроматографии.

191. Полипептид, содержащий переменный домен цепи иммуноглобулина, который связывается с TNF-альфа, где переменный домен цепи иммуноглобулина содержит три определяющие комплементарность области (CDR1-CDR3) и четыре каркасные области (FR1-FR4), где CDR3 содержит последовательность, имеющую 80% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 3.

192. Полипептид по п.191, где CDR3 состоит из последовательности, имеющей 80% или больший процент идентичности по последовательности с SEQ ID NO: 3.

193. Полипептид по любому п.191 или 192, где любые остатки из CDR3, отличающиеся от соответствующих им остатков в SEQ ID NO: 3, представляют собой консервативные замены относительно

соответствующих им остатков.

194. Полипептид по любому п.191 или 192, где остаток CDR3, соответствующий остатку номер 3 из SEQ ID NO: 3, представляет собой R, H, D, E, N, Q, S, T, Y, G, A, V, L, W, P, M, C, F или I.

195. Полипептид по п.194, где остаток CDR3, соответствующий остатку номер 3 из SEQ ID NO: 3, представляет собой H.

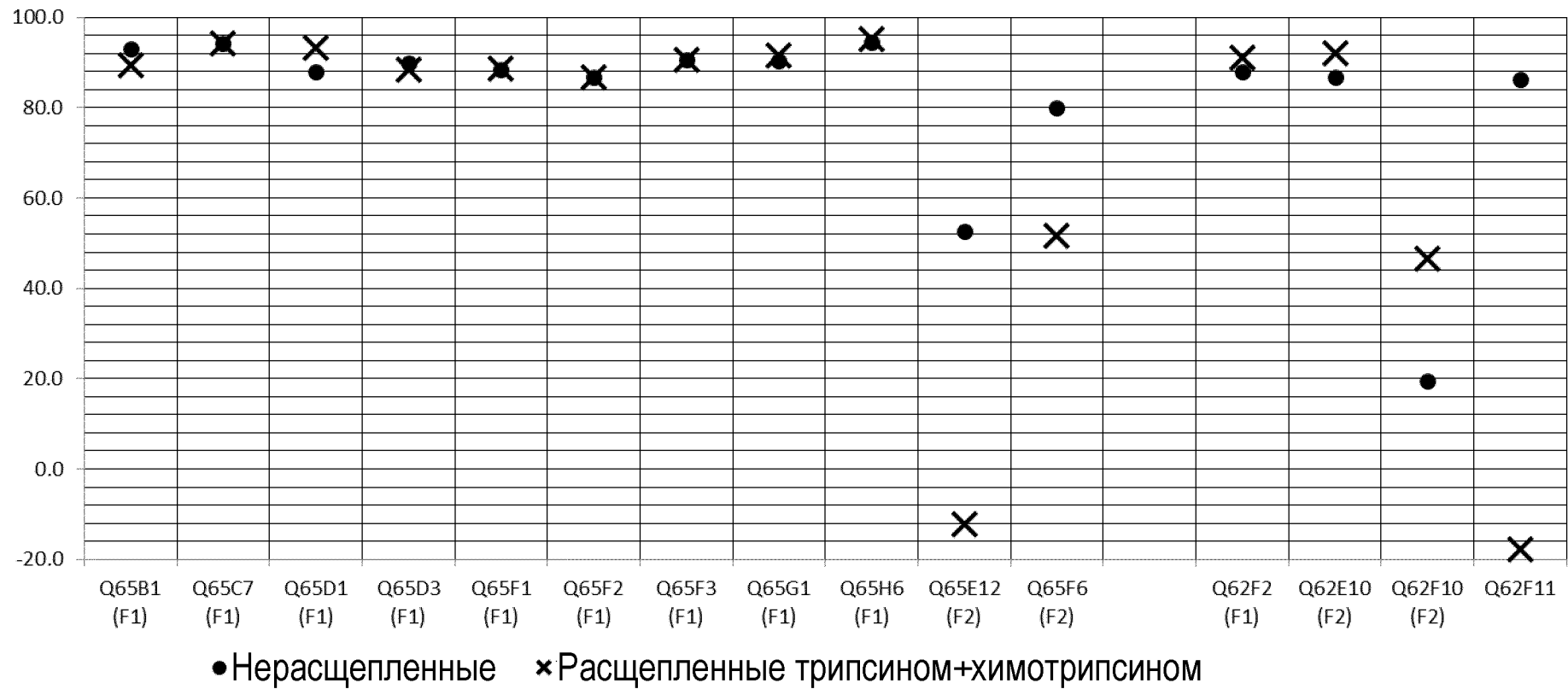
196. Полипептид по п.191, где CDR3 содержит SEQ ID NO: 3.

197. Полипептид по п.196, где CDR3 состоит из SEQ ID NO: 3.

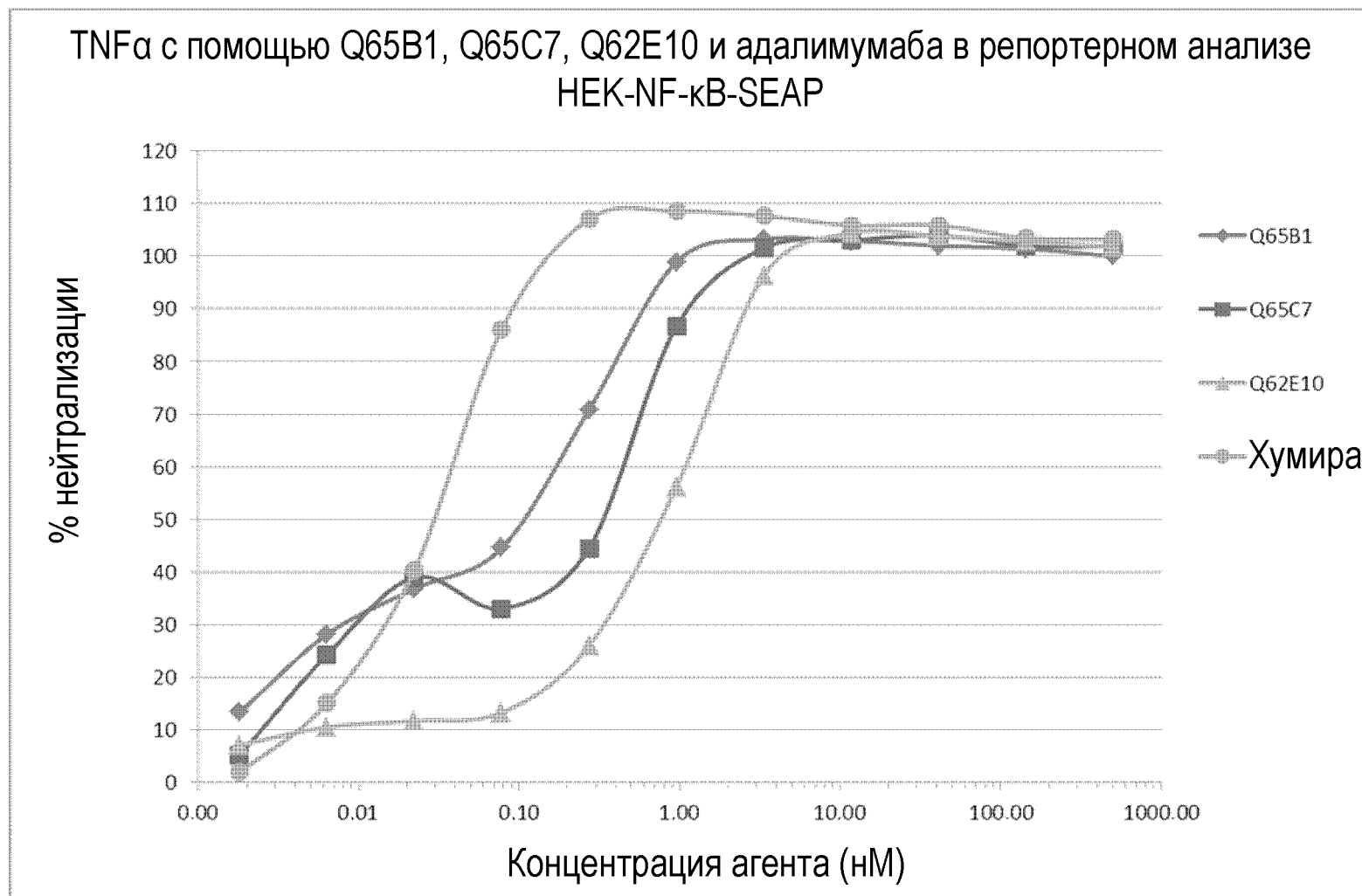
По доверенности

ФИГ. 1

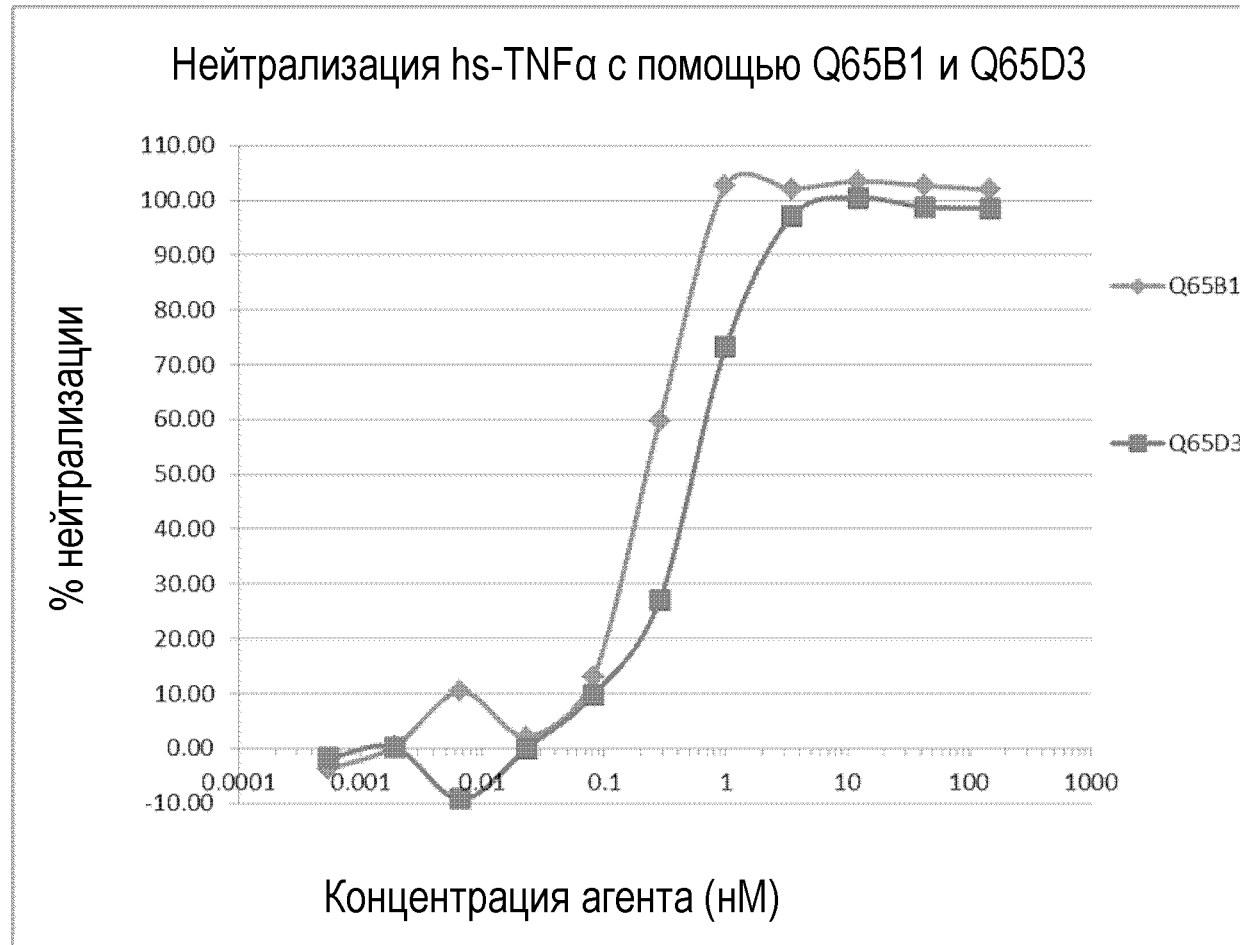
% TNF-альфа-нейтрализующая активность периплазматических супернатантов и очищенных образцов при воздействии и без воздействия трипсина и химотрипсина



ФИГ. 2А

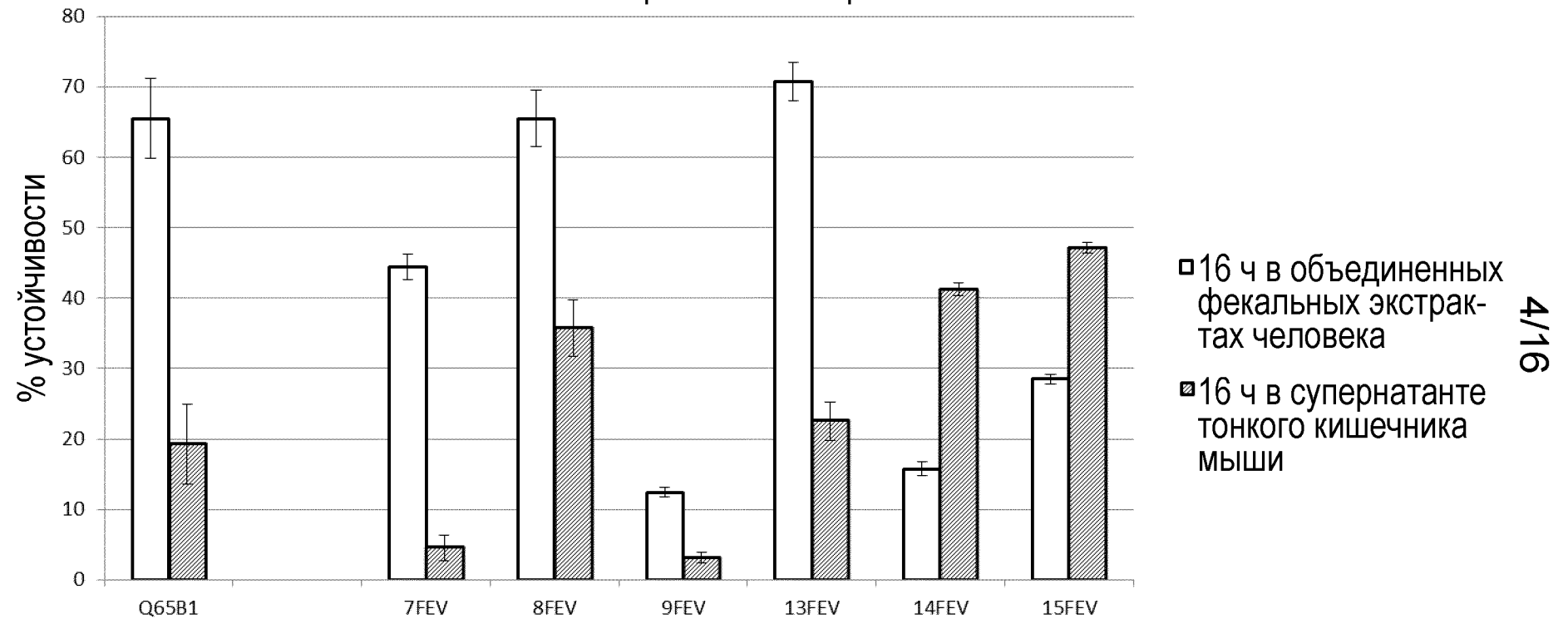


ФИГ. 2В

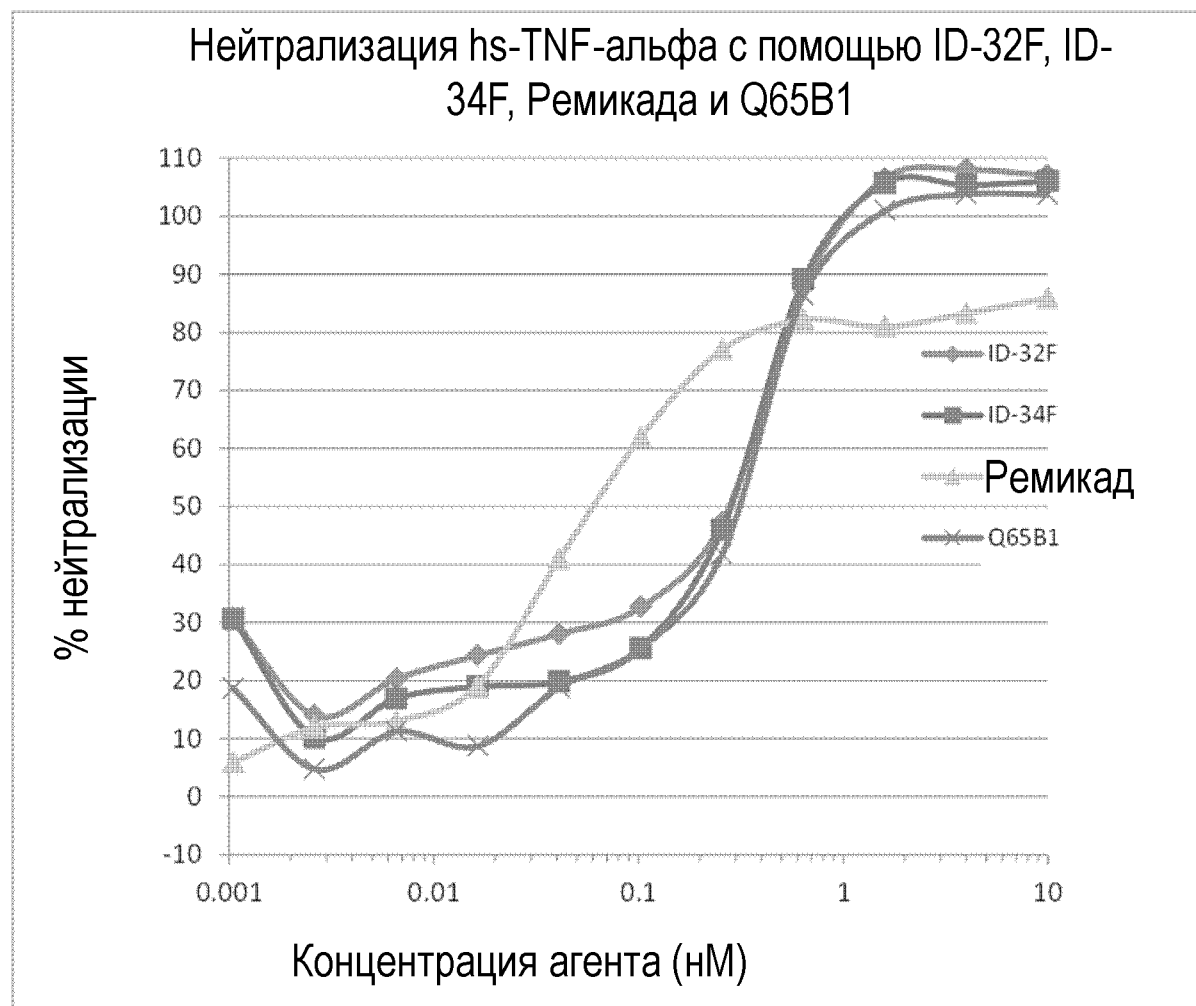


ФИГ. 3

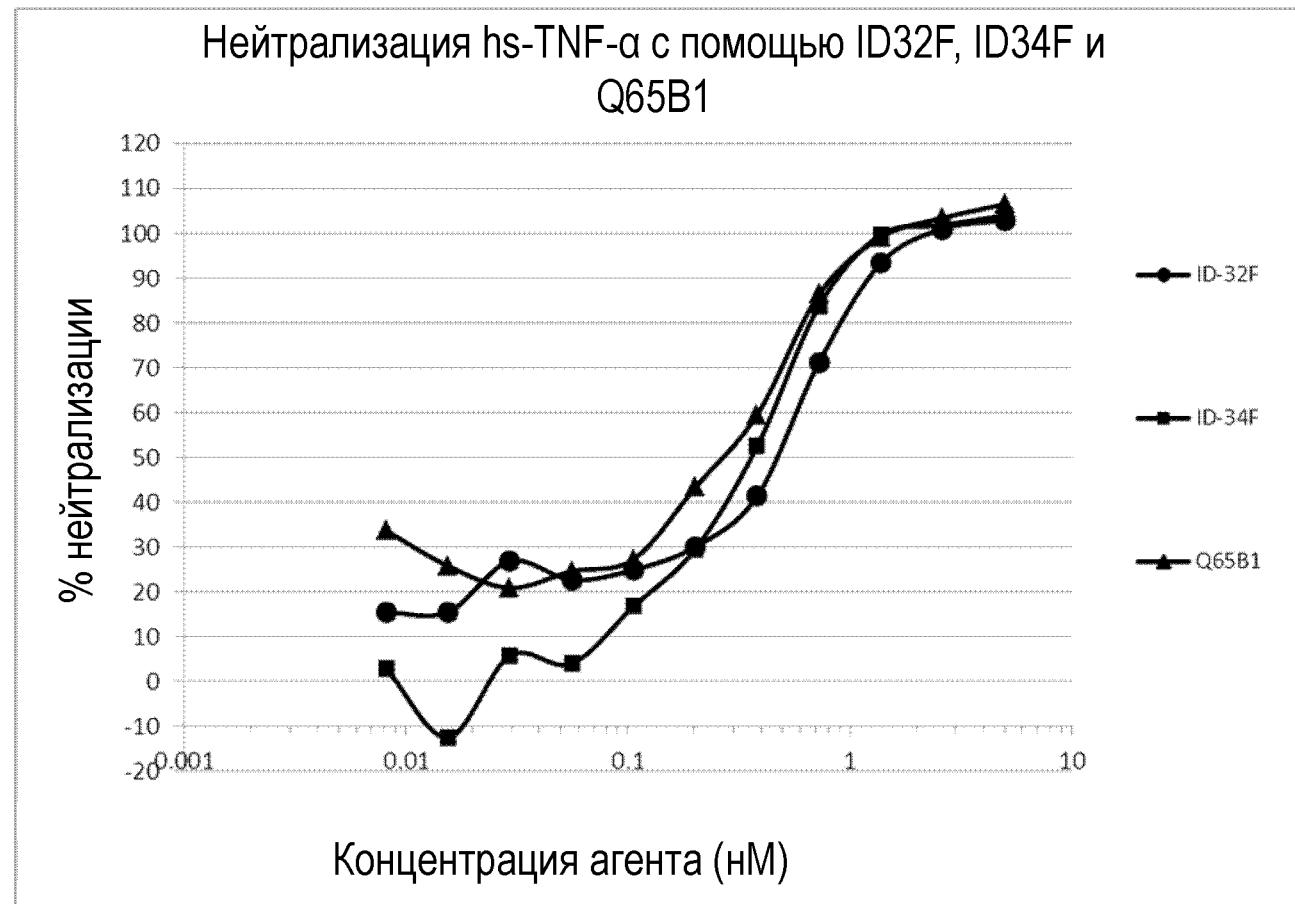
Вариабельные домены иммуноглобулиновых цепей при расщеплении протеазами
тонкого кишечника мыши и фекальными протеазами человека



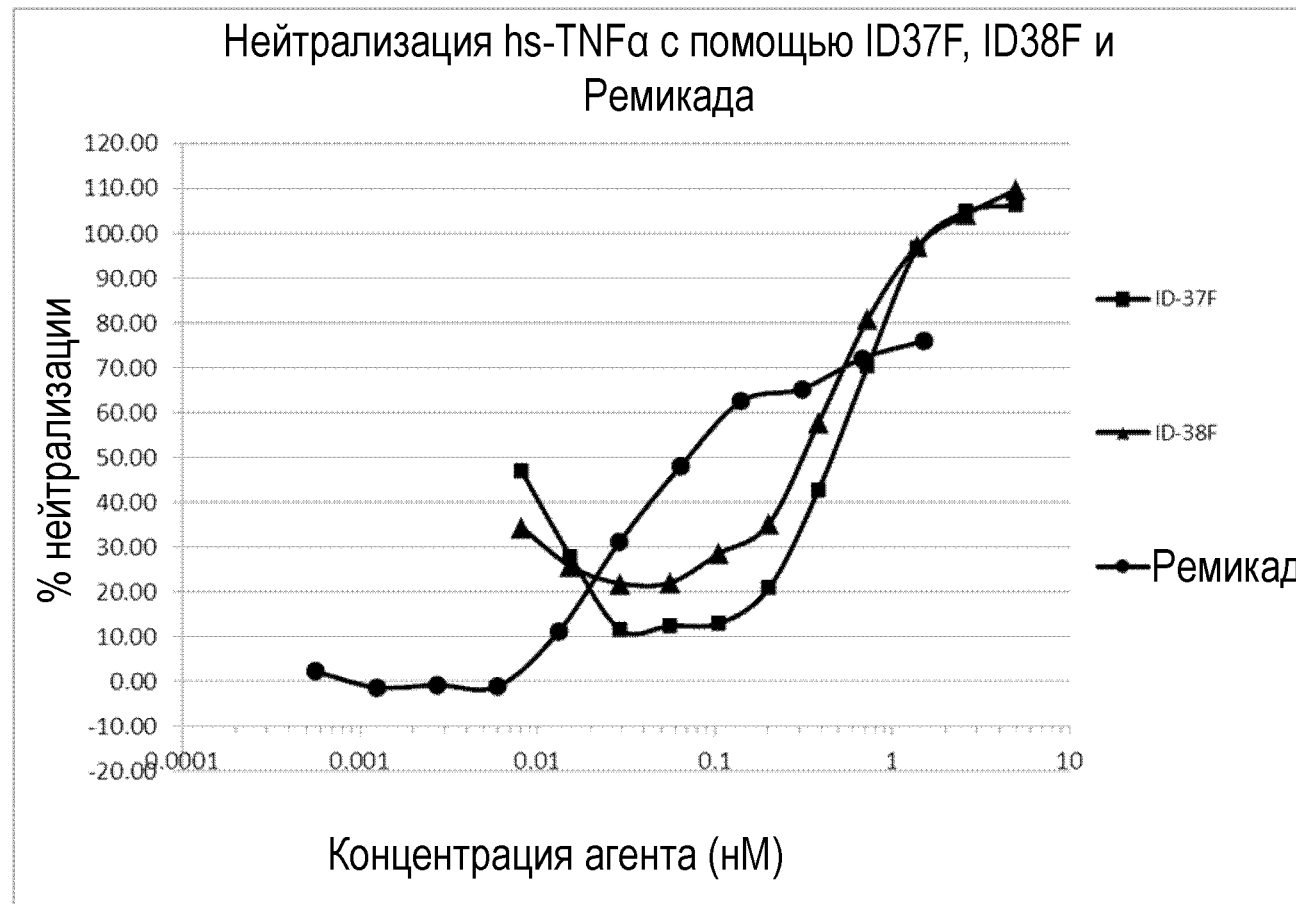
ФИГ. 4А



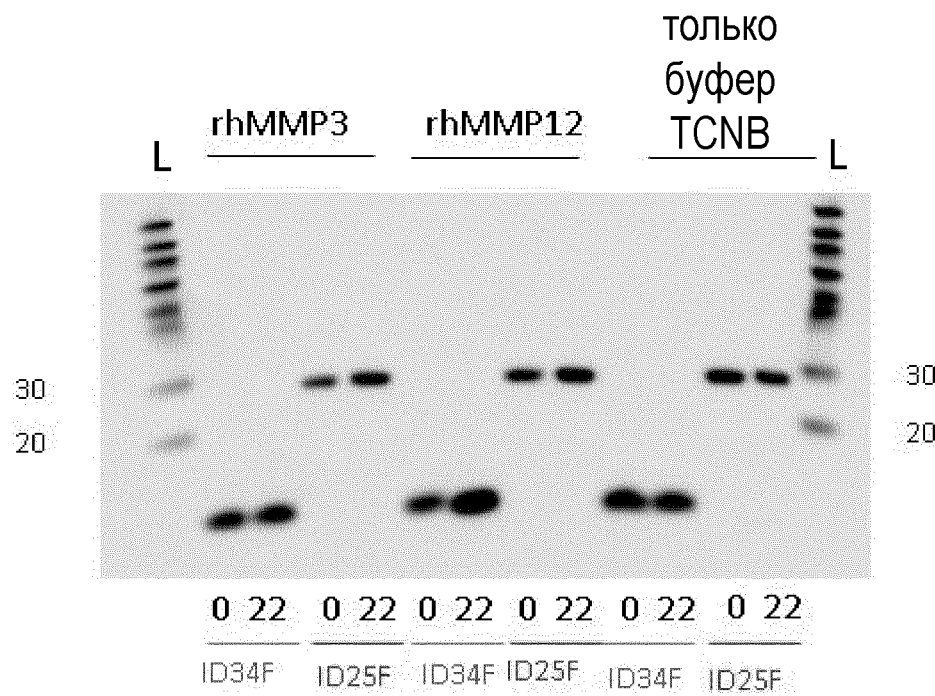
ФИГ. 4В



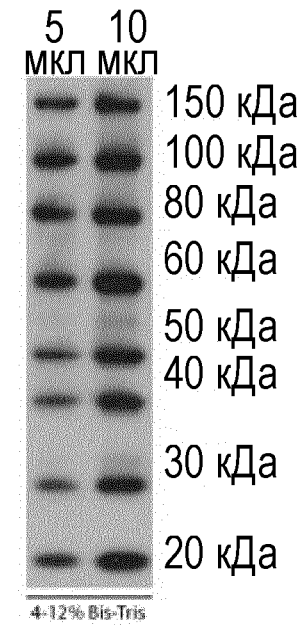
ФИГ. 4С



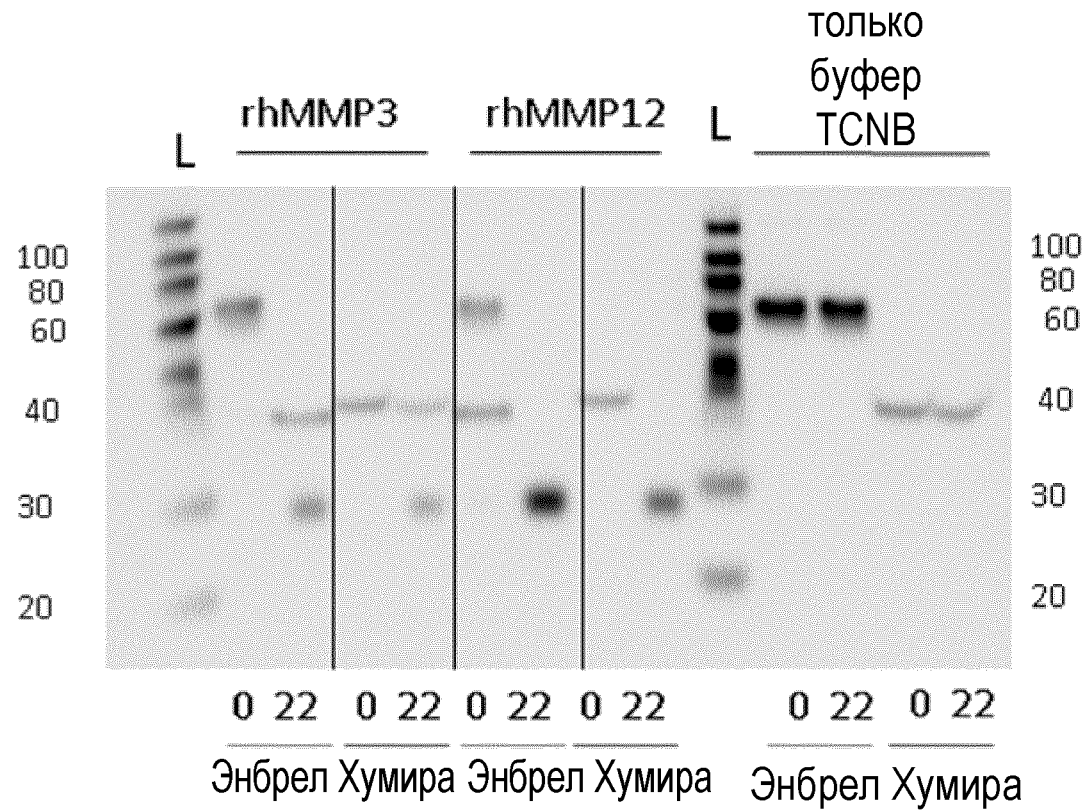
ФИГ. 5А



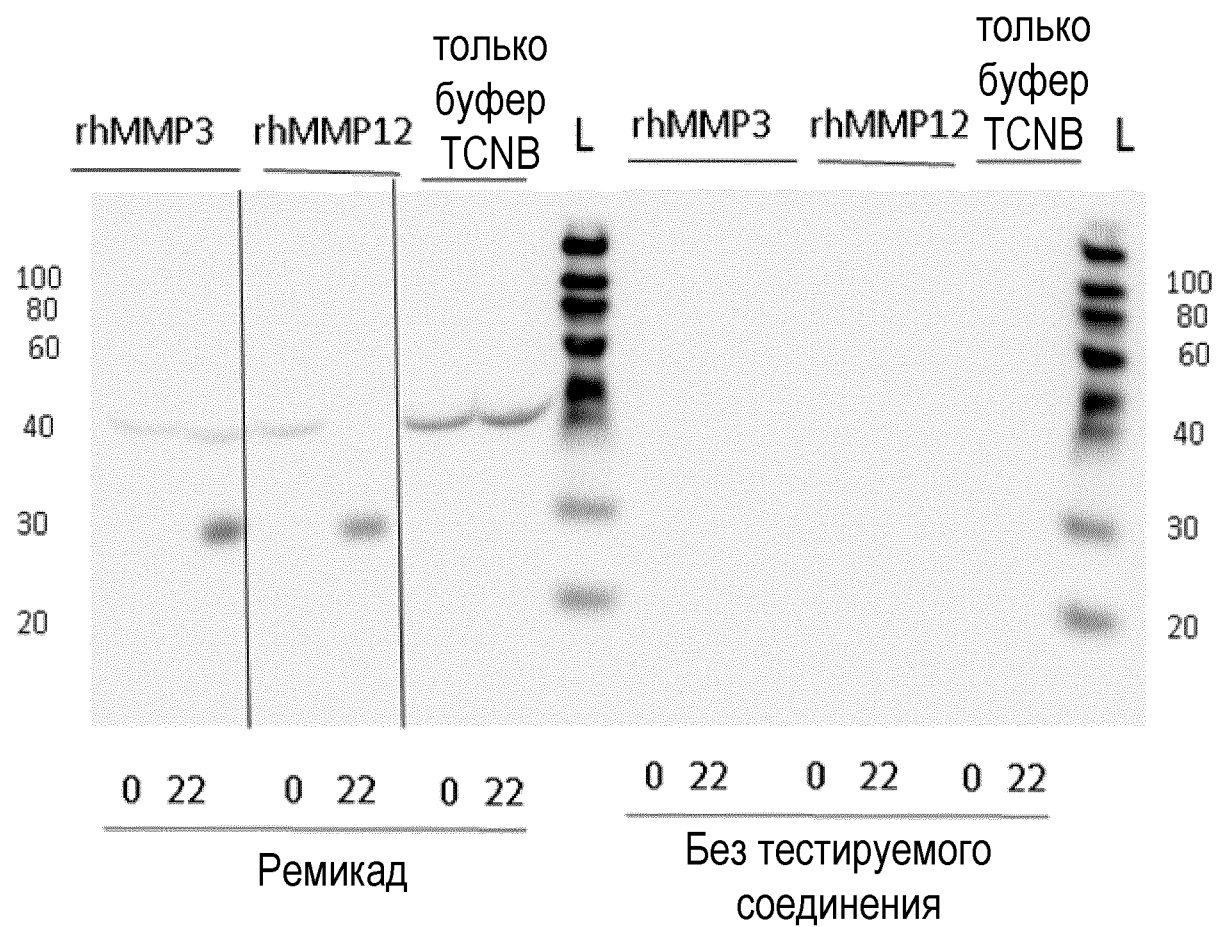
L=маркер мол.веса Pierce
super signal



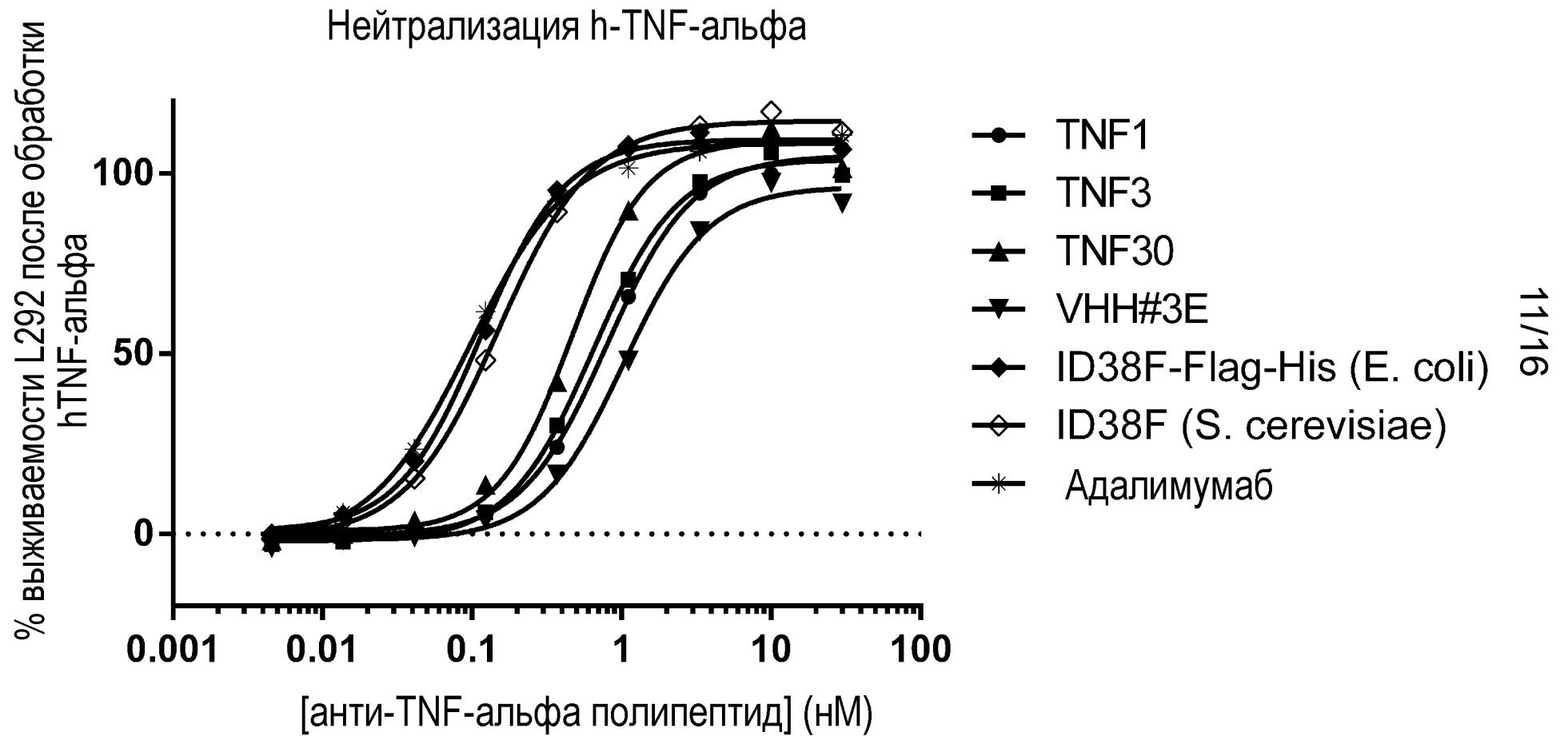
ФИГ. 5В



ФИГ. 5С

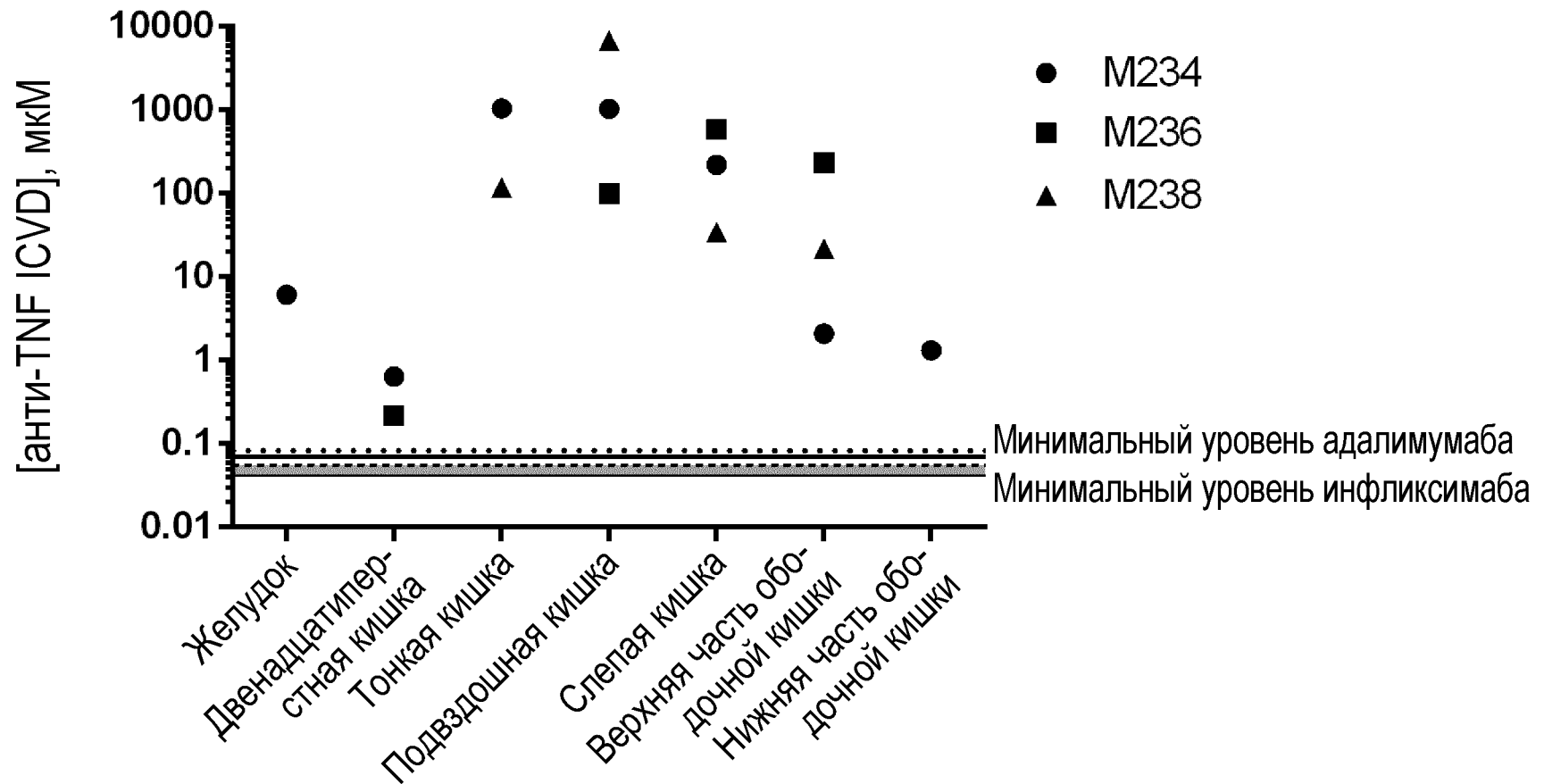


ФИГ. 6



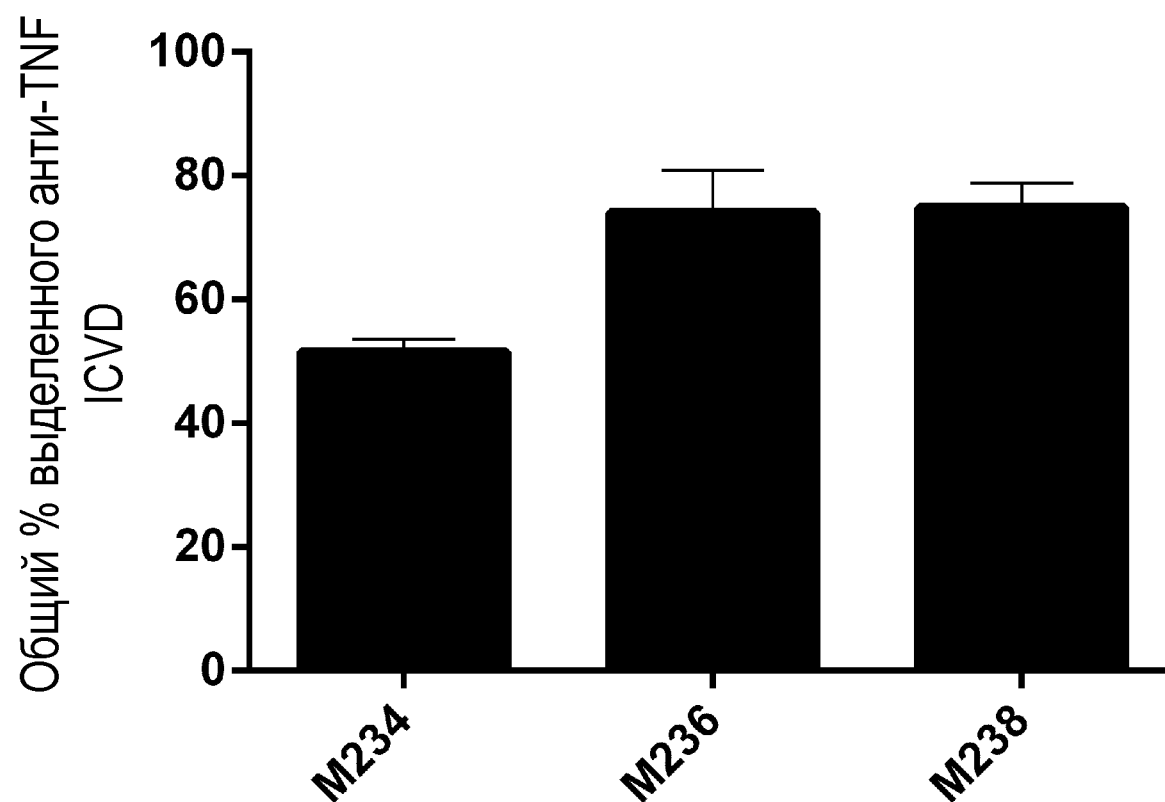
ФИГ. 7

Расчетная просветная концентрация [анти-TNF ICVD (вариабельно-го домена иммуноглобулиновой цепи)] в срезах желудочно-кишечно-го тракта яванских макак



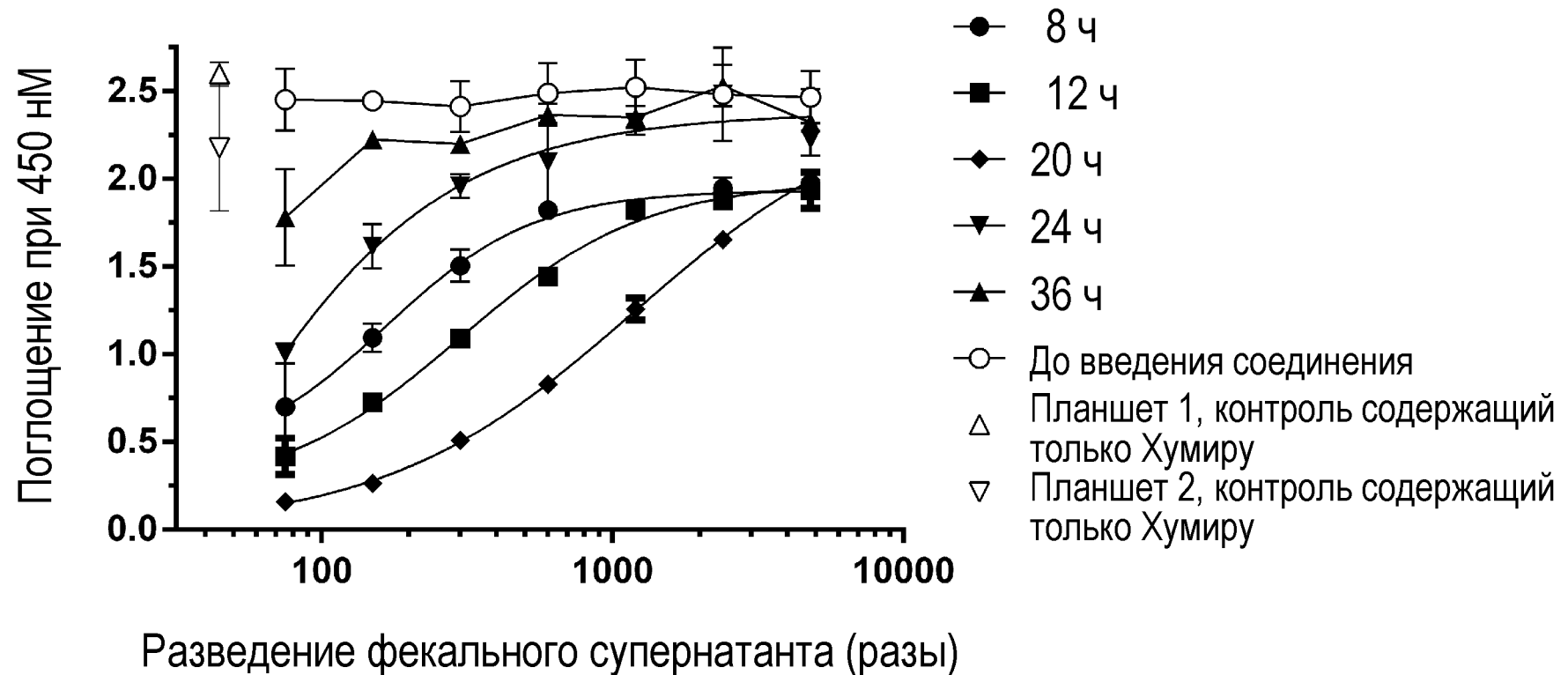
ФИГ. 8

Общий % выделения анти-TNF ICVD из желудочно-кишечного
тракта яванских макак



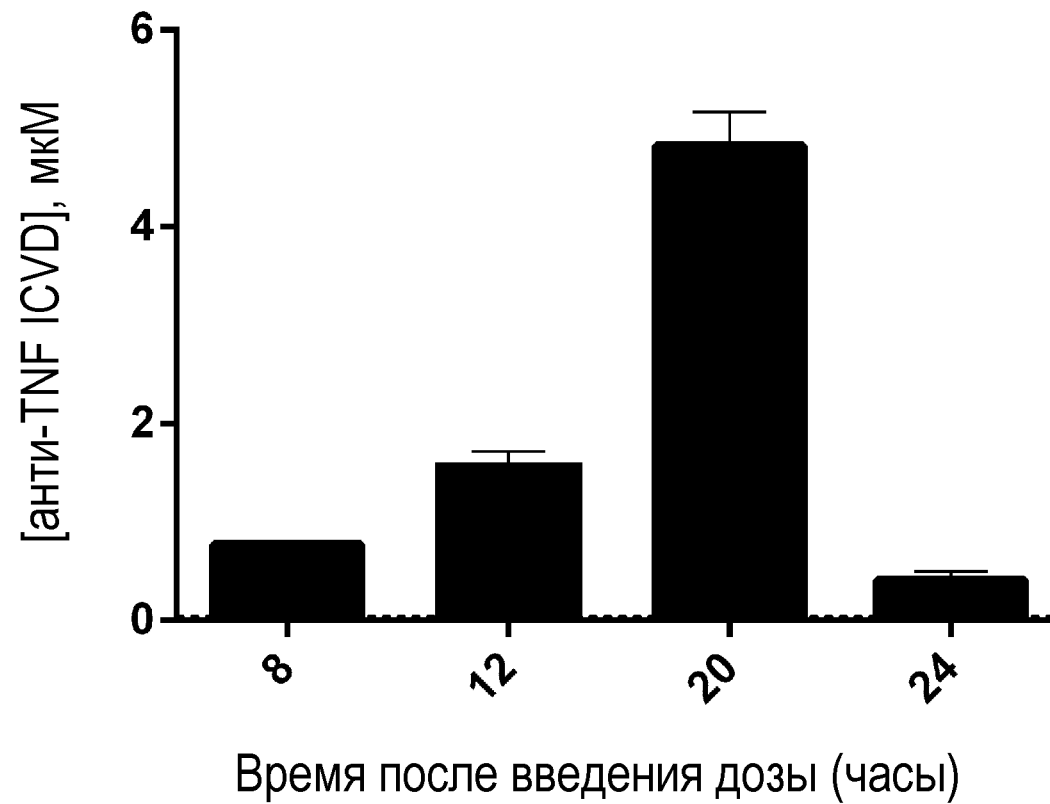
ФИГ. 9

Данные по конкурентному ELISA (OD450) с Хумира



ФИГ. 10

Концентрация анти-TNF ICVD в объединенных фекальных массах яванских макак



ФИГ. 11

Расчетная концентрация анти-TNF ICVD в объединенных фекальных массах яванских макак

