

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034251**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.01.22

(21) Номер заявки
201600418

(22) Дата подачи заявки
2012.04.26

(51) Int. Cl. **C07K 14/55** (2006.01)
C12N 15/26 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)

(54) НОВЫЕ ИММУНОКОНЬЮГАТЫ

(31) **11164237.7**

(32) **2011.04.29**

(33) **EP**

(43) **2016.09.30**

(62) **201301208; 2012.04.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
РОШЕ ГЛИКАРТ АГ (CH)

(72) Изобретатель:
**Аст Оливер, Брюнкер Петер, Хофер
Томас У., Хоссе Ральф, Клайн
Кристиан, Мёсснер Эккехард, Умана
Пабло (CH)**

(74) Представитель:
**Веселицкая И.А., Кузенкова Н.В.,
Веселицкий М.Б., Каксис Р.А.,
Белоусов Ю.В., Куликов А.В.,
Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) **WO-A2-2008143954
WO-A1-2010111282
WO-A2-2011020783
US-B2-7404956**

ELIZABETH ORTIZ-SÁNCHEZ ET AL.:
"Antibody cytokine fusion proteins: applications
in cancer therapy", EXPERT OPINION ON
BIOLOGICAL THERAPY, ASHLEY, LONDON,
GB, vol. 8, no. 5, 1 May 2008 (2008-05-01),
pages 609-632, XP008145785, ISSN: 1471-2598,
DOI:10.1517/14712598.8.5.609 page 617, column 2 -
page 619, column 1

**WO-A2-2008003473
WO-A2-2006119897
WO-A2-03048334**

RICART A.D. ET AL.: "Technology
Insight: Cytotoxic drug immunoconjugates for
cancer therapy", NATURE CLINICAL PRACTICE
ONCOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, US,
vol. 4, no. 4, 1 April 2007 (2007-04-01), pages
245-255, XP009134780, ISSN: 1743-4254, DOI:
10.1038/NCPONC0774 page 245 - page 253
WO-A1-2010088444

(57) В целом, в изобретении описаны антигенспецифические иммуноконъюгаты, предназначенные для введения эффекторных фрагментов, которые влияют на клеточную активность. Более конкретно, в изобретении описаны новые иммуноконъюгаты, которые содержат первый антигенсвязывающий фрагмент, Fc-домен и единичный эффекторный фрагмент. Кроме того, в изобретении описаны полинуклеотиды, кодирующие указанные иммуноконъюгаты, векторы и клетки-хозяева, которые содержат указанные полинуклеотиды. Описаны также способы получения иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, и способы применения указанных иммуноконъюгатов для лечения заболевания.

B1**034251****034251****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится в целом к антигенспецифическим иммуноконъюгатам, предназначенным для избирательного переноса обладающих эффекторной функцией фрагментов (эффекторных фрагментов), которые оказывают влияние на клеточную активность. Кроме того, настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновых кислот, кодирующим указанные иммуноконъюгаты, и векторам и клеткам-хозяевам, которые содержат указанные молекулы нуклеиновых кислот. Изобретение относится также к способам получения иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, и способам применения указанных конъюгатов для лечения заболеваний.

Известный уровень техники

В различных клинических ситуациях часто требуется деструкция индивидуальной клетки или конкретного типа клеток. Например, основной задачей при терапии рака является специфическое разрушение опухолевых клеток с сохранением при этом в интактном и неповрежденном состоянии здоровых клеток и тканей. С выживаемостью и/или гибелью клеток связано множество путей трансдукции сигналов в клетке. Таким образом, для оказания влияния на поддержание клетки или ее деструкцию можно применять непосредственное введение связанного с указанным путем фактора, который участвует в обеспечении выживаемости или гибели клеток. Аналогично этому, можно вводить специфические факторы, которые стимулируют иммунные эффекторные клетки в микроокружении опухоли, такие как естественные клетки-киллеры (NK) или цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), для "атаки" на опухолевые клетки и их разрушения.

Цитокины представляют собой молекулы, обеспечивающие передачу клеточных сигналов, которые принимают участие в регуляции иммунной системы. При применении в терапии рака цитокины могут действовать в качестве иммуномодуляторов, которые обладают противоопухолевой активностью и которые могут повышать иммуногенность некоторых типов опухолей. Однако быстрый клиренс из крови и отсутствие специфичности для опухоли обуславливают необходимость системного введения в высоких дозах цитокинов для достижения концентрации цитокина в области локализации опухоли, достаточной для активации иммунного ответа или противоопухолевого действия. Такие высокие уровни обладающих системным действием цитокинов могут приводить к проявлению серьезной токсичности и нежелательных реакций.

Таким образом, для применения в терапии является желательным специфическое введение *in vivo* фактора пути трансдукции сигнала, такого как цитокин, в конкретную область (например, опухоль или микроокружение опухоли в случае противораковой терапии). Для достижения этого можно конъюгировать фактор с обеспечивающим направленный перенос фрагментом, например антителом или фрагментом антитела, специфическим для данной области. Осуществляемые ранее стратегии, целью которых было введение факторов путей трансдукции сигналов, таких как цитокины, в конкретную область *in vivo*, предусматривали применение тяжелых цепей иммуноглобулинов, конъюгированных с различными цитокинами, такими как лимфотоксин, фактор некроза опухоли- α (TNF- α), интерлейкин-2 (IL-2) и колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF) (см., например, обзор, Lode и др., *Pharmacol Ther* 80, 1998, сс. 277-292).

Исследователи установили, что они не только могли обеспечивать направленный перенос цитокинов к конкретным областям *in vivo*, но и обладали преимуществом, связанным с тем, что моноклональные антитела имели более продолжительное время полужизни в сыворотке, чем большая часть других белков. Из-за системной токсичности, ассоциированной с высокими дозами определенных неконъюгированных цитокинов, например IL-2, возможность применения слитого белка иммуноглобулин-цитокин в более низких дозах, обеспечивающих максимальное повышение благоприятного биологического действия в требуемой области, например в опухоли, при поддержании системных побочных действий на минимальном уровне, позволила исследователям высказать предположение о том, что иммуноконъюгаты иммуноглобулин-цитокин являются оптимальными терапевтическими средствами.

Однако в данной области известно, что с иммуноконъюгатами иммуноглобулин-цитокин ассоциированы определенные недостатки. Например, в указанных иммуноконъюгатах имеется по меньшей мере один цитокин, связанный с каждой из двух тяжелых цепей иммуноглобулина, что приводит к получению иммуноконъюгата, обладающего способностью к двухвалентному связыванию с мишенью, и с двумя или большим количеством остатков цитокина (см., например, обзор Chang и др., *Expert Opin Drug Discovery* 4, 2009, сс. 181-194 или Ortiz-Sanchez и др., *Expert Opin. Biol. Ther.* 8, 2008, сс. 609-632). На фиг. 1 представлен общепринятый иммуноконъюгат иммуноглобулин-цитокин, известный в данной области, в котором цитокин слит с С-концом каждой из двух тяжелых цепей антитела. Из-за присутствия двух или большего количества остатков цитокина указанный иммуноконъюгат обладает высокой avidностью в отношении рецептора соответствующего цитокина (например, аффинностью, характеризующейся пиколярными величинами в случае IL-2), и в результате его мишенью являются скорее иммунные эффекторные клетки, которые экспрессируют рецептор цитокина, чем антиген, являющийся мишенью иммуноглобулина (аффинность, характеризующаяся наномолярными (nM) величинами), с которым цитокин связан. Кроме того, известно, что с общепринятыми иммуноконъюгатами могут быть ассоциированы реакции на инфузию (см., например, King и др., *J. Clin. Oncol.* 22, 2004, сс. 4463-4473), которые, по

меньшей мере частично, связаны с активацией цитокиновых рецепторов на иммунных эффекторных клетках в периферической крови входящими в иммуноконъюгат остатками цитокинов.

Кроме того, посредством их Fc-области иммуноконъюгаты иммуноглобулин-цитокин могут активировать комплемент и взаимодействовать с Fc-рецепторами. Эту присущую иммуноглобулинам особенность рассматривали как нежелательную, поскольку мишенью терапевтических иммуноконъюгатов могут являться клетки, экспрессирующие Fc-рецепторы, а не клетки, несущие предпочтительный антиген. Кроме того, одновременная активация цитокиновых рецепторов и Fc-рецепторов путей передачи сигналов приводит к высвобождению цитокинов, прежде всего, в сочетании с обладающими пролонгированным временем полужизни, содержащими иммуноглобулин слитыми белками, что затрудняет их применение в терапевтических целях из-за системной токсичности.

Один из подходов, позволяющих преодолевать эту проблему, состоит в применении в иммуноконъюгатах фрагментов иммуноглобулина, лишенных Fc-области, таких как scFv- или Fab-фрагменты. Примеры иммуноконъюгатов фрагмент иммуноглобулина-цитокин включают иммуноконъюгат scFv-IL-2, описанный в публикации PCT WO 2001/062298, иммуноконъюгат scFv-IL-12-scFv, описанный в публикации PCT WO 2006/119897 (в которых каждый из двух scFv-фрагментов соединен с субъединицей гетеродимера IL-12, которые удерживаются вместе с помощью дисульфидного(ых) мостика(ов)) или иммуноконъюгаты Fab-IL-2-Fab, описанные в публикации PCT WO 2011/020783. В большинстве иммуноконъюгатов таких типов сохраняются как реактивность в отношении связывания с опухолью родительской молекулы иммуноглобулина, так и функциональная активность цитокина, однако время полужизни таких конструкций существенно короче по сравнению с содержащими иммуноглобулин слитыми белками.

Таким образом, сохраняется потребность в иммуноконъюгатах, обладающих улучшенными свойствами касательно более высокой терапевтической эффективности и пониженного уровня и серьезности побочных действий этих продуктов (например, токсичность, деструкция неопухолевых клеток и т.д.).

В настоящем изобретении предложены иммуноглобулинподобные иммуноконъюгаты, обладающие повышенной эффективностью, высокой специфичностью действия, пониженной токсичностью и улучшенным временем полужизни и стабильностью в крови по сравнению с известными иммуноконъюгатами.

Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение основано, в частности, на полученных заявителями данных о том, что мишенью иммуноконъюгатов, содержащих более одного эффекторного фрагмента, такого, например, как цитокин, скорее может являться рецептор соответствующего эффекторного фрагмента, а не антиген-мишень антигенсвязывающего фрагмента иммуноконъюгата. Таким образом, одним из объектов изобретения является иммуноконъюгат, содержащий первый антигенсвязывающий фрагмент, Fc-домен, содержащий две субъединицы, и эффекторный фрагмент, в котором присутствует не более одного эффекторного фрагмента. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент слит с аминоконцевой аминокислотой одной из двух субъединиц Fc-домена, необязательно через линкерный пептид. В одном из вариантов осуществления изобретения первый антигенсвязывающий фрагмент слит с аминоконцевой аминокислотой одной из двух субъединиц Fc-домена, необязательно через линкерный пептид или шарнирную область иммуноглобулина.

В одном из вариантов осуществления изобретения первый антигенсвязывающий фрагмент содержит антигенсвязывающий домен антитела. В конкретном варианте осуществления изобретения первый антигенсвязывающий фрагмент представляет собой молекулу Fab. В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен содержит модификацию, усиливающую гетеродимеризацию двух неидентичных полипептидных цепей. В конкретном варианте осуществления изобретения указанная модификация представляет собой модификацию типа "knob-in-hole" ("выступ-впадина"), которая включает модификацию, приводящую к образованию "выступа" в одной из субъединиц Fc-домена и "впадины" в другой одной из двух субъединиц Fc-домена. В конкретном варианте осуществления изобретения эффекторный фрагмент слит с аминоконцевой аминокислотой субъединицы Fc-домена, содержащей модификацию, приводящую к образованию "выступа".

В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG, в частности Fc-домен IgG₁. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен является человеческим.

В конкретных вариантах осуществления изобретения Fc-домен конструируют так, чтобы он обладал измененной способностью связываться с Fc-рецептором, в частности измененной способностью связываться с Fcγ-рецептором, и/или измененной эффекторной функцией, в частности антитело-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичностью (ADCC).

Хотя присутствие Fc-домена является важным для пролонгирования времени полужизни иммуноконъюгата, при создании изобретения рассматривалась концепция о том, что в некоторых ситуациях может оказаться целесообразным элиминировать эффекторные функции, ассоциированные с взаимодействием Fc-рецепторов с Fc-доменом. Таким образом, в конкретных вариантах осуществления изобретения измененное связывание с Fc-рецептором и/или измененная эффекторная функция представляет собой

пониженное связывание и/или пониженную эффекторную функцию. В конкретном указанном варианте осуществления изобретения Fc-домен содержит одну или несколько аминокислотную(ые) мутацию(ии), которая(ые) снижает(ют) связывание Fc-домена с Fc-рецептором, в частности Fc γ -рецептором. Предпочтительно указанная аминокислотная мутация не может снижать связывание с FcRn-рецепторами. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотную замену в положении P329. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G в каждой из его субъединиц.

С другой стороны, могут иметь место ситуации, при которых требуется повышать эффекторные функции иммуноконъюгатов. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, конструируют так, чтобы он обладал измененной способностью связываться с Fc-рецептором, в частности с Fc γ -рецептором, более конкретно с Fc γ IIIa-рецептором и/или измененной эффекторной функцией, при этом измененное связывание и/или измененная эффекторная функция представляет собой повышенное связывание и/или повышенную эффекторную функцию. В одном из таких вариантов осуществления изобретения Fc-домен конструируют так, чтобы он имел измененную олигосахаридную структуру по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом. В конкретном таком варианте осуществления изобретения Fc-домен имеет повышенное относительное содержание нефукозилированных олигосахаридов по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом. В более конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен содержит по меньшей мере 20%, предпочтительно по меньшей мере 50%, более предпочтительно по меньшей мере 70% нефукозилированных олигосахаридов. В другом конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен имеет повышенное относительное содержание бисекционных олигосахаридов по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен имеет повышенное относительное содержание бисекционных нефукозилированных олигосахаридов по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанная измененная олигосахаридная структура является результатом повышенной активности β (1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII) в клетке-хозяине, применяемой для экспрессии иммуноконъюгата. Конкретным объектом изобретения являются иммуноконъюгаты, которые содержат первый и второй антигенсвязывающие фрагменты, Fc-домен, состоящий из двух субъединиц, эффекторный фрагмент, в которых присутствует не более одного эффекторного фрагмента. В одном из вариантов осуществления изобретения первый и второй антигенсвязывающие фрагменты и Fc-домен представляют собой часть молекулы иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуноконъюгат практически состоит из молекулы иммуноглобулина и эффекторного фрагмента и необязательно одной или нескольких линкерных последовательностей. В конкретном варианте осуществления изобретения молекула иммуноглобулина представляет собой иммуноглобулин класса IgG. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноглобулин представляет собой иммуноглобулин подкласса IgG₁. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент слит с карбоксиконцевой аминокислотой одной из тяжелых цепей иммуноглобулина, необязательно через линкерный пептид.

В конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, содержит молекулу иммуноглобулина, которая содержит два антигенсвязывающих фрагмента и Fc-домен, и эффекторный фрагмент, слитый с карбоксиконцевой аминокислотой одной из тяжелых цепей иммуноглобулина, в котором присутствует не более одного эффекторного фрагмента и в котором Fc-домен конструируют так, чтобы он обладал пониженной способностью связываться с Fc-рецептором, в частности измененной способностью связываться с Fc γ -рецептором, и/или пониженной эффекторной функцией.

В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный первый антигенсвязывающий фрагмент или указанные первый и второй антигенсвязывающие фрагменты направлены к антигену, ассоциированному с патологическим состоянием, такому как антиген, который презентуется на опухолевой клетке или в окружении опухолевой клетки, в области воспаления или в инфицированной вирусом клетке. В более конкретном варианте осуществления изобретения указанный антиген выбирают из группы, включающей белок активации фибробластов (фибробласт-активирующий белок) (FAP), A1-домен теназина-С (TNC A1), A2-домен теназина-С (TNC A2), экстра-домен В фибронектина (EDB), карциноэмбриональный антиген (CEA) и ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат-протеогликан (MCSP).

В некоторых вариантах осуществления изобретения эффекторный фрагмент представляет собой одноцепочечный эффекторный фрагмент. В конкретном варианте осуществления изобретения эффекторный фрагмент представляет собой цитокин. В одном из вариантов осуществления изобретения указанный цитокин выбирают из группы, включающей IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IFN- α и IFN- γ . В конкретном варианте осуществления изобретения указанный цитокин представляет собой IL-2. В еще более предпочтительном варианте осуществления изобретения указанный цитокин представляет собой мутантный полипептид IL-2, обладающий пониженной аффинностью связывания с α -субъединицей IL-2-рецептора. В конкретном варианте осуществления изобретения указанный мутантный полипептид IL-2

содержит аминокислотную замену в одном или нескольких положениях, выбранных из положений, которые соответствуют остаткам 42, 45 и 72 человеческого IL-2. В другом конкретном варианте осуществления изобретения цитокин представляет собой IL-10. Еще в одном варианте осуществления изобретения цитокин представляет собой IL-15, прежде всего мутантный полипептид IL-15, обладающий пониженной способностью связываться с α -субъединицей IL-15-рецептора. В другом варианте осуществления изобретения цитокин представляет собой IFN- α .

Другим объектом изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, или его фрагмент. Изобретение относится также к экспрессионному вектору, содержащему выделенный полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, и клетке-хозяину, содержащей выделенный полинуклеотид или экспрессионный вектор, предлагаемый в изобретении. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, в частности клетку млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетку-хозяин подвергают манипуляциям, приводящим к экспрессии повышенных уровней одного или нескольких полипептидов, обладающих активностью β (1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII). В одном из указанных вариантов осуществления изобретения клетку-хозяин подвергают дополнительной манипуляции, приводящей к экспрессии повышенных уровней одного или нескольких полипептидов, обладающих активностью α -маннозидазы II (ManII).

Другим объектом изобретения является способ получения иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, заключающийся в том, что осуществляют стадии, на которых а) культивируют клетку-хозяин, предлагаемую в изобретении, в условиях, пригодных для экспрессии иммуноконъюгата, и б) выделяют иммуноконъюгат. Изобретение относится также к иммуноконъюгату, полученному способом, предлагаемым в изобретении.

Изобретение относится также к фармацевтической композиции, содержащей иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель.

Изобретение относится также к способам применения иммуноконъюгатов и фармацевтических композиций, предлагаемых в изобретении. Одним из объектов изобретения является иммуноконъюгат или фармацевтическая композиция, предлагаемый/предлагаемая в изобретении, для применения в качестве лекарственного средства. Одним из объектов изобретения является иммуноконъюгат или фармацевтическая композиция, предлагаемый/предлагаемая в изобретении, для применения для лечения заболевания у индивидуума, который нуждается в этом. В конкретном варианте осуществления изобретения заболевание представляет собой рак. В других вариантах осуществления изобретения заболевание представляет собой воспалительное нарушение. В указанном конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит эффекторный фрагмент IL-10.

Предложено также применения иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, для приготовления лекарственного средства, предназначенного для лечения заболевания у индивидуума, который нуждается в этом; а также способ лечения заболевания у индивидуума, заключающийся в том, что вводят указанному индивидууму в терапевтически эффективном количестве композицию, содержащую иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, в фармацевтически приемлемой форме. В конкретном варианте осуществления изобретения заболевание представляет собой рак. В других вариантах осуществления изобретения заболевание представляет собой воспалительное нарушение. В указанном конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит эффекторный фрагмент IL-10.

В любом из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения индивидуум предпочтительно представляет собой млекопитающее, в частности человека.

Следующим объектом изобретения является конъюгат, содержащий первую молекулу Fab, которая не связывается специфически ни с каким антигеном, Fc-домен, состоящий из двух субъединиц, и эффекторный фрагмент, где в конъюгате присутствует не более одного эффекторного фрагмента. В конкретном варианте осуществления изобретения первая молекула Fab содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 299 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 297. В одном из вариантов осуществления изобретения конъюгат содержит (I) молекулу иммуноглобулина, которая содержит первую и вторую молекулу Fab, которая не связывается специфически ни с каким антигеном, и Fc-домен и (II) эффекторный фрагмент, где в конъюгате присутствует не более одного эффекторного фрагмента. В одном из вариантов осуществления изобретения молекула иммуноглобулина представляет собой иммуноглобулин класса IgG, в частности иммуноглобулин подкласса IgG₁. В конкретном варианте осуществления изобретения молекула иммуноглобулина содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 299 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 297. В частности, последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 299 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 297 входят в первую и вторую молекулу Fab молекулы иммуноглобулина. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент слит с карбоксиконцевой аминокислотой одной из тяжелых цепей иммуноглобулина, необязательно через линкерный пептид. В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен конъюгата конструируют так, чтобы он обладал пониженной способностью связываться

с Fc-рецептором, в частности пониженной способностью связываться с Fcγ-рецептором, и/или пониженной эффекторной функцией, в частности пониженной ADCC. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен конъюгата содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G в каждой из его субъединиц. В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен конъюгата содержит модификацию, усиливающую гетеродимеризацию двух неидентичных полипептидных цепей. В конкретном варианте осуществления изобретения модификация представляет собой модификацию типа "knob-in-hole" ("выступ-впадина"), которая включает модификацию, приводящую к образованию "выступа" в одной из субъединиц Fc-домена и "впадины" в другой из указанных двух субъединиц Fc-домена. В конкретном варианте осуществления изобретения эффекторный фрагмент слит с аминокислотной субъединицей Fc-домена, содержащей модификацию, приводящую к образованию "выступа". В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент представляет собой цитокин, в частности IL-2. Кроме того, конъюгат может включать индивидуально или в сочетании друг с другом любую из характерных особенностей, указанных выше при описании форматов, Fc-домена или эффекторного фрагмента иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении.

Изобретение относится также к выделенному полинуклеотиду, кодирующему конъюгат, предлагаемый в изобретении, или его фрагмент. В конкретном варианте осуществления изобретения выделенный полинуклеотид содержит последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 298 или SEQ ID NO: 300. В изобретении предложен также экспрессионный вектор, содержащий выделенный полинуклеотид, и клетка-хозяин, содержащая выделенный полинуклеотид или экспрессионный вектор, предлагаемый в изобретении. Другим объектом изобретения является способ получения конъюгата, предлагаемого в изобретении, заключающийся в том, что осуществляют стадии, на которых а) культивируют клетку-хозяин, предлагаемую в изобретении, в условиях, пригодных для экспрессии конъюгата, и б) выделяют конъюгат. Изобретение относится также к конъюгату, полученному способом, предлагаемым в изобретении.

Изобретение относится также к фармацевтической композиции, которая содержит конъюгат, предлагаемый в изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель. Кроме того, конъюгат можно использовать в указанных в настоящем описании способах применения иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении.

Краткое описание чертежей

На чертежах показано

на фиг. 1 - схематическое изображение типичного иммуноконъюгата иммуноглобулин-цитокин, известного в данной области, в котором цитокин (обозначен точками) слит с C-концом каждой из двух тяжелых цепей иммуноглобулина;

на фиг. 2 - схематическое изображение новых иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, которые содержат не более одного эффекторного фрагмента (обозначен точками). Эффекторный фрагмент слит необязательно через линкерный пептид (серые прямоугольники) с карбоксиконцевой (формат А и Б) или аминоконцевой аминокислотой (формат В) Fc-домена. Иммуноконъюгат содержит один (формат Б и В) или большее количество (как правило, два, формат А) антигенсвязывающих фрагментов, которые могут представлять собой Fab-фрагменты, содержащие вариабельные домены тяжелой и легкой цепи антигена (обозначены косыми линиями). Fc-домен может содержать модификацию, усиливающую гетеродимеризацию двух неидентичных полипептидных цепей (черная точка), и/или модификацию, приводящую к изменению способности связываться с Fc-рецептором и/или к изменению эффекторной функции (черная звезда);

на фиг. 3 - результаты очистки иммуноконъюгата на основе IgG клона 4G8 и четырехмутантного (qm) IL-2 (IgG-IL-2 qm), мишенью которого является FAP. А) Профиль элюции, полученный на стадии аффинной хроматографии с белком А. Б) Профиль элюции, полученный на стадии гель-фильтрации. В) Результаты, полученные для конечного продукта с помощью аналитического ДСН-ПААГ (NuPAGE Novex бис-трис-минигель (фирма Invitrogen), подвижный буфер MOPS. Г) Результаты, полученные с помощью аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке с Супердекс 200 (содержание мономера 97%);

на фиг. 4 - результаты очистки иммуноконъюгата на основе 28H1 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является FAP. А) Профиль элюции, полученный на стадии аффинной хроматографии с белком А. Б) Профиль элюции, полученный на стадии гель-фильтрации. В) Результаты, полученные для конечного продукта с помощью аналитического ДСН-ПААГ (в восстанавливающих условиях: NuPAGE Novex Бис-Трис-минигель (фирма Invitrogen), подвижный буфер MOPS; в невосстанавливающих условиях NuPAGE трис-ацетат (фирма Invitrogen), трис-ацетатный подвижный буфер). Г) Результаты, полученные с помощью аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке с Супердекс 200 (содержание мономера 100%);

на фиг. 5 - результаты очистки иммуноконъюгата на основе 28H1 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является FAP, из СНО-клеток. А) Профиль элюции, полученный на стадии аффинной хроматографии с белком А. Б) Профиль элюции, полученный на стадии гель-фильтрации. В) Результаты, полученные для конечного продукта с помощью аналитического ДСН-ПААГ (NuPAGE Novex бис-трис-минигель (фирма

Invitrogen), подвижный буфер MOPS). Г) Результаты, полученные с помощью аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке с Супердекс 200 (содержание мономера 100%);

на фиг. 6 - результаты очистки иммуноконъюгата на основе 4B9 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является FAP. А) Профиль элюции, полученный на стадии аффинной хроматографии с белком А. Б) Профиль элюции, полученный на стадии гель-фильтрации. В) Результаты, полученные для конечного продукта с помощью аналитического ДСН-ПААГ (NuPAGE Novex бис-трис-минигель (фирма Invitrogen), подвижный буфер MOPS). Г) Результаты, полученные с помощью аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке с Супердекс 200 (содержание мономера 100%);

на фиг. 7 - результаты очистки иммуноконъюгата на основе CH1A1A 98/99× 2F1 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является СЕА. А) Профиль элюции, полученный на стадии аффинной хроматографии с белком А. Б) Профиль элюции, полученный на стадии гель-фильтрации. В) Результаты, полученные для конечного продукта с помощью аналитического капиллярного электрофореза в присутствии ДСН (фирма Caliper). Г) Результаты, полученные с помощью аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке с TSKgel G3000 SW XL (содержание мономера 98,8%);

на фиг. 8 - результаты очистки иммуноконъюгата на основе 2B10 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является TNC A2. А) Профиль элюции, полученный на стадии аффинной хроматографии с белком А. Б) Профиль элюции, полученный на стадии гель-фильтрации. В) Результаты, полученные для конечного продукта с помощью аналитического капиллярного электрофореза в присутствии ДСН (фирма Caliper). Г) Результаты, полученные с помощью аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке с TSKgel G3000 SW XL (содержание мономера 100%);

на фиг. 9 - результаты очистки не имеющего специфической мишени ("ненаправленного") иммуноконъюгата на основе DP47GS IgG-IL-2 qm. А) Профиль элюции, полученный на стадии аффинной хроматографии с белком А. Б) Профиль элюции, полученный на стадии гель-фильтрации. В) Результаты, полученные для конечного продукта с помощью аналитического ДСН-ПААГ (NuPAGE Novex бис-трис-минигель (фирма Invitrogen), подвижный буфер MOPS). Г) Результаты, полученные с помощью аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке с Супердекс 200 (содержание мономера 100%);

на фиг. 10 - результаты анализа связывания иммуноконъюгата на основе 4G8 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является FAP, с человеческим FAP, экспрессируемым на стабильно трансфектированных клетках НЕК 293, полученные с помощью FACS, в сравнении с соответствующей конструкцией Fab-IL-2 qm-Fab;

на фиг. 11 - данные о высвобождении интерферона (IFN)- γ из NK92-клеток, индуцированном иммуноконъюгатом на основе 4G8 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является FAP, в растворе в сравнении с конструкцией на основе 28H1 Fab-IL-2 qm-Fab;

на фиг. 12 - результаты определения фосфорилированного STAT5 с помощью FACS в различных типах клеток после стимуляции в течение 20 мин иммуноконъюгатом на основе 4G8 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является FAP, в растворе в сравнении с конструкциями на основе 28H1 Fab-IL-2-Fab и Fab-IL-2 qm-Fab, а также с пролейкином. А) NK-клетки (CD3⁺CD56⁺); Б) CD8⁺-Т-клетки (CD3⁺CD8⁺); В) CD4⁺-Т-клетки (CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127⁺); Г) регуляторные Т-клетки (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺);

на фиг. 13 - результаты анализа связывания иммуноконъюгата на основе 2B10 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является TNC A2, и соответствующего неконъюгированного IgG с TNC A2, экспрессируемым на U87MG-клетках, полученные с помощью FACS;

на фиг. 14 - данные об индукции пролиферации NK92-клеток с помощью иммуноконъюгатов на основе 2B10 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является TNC A2, на основе CH1A1A 98/99× 2F1 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является СЕА, и на основе CH1A1A 98/99× 2F1 IgG-IL-2 wt, мишенью которого является СЕА;

на фиг. 15 - данные об индукции пролиферации NK92-клеток с помощью иммуноконъюгатов, мишенью которого является FAP, таких как 4B9 IgG-IL-2 qm и 4B9 IgG-IL-2 wt;

на фиг. 16 - данные об уничтожении (полученные путем измерения высвобождения LDH) сверхэкспрессирующих СЕА опухолевых клеток линии A549 с помощью РВМС посредством ADCC, обусловленной созданными с помощью гликоинженерии (ge) и дикого типа (wt) иммуноконъюгатами на основе CH1A1A IgG-IL-2 qm, в сравнении с неконъюгированным созданным с помощью гликоинженерии IgG CH1A1A;

на фиг. 17 - результаты очистки "ненаправленного" иммуноконъюгата DP47GS IgG-IL-2 wt. А) Профиль элюции, полученный на стадии аффинной хроматографии с белком А. Б) Профиль элюции, полученный на стадии гель-фильтрации. В) Результаты, полученные для конечного продукта с помощью аналитического ДСН-ПААГ (NuPAGE Novex бис-трис-минигель (фирма Invitrogen), подвижный буфер MOPS). Г) Результаты, полученные с помощью аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке с Супердекс 200 (содержание мономера 99,6%);

на фиг. 18 - результаты очистки иммуноконъюгата на основе 28H1 IgG-IL-2, мишенью которого является FAP. А) Профиль элюции, полученный на стадии аффинной хроматографии с белком А. Б) Профиль элюции, полученный на стадии гель-фильтрации. В) Результаты, полученные для конечного про-

дукта с помощью аналитического ДСН-ПААГ (NuPAGE Novex бис-трис-минигель (фирма Invitrogen), подвижный буфер MOPS. Г) Результаты, полученные с помощью аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке с Супердекс 200 (содержание мономера 99,6%);

на фиг. 19 - результаты очистки иммуноконъюгата на основе CH1A1A 98/99× 2F1 IgG-IL-2 wt, мишенью которого является СЕА. А) Профиль элюции, полученный на стадии аффинной хроматографии с белком А. Б) Профиль элюции, полученный на стадии гель-фильтрации. В) Результаты, полученные для конечного продукта с помощью аналитического капиллярного электрофореза в присутствии ДСП (фирма Caliper). Г) Результаты, полученные с помощью аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке с TSKgel G3000 SW XL (содержание мономера 100%);

на фиг. 20 - результаты очистки иммуноконъюгата на основе 4B9 IgG-IL-2 wt, мишенью которого является FAP. А) Профиль элюции, полученный при объединении аффинной хроматографии на белке А и гель-фильтрации. Б) Масштабированное изображение профиля элюции, полученного с помощью гель-фильтрации на стадии А. В) Результаты, полученные для конечного продукта с помощью аналитического ДСН-ПААГ (NuPAGE Novex бис-трис-минигель (фирма Invitrogen), подвижный буфер MOPS). Г) Результаты, полученные с помощью аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке с TSKgel G3000 SW XL (содержание мономера 98,5%);

на фиг. 21 - результаты анализа конструкции 2B10 IgG-IL-10M1, полученные с помощью А) аналитического ДСН-ПААГ (NuPAGE Novex бис-трис-минигель (фирма Invitrogen), буфер для образца NuPAGE LDS (4×), который выдерживали в течение 10 мин при 70°C, MOPS-буфер, 160 В, 60 мин, маркер молекулярной массы (MW) Mark 12, неокрашенный стандарт (фирма Invitrogen, М) в восстанавливающих (1) и невосстанавливающих (2) условиях. Б) Результаты оценки аффинности конструкции 2B10 IgG-IL-10M1 к человеческому TNC A2 на основе SPR (ProteOn XPR36) путем глобальной аппроксимации с применением модели взаимодействия 1:1 (чип: NLC; лиганд: TNCA2 (250 RU); анализируемое вещество: 2B10 IgG-IL-10M1, мишенью которого является TNCA2 (TNCA2 2B10 IgG-IL-10M1), 164 кДа; диапазон концентраций анализируемого вещества: 50, 10, 2, 0,4, 0,08, 0 нМ; продолжительность ассоциации: 180 с; продолжительность диссоциации: 600 с; скорость потока: 50 мкл/мин; k_{on} $1,80 \times 10^6$ 1/Мс; k_{off} : $9,35 \times 10^{-5}$ 1/с; K_D : 52 пМ). В) Результаты оценки аффинности конструкции 2B10 IgG-IL-10M1 к человеческому IL-10R1 на основе SPR (ProteOn XPR36) путем глобальной аппроксимации с применением модели взаимодействия 1:1 (чип: NLC; лиганд: IL-10R1 (1600 RU); анализируемое вещество: 2B10 IgG-IL-10M1, мишенью которого является TNCA2, 164 кДа; диапазон концентраций анализируемого вещества: 50, 10, 2, 0,4, 0,08, 0 нМ; продолжительность ассоциации: 180 с; продолжительность диссоциации: 600 с; скорость потока: 50 мкл/мин; k_{on} $5,56 \times 10^5$ 1/Мс; k_{off} : $2,89 \times 10^{-4}$ 1/с; K_D : 520 пМ);

на фиг. 22 - результаты анализа конструкции 4G8 IgG-IL-10M1, полученные с помощью А) аналитического ДСН-ПААГ (NuPAGE Novex бис-трис-минигель (фирма Invitrogen), буфер для образца NuPAGE LDS (4×), который выдерживали в течение 10 мин при 70°C, MOPS-буфер, 160 В, 60 мин, маркер молекулярной массы (MW) Mark 12, неокрашенный стандарт (фирма Invitrogen, М) в восстанавливающих (1) и невосстанавливающих (2) условиях. Б) Результаты оценки аффинности конструкции 4G8 IgG-IL-10M1 к человеческому FAP на основе SPR (ProteOn XPR36) путем глобальной аппроксимации с применением модели взаимодействия 1:1 (чип: GLM; лиганд: huFAP (500 RU); анализируемое вещество: FAP 4G8 IgG-IL-10M1, 164 кДа; диапазон концентраций анализируемого вещества: 10, 2, 0,4, 0,08, 0 нМ; продолжительность ассоциации: 180 с; продолжительность диссоциации: 600 с; скорость потока: 50 мкл/мин; k_{on} $6,68 \times 10^5$ 1/Мс; k_{off} : $1,75 \times 10^{-5}$ 1/с; K_D : 26 пМ). В) Результаты оценки аффинности конструкции 4G8 IgG-IL-10M1 к человеческому IL-10R1 на основе SPR (ProteOn XPR36) путем глобальной аппроксимации с применением модели взаимодействия 1:1 (чип: NLC; лиганд: IL 10R1 (1600 RU); анализируемое вещество: 4G8 IgG-IL-10M1, мишенью которого является FAP, 164 кДа; диапазон концентраций анализируемого вещества: 50, 10, 2, 0,4, 0,08, 0 нМ; продолжительность ассоциации: 180 с; продолжительность диссоциации: 600 с; скорость потока: 50 мкл/мин; k_{on} : $3,64 \times 10^5$ 1/Мс; k_{off} : $2,96 \times 10^{-4}$ 1/с; K_D : 815 пМ);

на фиг. 23 - результаты очистки иммуноконъюгата на основе 4B9 "1+1" IgG-IL-2 qm, мишенью которого является FAP. А) Профиль элюции, полученный при объединении аффинной хроматографии на белке А и гель-фильтрации. Б) Результаты, полученные для конечного продукта с помощью аналитического ДСН-ПААГ (NuPAGE Novex бис-трис-минигель (фирма Invitrogen), подвижный буфер MOPS). В) Результаты, полученные с помощью аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке с TSKgel G3000 SW XL (содержание мономера 99,2%);

на фиг. 24 - результаты очистки иммуноконъюгата на основе 28H1 "1+1" IgG-IL-2 qm, мишенью которого является FAP. А) Профиль элюции, полученный при объединении аффинной хроматографии на белке А и гель-фильтрации. Б) Результаты, полученные для конечного продукта с помощью аналитического ДСН-ПААГ (NuPAGE Novex бис-трис-минигель (фирма Invitrogen), подвижный буфер MOPS). В) Результаты, полученные с помощью аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке с TSKgel G3000 SW XL (содержание мономера 100%);

на фиг. 25 - результаты очистки иммуноконъюгата на основе 4B9 "1+1" IgG-IL-2 qm, мишенью ко-

того является FAP. А) Профиль элюции, полученный при объединении аффинной хроматографии на белке А и гель-фильтрации. Б) Результаты, полученные для конечного продукта с помощью аналитического ДСН-ПААГ (NuPAGE Novex бис-трис-минигель (фирма Invitrogen), подвижный буфер MOPS). В) Результаты, полученные с помощью аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке с TSKgel G3000 SW XL (содержание мономера 98,6%);

на фиг. 26 - результаты очистки иммуноконъюгата на основе 4B9 "1+1" IgG IFN- α , мишенью которого является FAP. А) Профиль элюции, полученный на стадии аффинной хроматографии с белком А. Б) Профиль элюции, полученный на стадии гель-фильтрации. В) Результаты, полученные для конечного продукта с помощью аналитического капиллярного электрофореза в присутствии ДСН (фирма Caliper). Г) Результаты, полученные с помощью аналитической гель-фильтрации конечного продукта на колонке с TSKgel G3000 SW XL (содержание мономера 92,8%);

на фиг. 27 - данные об индукции пролиферации NK92-клеток с помощью иммуноконъюгатов 4B9 "1+1" IgG-IL-2 qm и 28H1 "1+1" IgG-IL-2 wt, мишенью которых является FAP, в сравнении с соответствующими конструкциями IgG-IL-2;

на фиг. 28 - данные о пролиферации активированных ФГА (фитогеммагглютинин) CD4-Т-клеток (А) и CD8-Т-клеток (Б), индуцированной иммуноконъюгатами 4B9 "1+1" IgG-IL-7 и 4B9 "1+1" IgG-IL-2 qm в сравнении с конструкциями IgG-IL-2 qm и IgG-IL-2 wt;

на фиг. 29 - данные об индукции пролиферации клеток Дауди с помощью 4B9 "1+1" IgG-IFN- α в сравнении с рофероном А;

на фиг. 30 - концентрации в сыворотке включающих IL-2 иммуноконъюгатов после однократного i.v.-введения конструкций, мишенью которых является FAP (А), и "ненаправленных" конструкций IgG-IL-2 (Б), которые содержат либо дикого типа (wt), либо четырехмутантный (qm) IL-2;

на фиг. 31 - данные о распределении в тканях конструкций 28H1 IgG-IL qm, мишенью которых является FAP, в сравнении с неконъюгированными 28H1 IgG и 4B9 IgG, мишенью которых является FAP, а также с "ненаправленным" DP47GS IgG, через 24 ч после i.v.-инъекции;

на фиг. 32 - данные о связывании иммуноконъюгатов 28H1 IgG-IL-2 qm и 28H1 IgG-(IL-2 qm)₂ с NK92-клетками, полученные с помощью FACS;

на фиг. 33 - данные о пролиферации NK-клеток после инкубации с различными иммуноконъюгатами 28H1-IL-2, мишенью которых является FAP, или с пролейкином в течение 4 (А), 5 (Б) или 6 (В) дней;

на фиг. 34 - данные о пролиферации CD4-Т-клеток после инкубации с различными иммуноконъюгатами 28H1-IL-2, мишенью которых является FAP, или с пролейкином в течение 4 (А), 5 (Б) или 6 (В) дней;

на фиг. 35 - данные о пролиферации CD8-Т-клеток после инкубации с различными иммуноконъюгатами 28H1-IL-2, мишенью которых является FAP, или с пролейкином в течение 4 (А), 5 (Б) или 6 (В) дней;

на фиг. 36 - данные о пролиферации предварительно активированных CD8-(А) и CD4-Т-клеток (Б) после инкубации в течение 6 дней с различными содержащими IL-2 иммуноконъюгатами;

на фиг. 37 - данные об индуцированной активации клеточной гибели CD3⁺-Т-клеток после инкубации в течение 6 дней с различными содержащими IL-2 иммуноконъюгатами и обработки в течение ночи антителом к Fas;

на фиг. 38 - концентрации в сыворотке включающих IL-2 иммуноконъюгатов после однократного i.v.-введения "ненаправленных" конструкций DP47GS IgG-IL-2, содержащих либо дикого типа (А), либо четырехмутантный IL-2 (Б);

на фиг. 39 - данные о связывании DP47GS IgG с различными антигенами. Связывание оценивали с помощью анализа на основе ELISA с использованием антигенов, иммобилизованных на планшете. Человеческое антитело в виде IgG₁, которое обладает способностью к неспецифическому связыванию практически со всеми иммобилизованными антигенами, применяли в качестве положительного контроля, "пустые" образцы не содержали никакого антитела;

на фиг. 40 - данные о связывании DP47GS IgG с мутацией LALA P329G или без указанной мутации в Fc-домене, с субпопуляциями необработанных (А), активированных ФГА-Л (Б) и повторно стимулированных (В) человеческих PBMC, полученные с помощью FACS-анализа. Левая верхняя панель: В-клетки (А, Б) или CD4⁺-Т клетки (В); верхняя правая панель: CD8⁺-Т-клетки; нижняя левая панель: NK-клетки; нижняя правая панель: CD14⁺-клетки (моноциты/нейтрофилы).

Подробное описание изобретения

Определения.

Понятия, применяемые в настоящем описании, имеют значения, общепринятые в данной области, если ниже специально не указано иное.

В контексте настоящего описания понятие "конъюгат" относится к молекуле слитого полипептида, которая включает одну эффекторную молекулу и дополнительную пептидную молекулу, в частности молекулу иммуноглобулина.

В контексте настоящего описания понятие "иммуноконъюгат" относится к молекуле слитого поли-

пептида, которая включает один эффекторный фрагмент, по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент и Fc-домен при условии, что присутствует не более одного эффекторного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит одну эффекторную молекулу, два антигенсвязывающих фрагмента и Fc-домен. В частности, иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, практически состоят из одного эффекторного фрагмента, двух антигенсвязывающих фрагментов и Fc-домена, сцепленных с помощью одной или нескольких линкерных последовательностей. Антигенсвязывающий фрагмент и эффекторный фрагмент могут быть связаны с Fc-доменом с помощью различных взаимодействий и в различных конфигурациях, указанных в настоящем описании. В конкретном варианте осуществления изобретения два антигенсвязывающих фрагмента и Fc-домен сцеплены друг с другом в такой конфигурации, чтобы образовывать полную молекулу иммуноглобулина. Иммуноконъюгат в контексте настоящего изобретения представляет собой слитый белок, т.е. компоненты иммуноконъюгата связаны друг с другом пептидными связями, либо непосредственно, либо через линкерные пептиды.

В контексте настоящего описания понятие "антигенсвязывающий фрагмент" относится к полипептидной молекуле, которая специфически связывается с антигенной детерминантой. В одном из вариантов осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент обладает способностью направлять субстанцию, к которой он присоединен (например, эффекторный фрагмент или второй антигенсвязывающий фрагмент), к сайту-мишени, например к специфическому типу опухолевой клетки или стромы опухоли, несущей антигенную детерминанту. Антигенсвязывающие фрагменты включают антитела и их фрагменты, что будет дополнительно описано ниже. Предпочтительные антигенсвязывающие фрагменты включают антигенсвязывающий домен антитела, который содержит переменную область тяжелой цепи антитела и переменную область легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты могут включать константные области антитела, что будет дополнительно описано ниже и известно в данной области. Пригодные константные области тяжелых цепей включают любой из пяти изотипов: α , δ , ϵ , γ или μ . Пригодные константные области легких цепей включают любой из двух изотипов: κ и λ .

В контексте настоящего описания понятие "антигенная детерминанта" является синонимом понятий "антиген" и "эпитоп" и относится к сайту (например, участку, состоящему из смежных аминокислот, или конформационной конфигурации, состоящей из различных областей несмежных аминокислот) на полипептидной макромолекуле, с которой связывается антигенсвязывающий фрагмент с образованием комплекса антигенсвязывающий фрагмент-антиген. Пригодные антигенные детерминанты могут присутствовать, например, на поверхности опухолевых клеток, на поверхности инфицированных вирусом клеток, на поверхности других больных клеток, в свободном состоянии в сыворотке крови и/или во внеклеточном матриксе (ECM). В конкретном варианте осуществления изобретения антигенная детерминанта представляет собой человеческий антиген.

Понятие "специфически связывается" означает, что связывание является избирательным в отношении антигена и его можно отличать от нежелательных или неспецифических взаимодействий. Способность антигенсвязывающего фрагмента связываться со специфической антигенной детерминантой можно определять с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) или других методик, известных специалистам в данной области, например, с помощью методики на основе резонанса поверхностного плазмона (осуществляя анализ с помощью устройства BIAcore) (Liljeblad и др., Glyco J. 17, 2000, сс. 323-329), и традиционных анализов связывания (Heeley, Endocr Res 28, 2002, сс. 217-229). В одном из вариантов осуществления изобретения уровень связывания антигенсвязывающего фрагмента с неродственным белком составляет менее чем примерно 10% от уровня связывания антигенсвязывающего фрагмента с антигеном, измеренного, например, с помощью SPR. В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с антигеном, или иммуноконъюгат, содержащий антигенсвязывающий фрагмент, характеризуется величиной константы диссоциации (K_D), составляющей ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ или $\leq 0,001$ нМ (например, 10^{-8} М или менее, например, от 10^{-8} до 10^{-13} М, например от 10^{-9} до 10^{-13} М).

Понятие "аффинность" относится к суммарной силе всех нековалентных взаимодействий между индивидуальным сайтом связывания молекулы (например, рецептора) и ее партнера по связыванию (например, лиганда). Если не указано иное, то в контексте настоящего описания понятие "аффинность связывания" относится к присущей компонентам связывающейся пары (например, рецептору и лиганду) аффинности связывания, отражающей взаимодействие по типу 1:1. Аффинность молекулы X к ее партнеру Y можно, как правило, характеризовать с помощью константы диссоциации (K_D), которая представляет собой отношение констант скорости реакции диссоциации и ассоциации (k_{off} и k_{on} соответственно). Так, эквивалентные аффинности могут соответствовать различным константам скорости, если соотношение констант скорости остается таким же. Аффинность можно оценивать общепринятыми методами, известными в данной области, включая представленные в настоящем описании. Конкретным методом измерения аффинности является резонанс поверхностного плазмона (SPR).

Понятие "пониженное связывание (пониженная способность к связыванию)", например пониженная

способность к связыванию с Fc-рецептором или CD25, относится к снижению аффинности касательно соответствующего взаимодействия, измеренной, например, с помощью SPR. Для ясности следует отметить, что понятие включает также снижение аффинности до нуля (или ниже предела обнаружения аналитического метода), т.е. полную элиминацию взаимодействия. И, наоборот, "повышенное связывание (повышенная способность к связыванию)" относится к повышению аффинности связывания касательно соответствующего взаимодействия.

В контексте настоящего описания понятия "первый" и "второй" касательно антигенсвязывающих фрагментов и т.д. применяют с целью удобства разделения, когда присутствует более одного типа каждого из фрагментов. Применение этих понятий не подразумевает их конкретный порядок или ориентацию в иммуноконъюгате, если специально не указано иное.

В контексте настоящего описания понятие "эффекторный фрагмент" относится к полипептиду, например белку или гликопротеину, который оказывает влияние на клеточную активность, например, через трансдукцию сигналов или посредством других клеточных путей. Таким образом, эффекторный фрагмент, предлагаемый в изобретении, может быть ассоциирован с опосредуемой рецептором передачей сигналов, что приводит к передаче сигнала от наружной части клеточной мембраны, модулируя ответ в клетке, которая несет один или несколько рецепторов эффекторного фрагмента. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент может вызывать цитотоксический ответ в клетках, несущих рецепторы эффекторного фрагмента. В другом варианте осуществления изобретения эффекторный фрагмент может вызывать пролиферативный ответ в клетках, несущих один или несколько рецепторов эффекторного фрагмента. В другом варианте осуществления изобретения эффекторный фрагмент может вызывать дифференцировку клеток, несущих один или несколько рецепторов эффекторного фрагмента. В другом варианте осуществления изобретения эффекторный фрагмент может изменять экспрессию (т.е. может обладать способностью осуществлять повышающую регуляцию или понижающую регуляцию) эндогенного клеточного белка в клетках, несущих рецепторы эффекторного фрагмента. Примерами эффекторных фрагментов являются (но не ограничиваясь только ими) цитокины, факторы роста, гормоны, ферменты, субстраты и кофакторы. Эффекторный фрагмент может быть ассоциирован с антигенсвязывающим фрагментом или Fc-доменом в различных конфигурациях с образованием иммуноконъюгата.

В контексте настоящего описания понятие "цитокин" относится к молекуле, которая опосредует и/или регулирует биологическую или клеточную функцию или процесс (например, иммунитет, воспаление и гематопоез). Понятие "цитокин" в контексте настоящего описания относится к "лимфокинам", "хемокинам", "монокинам" и "интерлейкинам". Примерами пригодных для применения цитокинов являются (но, не ограничиваясь только ими) GM-CSF, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , TGF- β , TNF- α и TNF- β . Конкретные цитокины представляют собой IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IFN- α и IFN- γ . В конкретных вариантах осуществления изобретения цитокин представляет собой человеческий цитокин. В контексте настоящего описания подразумевается также, что понятие "цитокин" включает также варианты цитокина, содержащие одну или несколько аминокислотных мутаций в аминокислотных последовательностях соответствующего цитокина дикого типа, такие, например, как варианты IL-2, описанные у Sauvé и др., Proc Natl Acad Sci USA 88, 1991, сс. 4636-4640; Hu и др., Blood 101, 2003, сс. 4853-4861 и в публикации патента США № 2003/0124678; у Shanafelt и др., Nature Biotechnol 18, 2000, сс. 1197-1202; Neaton и др., Cancer Res 53, 1993, сс. 2597-2602 и в US № 5229109; в публикации патента США № 2007/0036752; WO 2008/0034473; WO 2009/061853; или публикации PCT заявки на патент PCT/EP 2012/051991. Другие варианты цитокинов, например варианты IL-15, представлены в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления изобретения цитокины подвергали мутации для элиминации гликозилирования.

В контексте настоящего описания понятие "одноцепочечный" относится к молекуле, содержащей аминокислотные мономеры, связанные линейно посредством пептидных связей. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент представляет собой одноцепочечный эффекторный фрагмент. Примерами одноцепочечных эффекторных фрагментов являются (но не ограничиваясь только ими) цитокины, факторы роста, гормоны, ферменты, субстраты и кофакторы. Когда эффекторный фрагмент представляет собой цитокин, и представляющий собой интерес цитокин в норме в естественных условиях существует в виде мультимера, то каждая субъединица мультимерного цитокина последовательно кодируется одной цепью эффекторного фрагмента. Таким образом, примерами пригодных для применения одноцепочечных эффекторных фрагментов являются (но не ограничиваясь только ими) GM-CSF, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , TGF- β , TNF- α и TNF- β .

В контексте настоящего описания понятие "применяемый в качестве контроля эффекторный фрагмент" относится к неконъюгированному эффекторному фрагменту. Например, при осуществлении сравнения содержащего IL-2 иммуноконъюгата, предлагаемого в настоящем изобретении, и применяемого в качестве контроля эффекторного фрагмента, применяемый в качестве контроля эффекторный фрагмент представляет собой свободный неконъюгированный IL-2. Аналогично этому, например, при осуществле-

нии сравнения содержащего IL-12 иммуноконъюгата, предлагаемого в настоящем изобретении, и применяемого в качестве контроля эффекторного фрагмента, применяемый в качестве контроля эффекторный фрагмент представляет собой свободный неконъюгированный IL-12 (например, существующий в виде гетеродимерного белка, когда субъединицы p40 и p35 соединены только дисульфидной(ыми) связью(ями)).

В контексте настоящего описания понятие "рецептор эффекторного фрагмента" относится к полипептидной молекуле, которая обладает способностью специфически связываться с эффекторным фрагментом. Например, когда эффекторный фрагмент представляет собой IL-2, рецептор эффекторного фрагмента, который связывается с IL-2 (например, с иммуноконъюгатом, который содержит IL-2), представляет собой рецептор IL-2. Аналогично этому, например, когда IL-12 представляет собой эффекторный фрагмент иммуноконъюгата, то рецептором эффекторного фрагмента является рецептор IL-12. Когда рецепторный фрагмент специфически связывается более чем с одним рецептором, все рецепторы, которые специфически связываются с эффекторным фрагментом, представляют собой "рецепторы эффекторного фрагмента" для указанного эффекторного фрагмента.

Понятие "молекула иммуноглобулина" относится к белку, имеющему структуру встречающегося в естественных условиях антитела. Например, иммуноглобулины класса IgG представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины с молекулярной массой примерно 150000 Да, состоящие из двух легких цепей и двух тяжелых цепей, связанных дисульфидными мостиками. В направлении от N-конца к С-концу каждая тяжелая цепь содержит вариабельную область (VH), которую называют также вариабельным тяжелым доменом или вариабельным доменом тяжелой цепи, за которой расположены три константных домена (CH1, CH2 и CH3), которые называют также константной областью тяжелой цепи. Аналогично этому в направлении от N-конца к С-концу каждая легкая цепь содержит вариабельную область (VL), которую называют также вариабельным легким доменом или вариабельным доменом легкой цепи, за которой расположен константный домен легкой цепи (CL), который называют также константной областью легкой цепи. Тяжелая цепь иммуноглобулина может относиться к одному из пяти типов, обозначенных как α (IgA), δ (IgD), ϵ (IgE), γ (IgG) или μ (IgM), некоторые из которых дополнительно подразделяют на подтипы, например γ_1 (IgG₁), γ_2 (IgG₂), γ_3 (IgG₃), γ_4 (IgG₄), α_1 (IgA₁) и α_2 (IgA₂). Легкая цепь иммуноглобулина может относиться к одному из двух типов, обозначенных как каппа (κ) и лямбда (λ), на основе аминокислотной последовательности ее константного домена. Иммуноглобулин, как правило, состоит из двух молекул Fab и Fc-домена, которые соединены через шарнирную область иммуноглобулина.

В контексте настоящего описания понятие "антитело" используется в его наиболее широком смысле, и оно относится к различным структурам антител, включая (но, не ограничиваясь только ими) моноклональные антитела, поликлональные антитела и фрагменты антител, при условии, что они обладают требуемой антигенсвязывающей активностью.

Понятие "фрагмент антитела" относится к молекуле, отличной от интактного антитела, которая содержит часть интактного антитела, которая связывается с антигеном, с которым связывается интактное антитело. Примерами фрагментов антител являются (но, не ограничиваясь только ими) Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, димерные антитела, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител (например, scFv) и однодоменные антитела. Обзор некоторых фрагментов антител см., например, у Hudson и др., Nat. Med. 9, 2003, сс. 129-134. Обзор scFv-фрагментов см., например, у Plückthun в: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, т. 113, под ред. Rosenburg и Moore, изд-во Springer-Verlag, New York, 1994, сс. 269-315; см. также WO 93/16185; и US №№ 5571894 и 5587458. Обсуждение Fab- и F(ab')₂-фрагментов, содержащих остатки эпитопа, связывающегося с рецептором спасения, и обладающих удлинненным временем полужизни *in vivo*, см. в US № 5869046. Димерные антитела (диабоды) представляют собой фрагменты антител с двумя антигенсвязывающими сайтами, которые могут быть двухвалентными или биспецифическими (см., например, EP 404097; WO 1993/01161; Hudson и др., Nat. Med. 9, 2003, сс. 129-134; и Hollinger и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1993, сс. 6444-6448. Тримерные (триабоды) и тетрамерные (тетрабоды) антитела описаны также у Hudson и др., Nat. Med. 9, 2003, сс. 129-134. Однодоменные антитела представляют собой фрагменты антител, содержащие весь или часть вариабельного домена тяжелой цепи или весь или часть вариабельного домена легкой цепи антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения однодоменное антитело представляет собой человеческое однодоменное антитело (фирма Domantis, Inc., Waltham M.A.; см., например, US № 6248516 B1). Фрагменты антител можно создавать с помощью различных методик, включая (но не ограничиваясь только ими) протеолитическое расщепление интактного антитела, а также получать с использованием рекомбинантных клеток-хозяев (например, E. coli или фага), как указано в настоящем описании.

Понятие "антигенсвязывающий домен" относится к части антитела, которая содержит область, специфически связывающуюся и являющуюся комплементарной части антигена или полному антигену. Антигенсвязывающий домен может представлять собой, например, один или несколько вариабельных доменов антитела (которые называют также вариабельными областями антитела). Предпочтительно антигенсвязывающий домен содержит вариабельную область легкой цепи (VL) антитела и вариабельную об-

ласть тяжелой цепи (VH) антитела.

Понятие "вариабельная область" или "вариабельный домен" относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, который участвует в связывании антитела с антигеном. Вариабельные домены тяжелой цепи и легкой цепи (VH и VL соответственно) нативного антитела, как правило, имеют сходные структуры, при этом каждый домен содержит четыре консервативных каркасных участка (FR) и три гипервариабельных участка (HVR) (см., например, Kindt и др., *Kuby Immunology*, 6 изд., изд-во W.H. Freeman and Co., 2007, с. 91). Одного VH- или VL-домена может быть достаточно для обеспечения специфичности связывания антигена.

Понятие "гипервариабельный участок" или "HVR" в контексте настоящего описания относится к каждому из участков вариабельного домена антитела, последовательности которых являются гипервариабельными, и/или которые образуют структуры в виде петель ("гипервариабельные петли"). Как правило, нативные четырехцепочечные антитела содержат шесть HVR; три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). HVR, как правило, содержат аминокислотные остатки из гипервариабельных петель и/или из "определяющих комплементарность участков" (CDR), последние отличаются наиболее выраженной вариабельностью последовательности и/или участвуют в распознавании антигенов. Кроме CDR1, присутствующего в VH, CDR, как правило, содержат аминокислотные остатки, которые образуют гипервариабельные петли. Понятие "гипервариабельные участки" (HVR) относится также к "определяющим комплементарность участкам" (CDR), и в контексте настоящего описания эти понятия используются взаимозаменяемо касательно положений вариабельной области, которые формируют антигенсвязывающие области. Эта конкретная область описана у Kabat и др., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 1983 и у Chothia и др., *J. Mol. Biol.* 196, 1987, сс. 901-917, причем эти определения относятся к перекрывающимся аминокислотным остаткам или поднаборам аминокислотных остатков при их сравнении друг с другом. Однако в контексте настоящего описания подразумевается возможность применения любого определения CDR антитела или его вариантов. Соответствующие аминокислотные остатки, из которых состоят CDR, как они определены в каждой из процитированных выше ссылок, представлены в сравнении ниже в табл. 1. Точные номера остатков, которые образуют конкретный CDR, должны варьироваться в зависимости от последовательности и размера CDR. Специалисты в данной области на основе данных об аминокислотной последовательности вариабельной области антитела легко могут определять, какие остатки входят в конкретный CDR.

Таблица 1

Определения CDR ¹			
	Кэбот	Хотиа	AbM ²
V _H CDR1	31-35	26-32	26-35
V _H CDR2	50-65	52-58	50-58
V _H CDR3	95-102	95-102	95-102
V _L CDR1	24-34	26-32	24-32
V _L CDR2	50-56	50-52	50-56
V _L CDR3	89-97	91-96	89-97

¹Нумерация всех входящих в CDR остатков в табл. 1 дана в соответствии с номенклатурой, предложенной Кэботом с соавторами (см. ниже).

²Обозначение "AbM" с прописной буквой "b", использованное в табл. 1, относится к CDR, как они определены программой для моделирования антител "AbM" компании Oxford Molecular Group.

Кэбот с соавторами предложили также систему нумерации (номенклатуру) последовательностей вариабельных областей, которую можно применять для любого антитела. Обычный специалист в данной области может однозначно применять эту систему "нумерации по Кэботу" к любой последовательности вариабельной области, не имея никаких экспериментальных данных, кроме сведений о самой последовательности. В контексте настоящего описания понятие "нумерация по Кэботу" относится к системе нумерации, описанной у Kabat и др., "Sequence of Proteins of Immunological Interest", изд-во U.S. Dept. of Health and Human Services, 1983. Если не указано иное, то ссылки на нумерацию положений конкретных аминокислотных остатков в вариабельной области антитела даны в соответствии с системой нумерации по Кэботу.

Нумерация полипептидных последовательностей в "Перечне последовательностей" (т.е. SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29, 31 и т.д.) не представляет собой нумерацию в соответствии с системой Кэбота. Однако в компетенции обычного специалиста в данной области является превращение нумерации последовательностей в "Перечне последовательностей" в нумерацию по Кэботу.

"Каркасные участки" или "FR"-участки представляют собой участки вариабельных доменов, отличные от остатков гипервариабельных участков (HVR). FR вариабельного домена, как правило, представлены четырьмя FR-доменами: FR1, FR2, FR3 и FR4. Таким образом, последовательности HVR и FR, как

правило, расположены в VH (или VL) в следующем порядке: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Понятие "класс" антитела или иммуноглобулина относится к типу константного домена или константной области, содержащейся в тяжелой цепи. Существует пять основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, а некоторые из них можно дополнительно подразделять на подклассы (изотипы), например IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ и IgA₂. Константные домены тяжелых цепей, соответствующие различным классам иммуноглобулинов, обозначают как α , δ , ϵ , γ и μ соответственно.

В контексте настоящего описания понятие "Fc-домен" или "Fc-область" относится к C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Понятие относится к нативной последовательности Fc-областей и вариантам Fc-областей. Хотя пограничные последовательности Fc-области в тяжелой цепи IgG могут слегка варьироваться, как правило, Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG простирается от Cys226 или от Pro30 до карбоксильного конца тяжелой цепи. Однако C-концевой лизин (Lys447) Fc-области может либо присутствовать, либо отсутствовать. Если специально не указано иное, то нумерация аминокислотных остатков в Fc-области или константном участке соответствует системе EU-нумерации, которую называют также EU-индекс, описанной у Kabat и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5 изд., изд-во Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991. Понятие "субъединица" Fc-домена в контексте настоящего описания относится к одному из двух полипептидов, образующих димерный Fc-домен, т.е. к полипептиду, который содержит C-концевые константные области тяжелой цепи иммуноглобулина, обладающие способностью к стабильной самоассоциации. Например, субъединица Fc-домена IgG содержит константный домен CH2 IgG и CH3 IgG.

"Модификация, усиливающая гетеродимеризацию" представляет собой манипуляцию с пептидным каркасом или посттрансляционные модификации полипептида, которая уменьшает или препятствует ассоциации полипептида с идентичным полипептидом с образованием гомодимера. В контексте настоящего описания модификация, усиливающая гетеродимеризацию, включает, прежде всего, различные модификации, осуществляемые с каждым из двух полипептидов, которые требуются для образования димера, при этом модификации дополняют друг друга таким образом, чтобы усиливать ассоциацию двух полипептидов. Например, модификация, усиливающая гетеродимеризацию, может изменять структуру или заряд одного или обоих полипептидов, требуемых для образования димера, таким образом, чтобы улучшать их ассоциацию стерически или электростатически соответственно.

Гетеродимеризация имеет место между двумя неидентичными полипептидами, такими как две субъединицы Fc-домена, при этом дополнительные компоненты иммуноконъюгата слитых друг с другом субъединиц (например, антигенсвязывающего фрагмента, эффекторного фрагмента) не являются одинаковыми. В иммуноконъюгатах, предлагаемых в настоящем изобретении, модификация, усиливающая гетеродимеризацию, затрагивает Fc-домен. В некоторых вариантах осуществления изобретения модификация, усиливающая гетеродимеризацию, представляет собой аминокислотную мутацию, в частности аминокислотную замену. В конкретном варианте осуществления изобретения модификация, усиливающая гетеродимеризацию, представляет собой индивидуальную аминокислотную мутацию, в частности аминокислотную замену, в каждой из двух субъединиц Fc-домена.

Понятие "эффекторные функции", используемое в настоящем описании, относится к видам биологической активности, присущим Fc-области антитела, которые варьируются в зависимости от изотипа антитела. Примерами эффекторных функций антитела являются способность связываться с C1q и комплементзависимая цитотоксичность (CDC), способность связываться с Fc-рецептором, антителообусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC), антителообусловленный клеточнозависимый фагоцитоз (ADCP), секреция цитокинов, опосредованное иммунным комплексом поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками, понижающая регуляция рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора); и активация B-клеток.

В контексте настоящего описания подразумевается, что понятия "конструирование, сконструированный, инженерия" включают любую манипуляцию с пептидным каркасом или посттрансляционные модификации встречающегося в естественных условиях или рекомбинантного полипептида или его фрагмента. Инженерия включает модификации аминокислотной последовательности, схемы гликозилирования или группы боковых цепей индивидуальных аминокислот, а также комбинации указанных подходов.

Инженерия прежде всего с приставкой "глико", а также "инженерия гликозилирования (гликоинженерия)" (конструирование схемы гликозилирования) включает метаболическое конструирование механизма гликозилирования клетки, в том числе генетические манипуляции, касающиеся путей олигосахаридного синтеза, с целью получения измененного гликозилирования гликопротеинов, экспрессируемых в клетках. Кроме того, конструирование схемы гликозилирования включает воздействия мутаций и клеточного окружения на гликозилирование. В одном из вариантов осуществления изобретения гликоинженерию осуществляют с целью изменения гликозилтрансферазной активности. В конкретном варианте осуществления изобретения инженерия позволяет изменять активность глюкозаминилтрансферазы и/или активность фукозилтрансферазы. Гликоинженерию можно использовать для получения "клетки-хозяина, обладающей повышенной GnTIII-активностью", "клетки-хозяина, обладающей повышенной ManII-

активностью" или "клетки-хозяина, обладающей повышенной $\alpha(1,6)$ фукозилтрансферазной активностью".

В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие "аминокислотная мутация" относится к аминокислотным заменам, делециям, инсерциям и модификациям. Можно применять любую комбинацию замены, делеции, инсерции и модификации для создания конечной конструкции при условии, что конечная конструкция обладает требуемыми характеристиками, например пониженной способностью связываться с Fc-рецептором или пониженной способностью связываться с CD25. Аминокислотная последовательность с делециями и инсерциями включает аминокислоты и/или карбоксиконцевые делеции и инсерции аминокислот. Конкретными аминокислотными мутациями являются аминокислотные замены. Для изменения, например, характеристик связывания с Fc-областью или цитокином, таким как IL-2, наиболее предпочтительными являются неконсервативные аминокислотные замены, т.е. замена одной аминокислоты на другую аминокислоту, имеющую другие структурные и/или химические свойства. Аминокислотные замены включают замену на не встречающиеся в естественных условиях аминокислоты или на производные встречающихся в естественных условиях двадцати стандартных аминокислот (например, на 4-гидроксипролин, 3-метилгистидин, орнитин, гомосерин, 5-гидроксилизин). Аминокислотные мутации можно создавать с помощью генетических или химических методов, хорошо известных в данной области. Генетические методы могут включать сайтнаправленный мутагенез, ПЦР, синтез генов и т.п. Подразумевается, что можно применять также методы изменения боковой группы аминокислоты, отличные от методов генетической инженерии, такие как химическая модификация. Для обозначения одной и той же аминокислотной мутации можно использовать различные обозначения. Например, замену пролина в положении 329 Fc-домена на глицин можно обозначать как 329G, G329, G₃₂₉, P329G или Pro329Gly.

В контексте настоящего описания понятие "полипептид" относится к молекуле, состоящей из мономеров (аминокислот), линейно связанных амидными связями (которые обозначают также как пептидные связи). Понятие "полипептид" относится к любой цепи, состоящей из двух или большего количества аминокислот, и не подразумевает, что продукт имеет конкретную длину. Так, пептиды, дипептиды, трипептиды, олигопептиды, "белок", "аминокислотная цепь" или любое иное принятое понятие, относящееся к цепи, состоящей из двух или большего количества аминокислот, все подпадают под определение "полипептид", и понятие "полипептид" можно применять вместо или взаимозаменяемо с любым из указанных понятий. Подразумевается также, что понятие "полипептид" относится к продуктам, которые несут постэкспрессионные модификации полипептида, включая (но не ограничиваясь только ими) гликозилирование, ацетилирование, фосфорилирование, амидирование, дериватизацию с использованием известных защитных/блокирующих групп, протеолитическое расщепление или модификацию с помощью не встречающихся в естественных условиях аминокислот. Полипептид можно получать из встречающегося в естественных условиях биологического источника или можно получать с помощью технологии рекомбинантной ДНК, и его не обязательно транслировать с созданной нуклеотидной последовательности. Его можно создавать любым путем, включая химический синтез. Полипептид, предлагаемый в изобретении, может состоять примерно из 3 или более, 5 или более, 10 или более, 20 или более, 25 или более, 50 или более, 75 или более, 100 или более, 200 или более, 500 или более, 1000 или более или 2000 или более аминокислот. Полипептиды могут иметь различную трехмерную структуру, хотя они необязательно должны иметь указанную структуру. Полипептиды с определенной трехмерной структурой обозначают как полипептиды, имеющие укладку, а полипептиды, которые не обладают определенной трехмерной структурой, но которые легче могут адаптироваться к большому количеству различных конформаций, обозначают как полипептиды, не имеющие укладку.

Под "выделенным" полипептидом или его вариантом, или производным подразумевают полипептид, который не находится в его естественном окружении. При этом не требуется какого-то конкретного уровня очистки. Например, выделенный полипептид можно удалять из его нативного или естественного окружения. Полученные путем рекомбинации полипептиды и белки, экспрессируемые в клетках-хозяевах, рассматриваются как выделенные для целей настоящего изобретения, если они представляют собой нативные или рекомбинантные полипептиды, которые отделены, фракционированы или частично или полностью очищены с помощью любого приемлемого метода.

"Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" относительно полипептидной референс-последовательности определяют как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в полипептидной референс-последовательности, после выравнивания последовательностей и интродукции при необходимости брешей для достижения максимального процента идентичности последовательностей, и при этом какие-либо консервативные замены не учитываются при оценке идентичности последовательностей. Сравнительный анализ для определения процента идентичности аминокислотных последовательностей можно осуществлять различными путями, которые находятся в компетенции специалиста в данной области, например, с использованием публично доступных компьютерных программ, таких как программа BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определять соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Однако для целей на-

стоящего изобретения величину % идентичности аминокислотных последовательностей получают с использованием предназначенной для сравнения последовательностей компьютерной программы ALIGN-2. Предназначенная для сравнения последовательностей компьютерная программа ALIGN-2 разработана фирмой Genentech, Inc., и исходный код помещен на хранение вместе с документацией для пользователя в U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, где он зарегистрирован под регистрационным номером U.S. Copyright Registration № TXU510087. Программа ALIGN-2 представляет собой публично доступную программу фирмы Genentech, Inc., Южный Сан-Франциско, шт. Калифорния, или ее можно компилировать из исходного кода. Программу ALIGN-2 можно компилировать для применения в операционной системе UNIX, включая цифровую версию UNIX V4.0D. В программе ALIGN-2 все параметры для сравнения последовательностей являются заданными и не должны изменяться. В ситуациях, когда ALIGN-2 применяют для сравнения аминокислотных последовательностей, % идентичности аминокислотных последовательностей данной аминокислотной последовательности А относительно или по сравнению с данной аминокислотной последовательностью Б (которую другими словами можно обозначать как данная аминокислотная последовательность А, которая имеет или отличается определенным % идентичности аминокислотной последовательности относительно или по сравнению с данной аминокислотной последовательностью Б), рассчитывают следующим образом:

$$100 \times \text{частное } X/Y,$$

где X обозначает количество аминокислотных остатков, оцененных программой сравнительного анализа последовательностей ALIGN-2 как идентичные совпадения при сравнительном анализе последовательностей А и Б с помощью указанной программы, и где Y обозначает общее количество аминокислотных остатков в Б. Должно быть очевидно, что, когда длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности Б, то % идентичности аминокислотной последовательности А относительно аминокислотной последовательности Б не должен быть равен % идентичности аминокислотной последовательности Б относительно аминокислотной последовательности А. Если специально не указано иное, то в контексте настоящего описания все величины % идентичности аминокислотных последовательностей получают согласно процедуре, описанной в последнем из предшествующих параграфов, с помощью компьютерной программы ALIGN-2.

Понятие "полинуклеотид" относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты или конструкции, например матричной РНК (мРНК), РНК вирусного происхождения или плазмидной ДНК (пДНК). Полинуклеотид может содержать обычную фосфодиэфирную связь или не традиционную связь (например, амидную связь, такую, которая присутствует в пептидных нуклеиновых кислотах (ПНК)). Понятие "молекула нуклеиновой кислоты" относится к любому одному или нескольким сегментам нуклеиновой кислоты, например фрагментам ДНК или РНК, присутствующим в полинуклеотиде.

Под "выделенной" молекулой нуклеиновой кислоты или полинуклеотидом подразумевается молекула нуклеиновой кислоты, т.е. ДНК или РНК, которая отделена от ее нативного окружения. Например, рекомбинантный полинуклеотид, кодирующий входящий в вектор терапевтический полипептид, рассматривается как выделенный для целей настоящего изобретения. Другими примерами выделенного полинуклеотида являются рекомбинантные полинуклеотиды, присутствующие в гетерологичных клетках-хозяевах, или очищенные (частично или полностью) полинуклеотиды, находящиеся в растворе. Выделенный полинуклеотид включает молекулу полинуклеотида, входящую в клетки, которые в норме содержат молекулу полинуклеотида, но молекула полинуклеотида присутствует вне хромосомы или имеет локализацию в хромосоме, отличную от ее локализации в хромосоме в естественных условиях.

Выделенные молекулы РНК включают полученные *in vivo* или *in vitro* РНК-транскрипты, предлагаемые в настоящем изобретении, а также формы с позитивной и негативной цепью и двухцепочечные формы. Выделенные полинуклеотиды или нуклеиновые кислоты, предлагаемые в настоящем изобретении, включают также указанные молекулы, полученные с помощью синтеза. Кроме того, полинуклеотид или нуклеиновая кислота может представлять собой или может включать регуляторный элемент, такой как промотор, сайт связывания рибосом или терминатор транскрипции.

Под нуклеиновой кислотой или полинуклеотидом, имеющей/имеющим нуклеотидную последовательность, которая, например, на 95% "идентична" нуклеотидной референс-последовательности, предлагаемой в настоящем изобретении, подразумевается, что нуклеотидная последовательность полинуклеотида идентична референс-последовательности за исключением того, что полинуклеотидная последовательность может включать вплоть до 5 точечных мутаций на каждые 100 нуклеотидов нуклеотидной референс-последовательности. Другими словами, для получения полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, которая идентична по меньшей мере на 95% нуклеотидной референс-последовательности, вплоть до 5% нуклеотидов в референс-последовательности можно изымать путем делеции или заменять на другой нуклеотид, или вплоть до 5% нуклеотидов от общего количества нуклеотидов в референс-последовательности можно встраивать в референс-последовательность. Эти изменения референс-последовательности могут иметь место в положениях на 5'- или 3'-конце нуклеотидной референс-последовательности или в ином положении между этими концевыми положениями, и их встраивают либо индивидуально между остатками в референс-последовательности, либо их встраивают в

референс-последовательность в виде одной или нескольких смежных групп. На практике решение вопроса о том, идентична ли конкретная полинуклеотидная последовательность по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% нуклеотидной последовательности, предлагаемой в настоящем изобретении, можно решать, как правило, с использованием известных компьютерных программ, например указанных выше для полипептидов (например, ALIGN-2).

Понятие "кассета экспрессии" относится к полинуклеотиду, полученному с помощью рекомбинации или синтеза, который содержит серии специфических нуклеотидных элементов, которые обеспечивают транскрипцию конкретной нуклеиновой кислоты в клетке-мишени. Рекombинантную кассету экспрессии можно встраивать в плазмиду, хромосому, митохондриальную ДНК, плазмидную ДНК, вирус или фрагмент нуклеиновой кислоты. Как правило, рекombинантная кассета экспрессии, представляющая собой часть экспрессионного вектора, включает среди прочих последовательностей подлежащую транскрипции нуклеотидную последовательность и промотор. В некоторых вариантах осуществления изобретения кассета экспрессии, предлагаемая в изобретении, содержит полинуклеотидные последовательности, которые кодируют иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, или их фрагменты.

Понятие "вектор" или "экспрессионный вектор" является синонимом понятия "экспрессионная конструкция" и относится к молекуле ДНК, которую применяют для интродукции и обеспечения экспрессии конкретного гена, с которой он функционально связан в клетке-мишени. Понятие включает вектор, представляющий собой самореплицирующуюся структуру нуклеиновой кислоты, а также вектор, встроенный в геном клетки-хозяина, в которую он интродуцирован. Экспрессионный вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, содержит кассету экспрессии. Экспрессионные векторы позволяют осуществлять транскрипцию стабильной мРНК в больших количествах. Когда экспрессионный вектор находится внутри клетки-мишени, то молекула рибонуклеиновой кислоты или белок, который кодируется геном, продуцируется в результате клеточного механизма транскрипции и/или трансляции. В одном из вариантов осуществления изобретения экспрессионный вектор, предлагаемый в изобретении, содержит кассету экспрессии, которая включает полинуклеотидные последовательности, которые кодируют иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, или их фрагменты.

Понятие "искусственный" относится к синтетической или не полученной из клетки-хозяина композиции, например к синтезированному химически олигонуклеотиду.

В контексте настоящего описания понятия "клетка-хозяин", "клеточная линия-хозяин" и "клеточная культура-хозяин" используются взаимозаменяемо, и они относятся к клеткам, в которые интродуцирована экзогенная нуклеиновая кислота, включая потомство указанных клеток. К клеткам-хозяевам относятся "трансформанты" и "трансформированные клетки", которые включают первичные трансформированные клетки, а также потомство, выведенное из них, независимо от количества пересевов. Потомство может не быть строго идентичным родительской клетке по составу нуклеиновых кислот, а может нести мутации. Под данное понятие подпадает мутантное потомство, которое обладает такой же функцией или биологической активностью, что и отобранная путем скрининга или селекции исходная трансформированная клетка. Клетка-хозяин представляет собой клеточную систему любого типа, которую можно применять для создания иммуноконъюгатов, предлагаемых в настоящем изобретении. В одном из вариантов осуществления изобретения клетку-хозяин конструируют так, чтобы можно было получать иммуноконъюгат с модифицированными олигосахаридами в его Fc-области. В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки-хозяева можно подвергать манипуляциям для экспрессии повышенных уровней одного или нескольких полипептидов, обладающих активностью $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозамилтрансферазы III (GnTIII). В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки-хозяева подвергают дополнительным манипуляциям для экспрессии повышенных уровней одного или нескольких полипептидов, обладающих активностью α -маннозидазы II (ManII). Клетки-хозяева включают культивируемые клетки, например, культивируемые клетки млекопитающих, такие как (но не ограничиваясь только ими) CHO-клетки, BHK-клетки, NSO-клетки, SP2/0-клетки, клетки миеломы линии YO, клетки мышины миеломы линии P3X63, PER-клетки, PER.C6-клетки или клетки гибридомы, клетки дрожжей, клетки насекомых и клетки растений, но также клетки, находящиеся в трансгенном животном, трансгенном растении или в культивируемой растительной или животной ткани.

В контексте настоящего описания понятие "полипептид, обладающий GnTIII-активностью" относится к полипептидам, которые обладают способностью катализировать добавление остатка N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) в β -1-4-связи к β -связанному маннозиду триманнозильного ядра N-связанных олигосахаридов. Понятие относится к слитым полипептидам, которые обладают ферментативной активностью, подобной, но не обязательно идентичной активности $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III, также известной под названием β -1,4-маннозил-гликопротеин-4- β -N-ацетилглюкозаминилтрансфераза (КФ 2.4.1.144) согласно номенклатуре Комитета Международного союза по биохимии и молекулярной биологии (Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)), при оценке с помощью конкретного биологического анализа как в случае зависимости от дозы, так и без зависимости от дозы. В случае, когда существует зависимость от дозы, фермент не должен быть обязательно идентичен GnTIII, а скорее он должен быть практически подобен

ей в отношении зависимости данной активности от дозы по сравнению с GnTIII (т.е. полипептид-"кандидат" должен обладать более высокой активностью или не более чем примерно в 25 раз пониженной активностью, предпочтительно не более чем примерно в 10 раз пониженной активностью, и еще более предпочтительно не более чем примерно в 3 раза пониженной активностью по сравнению с GnTIII). В конкретных вариантах осуществления изобретения полипептид, обладающий GnTIII-активностью, представляет собой слитый полипептид, содержащий каталитический домен GnTIII и домен локализации в комплексе Гольджи гетерологичного полипептида, присутствующего в комплексе Гольджи. В частности, домен локализации в комплексе Гольджи представляет собой домен локализации маннозидазы II или GnTI, наиболее предпочтительно домен локализации маннозидазы II. Альтернативно этому, домен локализации в комплексе Гольджи выбирают из группы, включающей домен локализации маннозидазы I, домен локализации GnTII и домен коровой α 1,6-фукозилтрансферазы. Методы создания указанных слитых полипептидов и их применение для получения антител с повышенными эффекторными функциями описаны в WO 2004/065540, предварительной заявке на патент США № 60/495142 и в публикации заявки на патент США № 2004/0241817, полное содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки.

В контексте настоящего описания понятие "домен локализации в комплексе Гольджи" относится к аминокислотной последовательности расположенного в комплексе Гольджи полипептида, который ответствен за "заякоривание" полипептида в области, находящейся внутри комплекса Гольджи. Как правило, домены локализации содержат аминоконцевые "хвосты" фермента.

В контексте настоящего описания понятие "полипептид, обладающий ManII-активностью" относится к полипептидам, которые обладают способностью катализировать гидролиз концевых 1,3- и 1,6-связанных остатков α -D-маннозы в разветвленном промежуточном продукте, т.е. GlcNAcMan₅GlcNAc₂-маннозе, N-связанных олигосахаридов. Они включают полипептиды, которые обладают ферментативной активностью, сходной, но не обязательно идентичной с активностью α -маннозидазы II комплекса Гольджи, известной также как маннозилполисахарид 1,3-1,6- α -маннозидаза II (КФ 3.2.1.114) согласно номенклатуре Комитета Международного союза по биохимии и молекулярной биологии (NC-IUBMB).

"Активирующий Fc-рецептор" представляет собой Fc-рецептор, который после взаимодействия с Fc-областью антитела (или иммуноконъюгата) осуществляет процесс передачи сигналов, которые стимулируют несущую рецептор клетку осуществлять эффекторные функции. Активирующие Fc-рецепторы включают Fc γ RIIIa (CD 16a), Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIa (CD32) и Fc α RI (CD89).

Антителообусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (ADCC) представляет собой иммунный механизм, приводящий к лизису сенсibilизированных антителом клеток-мишеней иммунными эффекторными клетками. Клетки-мишени представляют собой клетки, с которыми антитела, иммуноконъюгаты или их фрагменты, содержащие Fc-область, специфически связываются, как правило, через область белка, которая является N-концевой относительно Fc-области. В контексте настоящего описания понятие "повышенная ADCC" относится либо к увеличению количества лизированных в данный момент времени клеток-мишеней при данной концентрации иммуноконъюгата в среде, окружающей клетки-мишени, путем указанного выше механизма ADCC, и/или к снижению концентрации иммуноконъюгата в среде, окружающей клетки-мишени, необходимой для достижения лизиса данного количества клеток-мишеней в данное время с помощью механизма ADCC. Повышение ADCC-активности сравнивают относительно ADCC, опосредуемой таким же иммуноконъюгатом, который получен с помощью такого же типа клеток-хозяев с использованием одинаковых стандартных методов получения, очистки, приготовления композиций и хранения (которые известны специалистам в данной области), но которые не подвергали инженерии. Например, повышение ADCC, опосредуемой иммуноконъюгатом, полученным в клетках-хозяевах, сконструированных так, чтобы они имели измененную схему гликозилирования (например, так, чтобы они экспрессировали гликозилтрансферазу, GnTIII или другие гликозилтрансферазы), с помощью методов, указанных в настоящем описании, сравнивают с ADCC, опосредуемой таким же иммуноконъюгатом, полученным с помощью такого же типа не подвергнутых инженерии клеток-хозяев.

Под "иммуноконъюгатом, обладающим повышенной антителообусловленной клеточнозависимой цитотоксичностью (ADCC)" подразумевается иммуноконъюгат, обладающий повышенной ADCC при определении с помощью любого приемлемого метода, известного обычным специалистам в данной области. Один из приемлемых методов анализа *in vitro* ADCC заключается в том, что

1) для анализа применяют клетки-мишени, для которых известно, что они экспрессируют антиген-мишень, распознаваемый антигенсвязывающим фрагментом иммуноконъюгата;

2) для анализа в качестве эффекторных клеток используют человеческие мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), выделенные из крови произвольно выбранных здоровых доноров;

3) анализ осуществляют с помощью следующего протокола:

I) PBMC выделяют с помощью стандартных методов центрифугирования в градиенте плотности и суспендируют 5×10^6 клеток/мл в RPMI-среде для культуры клеток;

II) выращивают клетки-мишени с помощью стандартных методов культивирования тканей, собирают на экспоненциальной фазе роста, когда жизнеспособность составляет более 90%, промывают в

RPMI-среде для культуры клеток, меченной 100 мкКи ^{51}Cr , дважды промывают с помощью среды для культуры клеток и ресуспендируют в среде для культуры клеток с плотностью 10^5 клеток/мл;

III) переносят по 100 мкл указанной выше конечной суспензии клеток-мишеней в каждую лунку 96-луночного титрационного микропланшета;

IV) готовят серийные разведения с концентрацией иммуноконъюгата от 4000 до 0,04 нг/мл в среде для культуры клеток и добавляют 50 мкл образовавшихся растворов иммуноконъюгатов к клеткам-мишеням в 96-луночном титрационном микропланшете, оценивая в трех повторностях различные концентрации антител, охватывающие весь указанный выше диапазон концентраций;

V) для создания контролей с максимальным высвобождением (MR) используют 3 дополнительные лунки в планшете, которые содержат меченые клетки-мишени, с добавлением 50 мкл 2 об.% водного раствора неионогенного детергента (Nonidet, фирма Sigma, Сент-Луис), вместо раствора иммуноконъюгата (указанного в п.IV, выше);

VI) для создания контролей со спонтанным высвобождением (SR), используют 3 дополнительные лунки в планшете, которые содержат меченые клетки-мишени, с добавлением 50 мкл RPMI-среды для культуры клеток вместо раствора иммуноконъюгата (указанного в п.IV, выше);

VII) затем 96-луночный титрационный микропланшет центрифугируют при $50\times g$ в течение 1 мин и инкубируют в течение 1 ч при 4°C ;

VIII) добавляют в каждую лунку по 50 мкл суспензии PBMC (указанной в п.I, выше), получая соотношение эффекторных клеток:клетки-мишени 25:1, и планшеты помещают в инкубатор в атмосферу, содержащую 5% CO_2 , и выдерживают при 37°C в течение 4 ч;

IX) собирают бесклеточный супернатант из каждой лунки и количественно оценивают выделенную в процессе эксперимента радиоактивность (ER) с помощью счетчика γ -лучей;

X) рассчитывают процент специфического лизиса для каждой концентрации иммуноконъюгата согласно формуле $(\text{ER}-\text{MR})/(\text{MR}-\text{SR})\times 100$, где ER обозначает среднюю радиоактивность, рассчитанную (см. п.IX, выше) для указанной концентрации иммуноконъюгата, MR означает среднюю радиоактивность, рассчитанную (см. п.IX, выше) для MR-контролей (см. п.V, выше), а SR означает среднюю радиоактивность, рассчитанную (см. п.IX, выше) для SR-контролей (см. п.VI, выше);

4) "повышенную ADCC" определяют либо как увеличение максимального процента специфического лизиса, обнаруженного для указанного выше диапазона концентраций иммуноконъюгата, и/или как снижение концентрации иммуноконъюгата, необходимой для достижения половины от максимального процента специфического лизиса, обнаруженного для указанного выше диапазона концентраций иммуноконъюгата. Повышение ADCC оценивают относительно измеренной тем же самым методом ADCC, опосредованной таким же иммуноконъюгатом, продуцированным в том же типе клеток-хозяев, с использованием одних и тех же стандартных методов получения, очистки, приготовления композиций и хранения, которые хорошо известны специалистам в данной области, но который не продуцировался клеткой-хозяином, подвергнутой инженерии.

Понятие "эффективное количество" агента относится к количеству, необходимому для обеспечения физиологического изменения в клетке или ткани, в которую его вводят.

Понятие "терапевтически эффективное количество" агента, например фармацевтической композиции, относится к количеству, эффективному при применении в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения требуемого терапевтического или профилактического результата. Терапевтически эффективное количество агента, например, элиминирует, снижает, замедляет, минимизирует или предупреждает нежелательные явления заболевания.

"Индивидуум" или "субъект" представляет собой млекопитающее. Млекопитающие представляют собой (но не ограничиваясь только ими) одомашненных животных (например, коровы, овцы, кошки, собаки и лошади), приматов (например, люди и приматы, кроме человека, такие как мартышки), кроликов и грызунов (например, мыши и крысы). Предпочтительно индивидуум или субъект представляет собой человека.

Понятие "фармацевтическая композиция" относится к препарату, который находится в такой форме, что он обеспечивает биологическую активность входящего в его состав действующего вещества, которое должно обладать эффективностью, и который не содержит дополнительных компонентов, которые обладают неприемлемой токсичностью для индивидуума, которому следует вводить композицию.

"Фармацевтически приемлемый носитель" относится к ингредиенту в фармацевтической композиции, отличному от действующего вещества, который является нетоксичным для индивидуума. Фармацевтически приемлемые носители включают (но не ограничиваясь только ими) буфер, эксципиент, стабилизатор или консервант.

В контексте настоящего описания понятие "лечение" (и его грамматические вариации, такие как "лечить" или "процесс лечения") относится к клиническому вмешательству с целью изменения естественного течения болезни у индивидуума, подлежащего лечению, и его можно осуществлять либо для профилактики или в процессе развития клинической патологии. Требуемыми действиями лечения являются (но не ограничиваясь только ими) предупреждение возникновения или рецидива болезни, облегче-

ние симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий болезни, предупреждение метастазов, снижение скорости развития болезни, облегчение или временное ослабление болезненного состояния и ремиссия или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, применяют для задержки развития болезни или замедления прогрессирования болезни.

Понятие "листовка-вкладыш в упаковку" в контексте настоящего описания относится к инструкциям, которые обычно помещают в поступающие в продажу упаковки терапевтических продуктов, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозе, пути введения, комбинированной терапии, противопоказаниях и/или мерах предосторожности при применении указанных терапевтических продуктов.

Подробное описание вариантов осуществления изобретения

Первым объектом изобретения является иммуноконъюгат, который содержит первый антигенсвязывающий фрагмент, Fc-домен, состоящий из двух субъединиц, и эффекторный фрагмент, в котором не может присутствовать более одного эффекторного фрагмента. Отсутствие дополнительных эффекторных фрагментов может снижать направленный перенос иммуноконъюгата к областям, в которых присутствует рецептор соответствующего эффекторного фрагмента, что повышает направленный перенос и накопление в областях, в которых присутствует фактический антиген-мишень иммуноконъюгата, который распознается антигенсвязывающим фрагментом. Кроме того, отсутствие явления авидности касательно рецептора соответствующего эффекторного фрагмента может снижать активацию клеток, позитивных по рецептору эффекторного фрагмента в периферической крови при внутривенном введении иммуноконъюгата. Кроме того, время полужизни в сыворотке иммуноконъюгатов, которые содержат только один эффекторный фрагмент, вероятно, длиннее по сравнению с иммуноконъюгатами, содержащими два или большее количество эффекторных фрагментов.

Форматы иммуноконъюгатов

Компоненты иммуноконъюгата можно сливать друг с другом в различных конфигурациях. Примеры конфигураций представлены на фиг. 2. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент сливают с амино- или карбоксиконцевой аминокислотой одной из двух субъединиц Fc-домена. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент сливают с карбоксиконцевой аминокислотой одной из двух субъединиц Fc-домена. Эффекторный фрагмент можно сливать с Fc-доменом непосредственно или через линкерный пептид, содержащий одну или несколько аминокислот, как правило, примерно 2-20 аминокислот. Линкерные пептиды известны в данной области или представлены в настоящем описании. Приемлемыми неиммуногенными линкерными пептидами являются, например, линкерные пептиды $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$ или $G_4(SG_4)_n$, в которых n обозначает число, как правило, от 1 до 10, как правило, от 2 до 4. Альтернативно этому, если эффекторную молекулу связывают с N-концом субъединицы Fc-домена, то ее можно связывать через шарнирную область иммуноглобулина или ее часть с помощью дополнительного линкерного пептида или без него.

Аналогично этому, первый антигенсвязывающий домен можно сливать с амино- или карбоксиконцевой аминокислотой одной из двух субъединиц Fc-домена. В одном из вариантов осуществления изобретения первый антигенсвязывающий фрагмент сливают с аминоконцевой аминокислотой одной из двух субъединиц Fc-домена. Первый антигенсвязывающий фрагмент можно сливать с Fc-доменом непосредственно или через линкерный пептид. В конкретном варианте осуществления изобретения первый антигенсвязывающий фрагмент сливают с Fc-доменом через шарнирную область иммуноглобулина. В конкретном варианте осуществления изобретения шарнирная область иммуноглобулина представляет собой шарнирную область человеческого IgG₁.

В одном из вариантов осуществления изобретения первый антигенсвязывающий фрагмент содержит антигенсвязывающий домен антитела, который содержит вариабельную область тяжелой цепи антитела и вариабельную область легкой цепи антитела. В конкретном варианте осуществления изобретения первый антигенсвязывающий фрагмент представляет собой молекулу Fab. В одном из вариантов осуществления изобретения молекулу Fab сливают на карбоксиконце ее тяжелой или легкой цепи с аминоконцевой аминокислотой одной из двух субъединиц Fc-домена. В конкретном варианте осуществления изобретения молекулу Fab сливают на карбоксиконце ее тяжелой цепи с аминоконцевой аминокислотой одной из двух субъединиц Fc-домена. В более конкретном варианте осуществления изобретения молекулу Fab сливают с Fc-доменом через шарнирную область иммуноглобулина. В конкретном варианте осуществления изобретения шарнирная область иммуноглобулина представляет собой шарнирную область человеческого IgG₁.

В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат практически состоит из антигенсвязывающего фрагмента, Fc-домена, который состоит из двух субъединиц, эффекторного фрагмента и необязательно одного или нескольких линкерных пептидов, при этом указанный антигенсвязывающий домен представляет собой молекулу Fab и слит на карбоксиконце его тяжелой цепи с аминоконцевой аминокислотой одной из двух субъединиц Fc-домена, и при этом указанный эффекторный фрагмент слит либо с (I) аминоконцевой аминокислотой другой одной из двух субъединиц Fc-домена, или (II) с карбоксиконцевой аминокислотой одной из двух субъединиц Fc-домена. В последнем случае эффекторный фрагмент и первый антигенсвязывающий фрагмент могут быть слиты либо с одной и той же субъедини-

цей Fc-домена, либо каждый может быть слит с различными субъединицами Fc-домена.

Формат иммуноконъюгата с одним антигенсвязывающим фрагментом (например, представленный на фиг. 2Б и 2В), является ценным прежде всего в тех случаях, когда предполагается, что может происходить интернализация антигена-мишени после связывания с высокой аффинностью с антигенсвязывающим фрагментом. В таких случаях присутствие более одного антигенсвязывающего фрагмента в иммуноконъюгате может усиливать интернализацию, снижая тем самым доступность антигена-мишени.

Однако во многих других случаях является целесообразным наличие иммуноконъюгата, содержащего два или большее количество антигенсвязывающих фрагментов и один эффекторный фрагмент для более оптимального направленного переноса к антигену-мишени относительно рецептора эффекторного фрагмента и оптимизации фармацевтического "окна" иммуноконъюгата.

Таким образом, в конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, содержит первый и второй антигенсвязывающий фрагмент. В одном из вариантов осуществления изобретения каждый из указанных первого и второго антигенсвязывающих фрагментов слит с аминоконцевой аминокислотой одной из двух субъединиц Fc-домена. Первый и второй антигенсвязывающий фрагмент может быть слит с Fc-доменом непосредственно или через линкерный пептид. В конкретном варианте осуществления изобретения каждый из указанных первого и второго антигенсвязывающих фрагментов слит с субъединицей Fc-домена через шарнирную область иммуноглобулина. В конкретном варианте осуществления изобретения шарнирная область иммуноглобулина представляет собой шарнирную область человеческого IgG₁.

В одном из вариантов осуществления изобретения каждый из указанных первого и второго антигенсвязывающих фрагментов содержит антигенсвязывающий домен антитела, содержащий варируемую область тяжелой цепи антитела и варируемую область легкой цепи антитела. В конкретном варианте осуществления изобретения каждый из указанных первого и второго антигенсвязывающих фрагментов представляет собой молекулу Fab. В одном из вариантов осуществления изобретения каждая из указанных молекул Fab слита на карбоксиконце ее тяжелой или легкой цепи с аминоконцевой аминокислотой одной из двух субъединиц Fc-домена. В конкретном варианте осуществления изобретения каждая из молекул Fab слита на ее карбоксиконце с аминоконцевой аминокислотой одной из двух субъединиц Fc-домена. В более конкретном варианте осуществления изобретения каждая из указанных молекул Fab слита с субъединицей Fc-домена через шарнирную область иммуноглобулина. В конкретном варианте осуществления изобретения шарнирная область иммуноглобулина представляет собой шарнирную область человеческого IgG₁.

В одном из вариантов осуществления изобретения первый и второй антигенсвязывающий фрагмент и Fc-домен являются частью молекулы иммуноглобулина. В конкретном варианте осуществления изобретения молекула иммуноглобулина представляет собой иммуноглобулин класса IgG. В еще более предпочтительном варианте осуществления изобретения иммуноглобулин представляет собой иммуноглобулин подкласса IgG₁. В другом предпочтительном варианте осуществления изобретения иммуноглобулин представляет собой человеческий иммуноглобулин. В других вариантах осуществления изобретения иммуноглобулин представляет собой химерный иммуноглобулин или гуманизированный иммуноглобулин. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент слит с карбоксиконцевой аминокислотой одной из тяжелых цепей иммуноглобулина. Эффекторный фрагмент может быть слит с тяжелой цепью иммуноглобулина непосредственно или через линкерный пептид. В конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат практически состоит из молекулы иммуноглобулина, эффекторного фрагмента, слитого с карбоксиконцевой аминокислотой одной из тяжелых цепей иммуноглобулина, и необязательно одного или нескольких линкерных пептидов.

В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептид, в котором тяжелая цепь Fab объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, и полипептид, в котором субъединица Fc-домена объединена карбоксиконцевой пептидной связью с полипептидом эффекторного фрагмента. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептид, в котором тяжелая цепь первого Fab объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, и полипептид, в котором тяжелая цепь второго Fab объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая, в свою очередь, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с полипептидом эффекторного фрагмента. В следующем варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептид, в котором тяжелая цепь Fab объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, и полипептид, в котором полипептид эффекторного фрагмента объединен карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена. В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит также полипептид легкой цепи Fab. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептиды соединены ковалентной связью, например, с помощью дисульфидного мостика.

Согласно одному из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения компоненты иммуноконъюгата (например, эффекторный фрагмент, антигенсвязывающий фрагмент, Fc-домен) можно связывать непосредственно или через различные линкеры, в частности пептидные линкеры, которые содержат одну или большее количество аминокислот, как правило, примерно 2-20 аминокислот, которые пред-

ставлены в настоящем описании или известны в данной области. Приемлемыми неиммуногенными линкерными пептидами являются, например, линкерные пептиды $(G_4S)_n$, $(SG_4)_n$ или $G_4(SG_4)_n$, в которых n обозначает число, как правило, от 1 до 10, как правило, от 2 до 4.

Fc-домен

Fc-домен иммуноконъюгата состоит из пары полипептидных цепей, содержащих домены тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина. Например, Fc-домен молекулы иммуноглобулина G (IgG) представляет собой димер, каждая из субъединиц которого содержит константные домены CH2 и CH3 тяжелой цепи IgG. Две субъединицы Fc-домена обладают способностью к стабильной ассоциации друг с другом. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, содержит не более одного Fc-домена.

В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен иммуноконъюгата представляет собой Fc-домен IgG. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG₁. В другом варианте осуществления изобретения Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG₄. В другом конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен является человеческим. Приведенная в качестве примера последовательность Fc-области человеческого IgG₁ представлена в SEQ ID NO: 1.

Fc-домен придает иммуноконъюгату в значительной степени удлиненное время полужизни в сыворотке по сравнению с форматами иммуноконъюгатов, в которых отсутствует Fc-домен. В частности, в случае, когда иммуноконъюгат содержит эффекторный фрагмент с относительной слабой активностью (но, например, с пониженной токсичностью) продолжительное время полужизни может иметь решающее значение для достижения оптимальной эффективности *in vivo*. Кроме того, Fc-домен может опосредовать эффекторные функции, что дополнительно будет описано ниже.

Модификации Fc-домена, усиливающие гетеродимеризацию

Иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, содержат только один эффекторный фрагмент, слитый с одной из двух субъединиц Fc-домена, таким образом, они содержат две неидентичные полипептидные цепи. Рекомбинантная совместная экспрессия этих полипептидов и последующая димеризация приводит к нескольким возможным комбинациям двух полипептидов, из которых только гетеродимеры двух неидентичных полипептидов применяют согласно изобретению. Для повышения выхода и чистоты иммуноконъюгатов при их получении методами рекомбинации целесообразным является интродукция в Fc-домен иммуноконъюгата модификации, которая препятствует образованию гомодимеров двух идентичных полипептидов (т.е. двух полипептидов, содержащих эффекторный фрагмент, или двух полипептидов, в которых отсутствует эффекторный фрагмент), и/или усиливает образование гетеродимеров полипептида, который содержит эффекторный фрагмент, и полипептида, в котором отсутствует эффекторный фрагмент.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен иммуноконъюгата содержит модификацию, которая усиливает гетеродимеризацию двух неидентичных полипептидных цепей. Сайт наиболее сильного белок-белкового взаимодействия двух полипептидных цепей Fc-домена человеческого IgG находится в CH3-домене Fc-домена. Таким образом, в одном из вариантов осуществления изобретения указанная модификация находится в CH3-домене Fc-домена.

В конкретном варианте осуществления изобретения указанная модификация представляет собой модификацию типа "knob-in-hole" (типа "выступ-впадина"), которая включает модификацию, приводящую к образованию "выступа" в одной из двух субъединиц Fc-домена и к образованию "впадины" в другой одной из двух субъединиц Fc-домена. Технология "knob-into-hole" описана, например, в U.S. № 5731168; U.S. № 7695936; у Ridgway и др., Prot. Eng. 9, 1996, сс. 617-621 и Carter, J. Immunol. Meth. 248, 2001, сс. 7-15). В целом, метод включает интродукцию выпуклости ("выступ") на поверхности раздела первого полипептида и соответствующей полости ("впадина") на поверхности раздела второго полипептида, в результате выпуклость может помещаться в полость, усиливая тем самым образование гетеродимера и препятствуя образованию гомодимера. Выпуклости конструируют путем замены аминокислот с небольшими боковыми цепями на поверхности раздела первого полипептида на аминокислоты с более крупными боковыми цепями (например, на тирозин или триптофан). Компенсирующие полости идентичного или сходного размера с выпуклостями конструируют на поверхности раздела второго полипептида путем замены аминокислот с крупными боковыми цепями на аминокислоты с менее крупными боковыми цепями (например, аланин или треонин). Выпуклость и полость можно создавать путем изменения нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептиды, например, с помощью сайтнонаправленного мутагенеза, или посредством синтеза пептидов. В конкретном варианте осуществления изобретения модификация, приводящая к получению "выступа", представляет собой аминокислотную замену T366W в одной из двух субъединиц Fc-домена, а модификация, приводящая к получению "впадины", представляет собой аминокислотные замены T366S, L368A и Y407V в другой одной из двух субъединиц Fc-домена. В более конкретном варианте осуществления изобретения субъединица Fc-домена, содержащая модификацию, приводящую к получению "выступа", дополнительно содержит аминокислотную замену S354C, а субъединица Fc-домена, содержащая модификацию, приводящую к получению "впадины", дополнительно содержит аминокислотную замену Y349C. Интродукция этих двух остатков цистеина приводит к образованию дисульфидного мостика между двумя субъединицами Fc-домена, дополнительно стабилизирую-

щего димер (Carter, J. Immunol. Methods 248, 2001, сс. 7-15).

В альтернативном варианте осуществления изобретения модификация, усиливающая гетеродимеризацию двух неидентичных полипептидных цепей, представляет собой модификацию, опосредующую определяемые электростатическим действием воздействия, например, описанные в публикации РСТ WO 2009/089004. В целом, указанный метод включает замену одного или нескольких аминокислотных остатков на поверхности раздела двух полипептидных цепей на заряженные аминокислотные остатки, в результате чего образование гомодимера становится электростатически невыгодным, а гетеродимеризация становится электростатически выгодной.

В конкретном варианте осуществления изобретения эффекторный фрагмент слит с аминоконцевой аминокислотой субъединицы Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию "выступа". Не вдаваясь в какую-либо теорию, слияние эффекторного фрагмента с содержащей "выступ" субъединицей Fc-домена должно дополнительно минимизировать образование гомодимерных иммуноконъюгатов, содержащих два эффекторных фрагмента (стерическое "столкновение" двух содержащих "выступ" полипептидов).

Модификации Fc-домена, изменяющие связывание с Fc-рецептором

В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен иммуноконъюгата конструируют так, чтобы он обладал измененной аффинностью связывания с Fc-рецептором, прежде всего измененной аффинностью связывания с Fcγ-рецептором по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом.

Связывание с Fc-рецепторами можно легко определять, например, с помощью ELISA или резонанса поверхностного плазмона (SPR) с использованием стандартного оборудования, такого как устройство BIAcore (фирма GE Healthcare), и с применением таких Fc-рецепторов, которые можно получать методом рекомбинантной экспрессии. Приемлемый указанный анализ представлен в настоящем описании. Альтернативно этому, аффинность связывания Fc-доменов или иммуноконъюгатов, содержащих Fc-домен, с Fc-рецепторами можно оценивать с использованием клеточных линий, для которых известно, что они экспрессируют конкретные Fc-рецепторы, такие как NK-клетки, экспрессирующие FcγIIIa-рецептор.

В некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен иммуноконъюгата конструируют так, чтобы он обладал измененными эффекторными функциями, в частности измененной ADCC, по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом.

Эффекторную функцию Fc-домена или иммуноконъюгата, содержащего Fc-домен, можно измерять методами, известными в данной области. Приемлемый анализ для оценки ADCC представлен в настоящем описании. Другие примеры анализов *in vitro*, предназначенных для оценки ADCC-активности представляющей интерес молекулы, описаны в U.S. № 5500362; у Hellstrom и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 1986, сс. 7059-7063 и Hellstrom и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1985, сс. 1499-1502; U.S. № 5821337; у Bruggemann и др., J. Exp. Med. 166, 1987, сс. 1351-1361. Альтернативно этому, можно применять методы, основанные на нерадиоактивном анализе (см., например, АСТТ™-нерадиоактивный анализ цитотоксичности с помощью проточной цитометрии (фирма CellTechnology, Inc. Маунтин-Вью, шт. Калифорния); и CytoTox 96-нерадиоактивный анализ цитотоксичности (фирма Promega, Мэдисон, шт. Висконсин)). Приемлемыми эффекторными клетками для таких анализов являются моноклеарные клетки периферической крови (PBMNC) и естественные клетки-киллеры (NK). В альтернативном или дополнительном варианте ADCC-активность представляющей интерес молекулы можно оценивать *in vivo*, например, с использованием созданных на животных моделей, описанных у Clynes и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 1998, сс. 652-656.

В некоторых вариантах осуществления изобретения изменяют связывание Fc-домена с компонентом системы комплемента, в частности с C1q. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, в которых Fc-домен конструируют так, чтобы он обладал измененной эффекторной функцией, указанная измененная эффекторная функция включает измененную CDC. Можно осуществлять анализы связывания C1q для решения вопроса о том, может ли иммуноконъюгат связываться с C1q и, как следствие, обладает ли он CDC-активностью (см., например, анализы связывания с C1q и C3c с помощью ELISA, описанные в WO 2006/029879 и WO 2005/100402). Для оценки активации комплемента можно осуществлять анализ CDC (см., например, Gazzano-Santoro и др., J. Immunol. Methods 202, 1996, с. 163; Cragg и др., Blood 101, 2003, сс. 1045-1052 и Cragg и Glennie, Blood 103, 2004, сс. 2738-2743).

а) Пониженная способность связываться с Fc-рецептором и/или пониженная эффекторная функция.

Fc-домен придает иммуноконъюгату предпочтительные фармакокинетические свойства, включая продолжительное время полужизни в сыворотке, что обеспечивает хорошее накопление в ткани-мишени и предпочтительное соотношение распределений в ткани-крови. Однако в то же время он может приводить к нежелательной направленности иммуноконъюгата к клеткам, которые экспрессируют Fc-рецепторы, а не предпочтительным несущим антиген клеткам. Кроме того, совместная активация путей передачи сигналов Fc-рецептора может приводить к высвобождению цитокинов, что в сочетании с эффекторным фрагментом и продолжительным временем полужизни иммуноконъюгата, приводит к избыточной активации цитокиновых рецепторов и серьезным побочным действиям при системном введении. В соответствии с этим описано, что с иммуноконъюгатами, содержащими канонический IgG-IL-2, связа-

ны реакции на инфузию (см., например, King и др., J. Clin. Oncol. 22, 2004, сс. 4463-4473).

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен иммуноконъюгата конструируют так, чтобы он обладал пониженной аффинностью связывания с Fc-рецептором. В одном из таких вариантов осуществления изобретения Fc-домен содержит одну или несколько аминокислотных мутаций, которые снижают аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором. Как правило, одна или несколько одинаковых аминокислотных мутаций присутствует(ют) в каждой из двух субъединиц Fc-домена. В одном из вариантов осуществления изобретения указанные аминокислотные мутации снижают аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 5 раз или по меньшей мере в 10 раз. Согласно вариантам осуществления изобретения, в которых имеет место более одной аминокислотной мутации, которые снижают аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором, комбинация указанных аминокислотных мутаций может снижать аффинность связывания Fc-домена с Fc-рецептором по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз или по меньшей мере в 50 раз. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат, содержащий сконструированный Fc-домен, характеризуется аффинностью, составляющей менее чем 20%, в частности менее чем 10%, более предпочтительно менее чем 5% от аффинности связывания с Fc-рецептором, характерной для иммуноконъюгата, содержащего не подвергнутый инженерии Fc-домен. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой активирующий Fc-рецептор. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой Fcγ-рецептор, более конкретно FcγRIIIa-, FcγRI- или FcγRIIa-рецептор. Предпочтительно уменьшается связывание с каждым из этих рецепторов. Согласно некоторым вариантам осуществления изобретения снижается также аффинность связывания с компонентом системы комплемента, в частности аффинность связывания с C1q. Согласно одному из вариантов осуществления изобретения не снижается аффинность связывания с неонатальным Fc-рецептором (FcRn). Практически такое же связывание с FcRn, т.е. сохранение аффинности связывания Fc-домена с указанным рецептором, достигается, когда Fc-домен (или иммуноконъюгат, содержащий указанный Fc-домен) характеризуется аффинностью связывания с FcRn, составляющей более чем примерно 70% от аффинности связывания с FcRn не подвергнутого инженерии Fc-домена (или иммуноконъюгата, содержащего не подвергнутую инженерии форму Fc-домена). Fc-домены или иммуноконъюгаты, содержащие указанные Fc-домены, могут характеризоваться аффинностью, составляющей более чем примерно 80% и даже более чем примерно 90% от указанной выше аффинности. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотную замену в положении P329. В более конкретном варианте осуществления изобретения аминокислотная замена представляет собой P329A или P329G, в частности P329G. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен содержит дополнительную аминокислотную замену в положении, выбранном из S228, E233, L234, L235, N297 и P331. В более конкретном варианте осуществления изобретения дополнительная аминокислотная замена представляет собой S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D или P331S. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотные замены в положениях P329, L234 и L235. В более конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотные мутации L234A, L235A и P329G (LALA P329G). Такая комбинация аминокислотных замен практически полностью аннулирует связывание с Fcγ-рецептором Fc-домена человеческого IgG, что описано в заявке на европейский патент EP 11160251.2, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. В EP 11160251.2 описаны также методы получения указанных мутантных Fc-доменов и методы определения их свойств, таких как связывание с Fc-рецептором или эффекторные функции.

Мутантные Fc-домены можно получать с помощью аминокислотной делеции, замены, инсерции или модификации, используя генетические или химические методы, хорошо известные в данной области. Генетические методы могут включать сайтспецифический мутагенез кодирующей последовательности ДНК, ПЦР, синтез генов и т.п. Правильность нуклеотидных замен можно подтверждать, например, секвенированием.

В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен конструируют так, чтобы он обладал пониженной эффекторной функцией по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом. Пониженная эффекторная функция может представлять собой (но не ограничиваясь только ими) пониженную(ые) одну или несколько из следующих функций: пониженная комплементзависимая цитотоксичность (CDC), пониженная антителообусловленная клеточнозависимая цитотоксичность (АОСС), пониженный антителообусловленный клеточнозависимый фагоцитоз (ADCP), пониженная секреция цитокинов, пониженное опосредованное иммунным комплексом поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками, пониженное связывание с NK-клетками, пониженное связывание с макрофагами, пониженное связывание с моноцитами, пониженное связывание с полиморфоядерными клетками, пониженная непосредственная передача сигнала, индуцирующего апоптоз, пониженное перекрестное связывание связанных с мишенью антител, пониженное созревание дендритных клеток или пониженное Т-клеточное примирование.

В одном из вариантов осуществления изобретения пониженная эффекторная функция представляет собой одну или несколько функций, выбранных из группы, включающей пониженную CDC, пониженную ADCC, пониженный ADCP и пониженную секрецию цитокинов. В конкретном варианте осуществления изобретения пониженная эффекторная функция представляет собой пониженную ADCC. В одном из вариантов осуществления изобретения пониженная ADCC составляет меньше 20% от ADCC, индуцируемой не подвергнутым инженерии Fc-доменом (или иммуноконъюгатом, содержащим не подвергнутый инженерии Fc-домен).

Помимо Fc-доменов, описанных выше и в заявке на европейский патент EP 11160251.2, Fc-домены с пониженной способностью связываться с Fc-рецептором и/или пониженной эффекторной функцией включают также Fc-домены с заменой в одном или нескольких Fc-доменах остатков 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 (U.S. № 6737056). К указанным мутантам Fc относятся мутанты Fc с заменами в двух или большем количестве аминокислот в положениях 265, 269, 270, 297 и 327, включая так называемый мутант "DANA" Fc-области, несущий замену остатков 265 и 297 на аланин (U.S. № 7332581).

Антитела подтипа IgG₄ обладают пониженной аффинностью к связыванию с Fc-рецепторами и пониженными эффекторными функциями по сравнению с антителами подтипа IgG₁. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен Т-клеточных активирующих биспецифических антигенсвязывающих молекул, предлагаемых в изобретении, представляет собой Fc-домен IgG₄, в частности Fc-домен человеческого IgG₄. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен IgG₄ содержит аминокислотные замены в положении S228, конкретно аминокислотную замену S228P. Для дополнительного снижения аффинности связывания с Fc-рецептором и/или его эффекторной функции в одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен IgG₄ содержит аминокислотную замену в положении L235, в частности, аминокислотную замену L235E. В другом варианте осуществления изобретения Fc-домен IgG₄ содержит аминокислотную замену в положении P329, в частности аминокислотную замену P329G. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен IgG₄ содержит аминокислотные замены в положениях S228, L235 и P329, в частности аминокислотные замены S228P, L235E и P329G. Указанные мутанты Fc-домена IgG₄ и их особенности связывания с Fcγ-рецептором описаны в заявке на европейский патент EP 11160251.2, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

б) Повышенная способность связываться с Fc-рецептором и/или повышенная эффекторная функция.

Могут встречаться ситуации, когда в противоположность вышеописанному требуется поддерживать или даже повышать способность связываться с Fc-рецептором и/или эффекторные функции иммуноконъюгатов, например, когда мишенью иммуноконъюгата является высокоспецифический опухолевый антиген. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения Fc-домен иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, конструируют так, чтобы он обладал повышенной аффинностью связывания с Fc-рецептором. Повышенная аффинность связывания может представлять собой повышение аффинности связывания Fc-домена с Fc-рецептором по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 5 раз или по меньшей мере в 10 раз. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой активирующий Fc-рецептор. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой Fcγ-рецептор. В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-рецептор выбирают из группы, включающей FcγRIIIa, FcγRI и FcγRIIa. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-рецептор представляет собой FcγRIIIa.

В одном из указанных вариантов осуществления изобретения Fc-домен конструируют так, чтобы он имел измененную олигосахаридную структуру по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом. В частности, в таком варианте осуществления изобретения Fc-домен имеет повышенное относительное содержание нефукозилированных олигосахаридов по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом. В более конкретном варианте осуществления изобретения по меньшей мере примерно 20%, примерно 25%, примерно 30%, примерно 35%, примерно 40%, примерно 45%, примерно 50%, примерно 55%, примерно 60%, примерно 65%, примерно 70%, примерно 75%, примерно 80%, примерно 85%, примерно 90%, примерно 95% или примерно 100%, в частности по меньшей мере примерно 50%, более предпочтительно по меньшей мере примерно 70% N-связанных олигосахаридов в Fc-доме иммуноконъюгата являются нефукозилированными. Нефукозилированные олигосахариды могут быть гибридного или комплексного типа. В другом конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен имеет повышенное относительное содержание бисекционных олигосахаридов по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом. В более конкретном варианте осуществления изобретения по меньшей мере примерно 10, примерно 15, примерно 20, примерно 25, примерно 30, примерно 35, примерно 40, примерно 45, примерно 50, примерно 55, примерно 60, примерно 65, примерно 70, примерно 75, примерно 80, примерно 85, примерно 90, примерно 95 или примерно 100%, в частности по меньшей мере примерно 50%, более предпочтительно по меньшей мере примерно 70% N-связанных олигосахаридов в Fc-доме иммуноконъюгата являются бисекционными. Бисекционные олигосахариды могут быть гибридного или комплексного типа. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен имеет по-

вышенное относительное содержание бисекционных нефукозилированных олигосахаридов по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом. В более конкретном варианте осуществления изобретения по меньшей мере примерно 10, примерно 15, примерно 20, примерно 25, примерно 30, примерно 35, примерно 40, примерно 45, примерно 50, примерно 55, примерно 60, примерно 65, примерно 70, примерно 75, примерно 80, примерно 85, примерно 90, примерно 95 или примерно 100%, в частности по меньшей мере примерно 15%, более предпочтительно по меньшей мере примерно 25%, по меньшей мере примерно 35% или по меньшей мере примерно 50% N-связанных олигосахаридов в Fc-доме иммуноконъюгата являются бисекционными нефукозилированными. Бисекционные нефукозилированные олигосахариды могут быть гибридного или комплексного типа.

Структуры олигосахаридов в Fc-доме иммуноконъюгата можно анализировать с помощью методов, хорошо известных в данной области, например методом MALDI TOF-масс-спектрометрии, описанным у Umana и др., *Nat Biotechnol* 17, 1999, сс. 176-180 или Ferrara и др., *Biotechn Bioeng* 93, 2006, сс. 851-861. Процент нефукозилированных олигосахаридов представляет собой количество олигосахаридов, у которых отсутствуют остатки фукозы, относительно всех олигосахаридов, присоединенных к Asn 297 (например, комплексных, гибридных, с высоким содержанием маннозы структур), и идентифицированных в обработанном N-гликозидазой F образце (например, комплексных, гибридных структур с высоким содержанием маннозы), которое измеряют с помощью MALDI-TOF-МС. Asn297 обозначает остаток аспарагина, локализованный в положении 297 в Fc-доме (согласно EU-нумерации остатков в Fc); однако Asn297 может быть локализован в пределах примерно ± 3 аминокислоты в обратном или прямом направлении относительно положения 297, т.е. между положениями 294 и 300, что связано с минорными вариациями в последовательности иммуноглобулинов. Аналогично определяют процент бисекционных или бисекционных нефукозилированных олигосахаридов.

Для достижения модификации гликозилирования в Fc-доме иммуноконъюгата можно получать иммуноконъюгат в клетке-хозяине, которую подвергали манипуляции для экспрессии измененных уровней одного или нескольких полипептидов, обладающих гликозилтрансферазной активностью.

В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен иммуноконъюгата конструируют так, чтобы он обладал измененной структурой олигосахаридов по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом, путем получения иммуноконъюгата в клетке-хозяине с измененной активностью одной или нескольких гликозилтрансфераз. Гликозилтрансферазы включают, например, $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозамилтрансферазу III (GnTIII), $\beta(1,4)$ -галактозилтрансферазу (GalT), $\beta(1,2)$ -N-ацетилглюкозамилтрансферазу I (GnTI), $\beta(1,2)$ -N-ацетилглюкозамилтрансферазу II (GnTII) и $\alpha(1,6)$ -фукозилтрансферазу. В конкретном варианте осуществления изобретения Fc-домен иммуноконъюгата конструируют так, чтобы он имел повышенное относительное содержание нефукозилированных олигосахаридов по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом, путем получения иммуноконъюгата в клетке-хозяине, обладающей повышенной активностью $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозамилтрансферазы III (GnTIII). В еще более предпочтительном варианте осуществления изобретения клетка-хозяин имеет также повышенную активность α -маннозидазы II (ManII). Методология гликоинженерии, которую можно использовать для создания путем гликоинженерии иммуноконъюгатов, предлагаемых в настоящем изобретении, описана более подробно у Umana и др., *Nat Biotechnol* 17, 1999, сс. 176-180; Ferrara и др., *Biotechn Bioeng* 93, 2006, сс. 851-861; WO 99/54342 (U.S. № 6602684; EP 1071700); WO 2004/065540 (публикация патента США № 2004/0241817; EP 1587921), WO 03/011878 (публикация патента США № 2003/0175884), содержание каждого из которых полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Как правило, для создания клеточных линий, предназначенных для получения иммуноконъюгатов с измененной схемой гликозилирования, можно применять любой тип культивируемой линии клеток, включая клеточные линии, указанные в настоящем описании. Конкретные линии клеток включают CHO-клетки, BHK-клетки, NSO-клетки, SP2/0-клетки, клетки миеломы YO, клетки мышинной миеломы P3X63, PER-клетки, PER.C6-клетки или клетки гибридомы и другие клетки млекопитающих. В определенных вариантах осуществления изобретения клетки-хозяева подвергали манипуляциям, приводящим к экспрессии повышенных уровней одного или нескольких полипептидов, обладающих активностью $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозамилтрансферазы III (GnTIII). В некоторых вариантах осуществления изобретения клетки-хозяева подвергали дополнительным манипуляциям для обеспечения повышенных уровней экспрессии одного или нескольких полипептидов, обладающих активностью α -маннозидазы II (ManII). В конкретном варианте осуществления изобретения полипептид, обладающий GnTIII-активностью, представляет собой слитый полипептид, который содержит каталитический домен GnTIII и домен локализации в комплексе Гольджи гетерологичного полипептида, присутствующего в комплексе Гольджи. В частности, указанный домен локализации в комплексе Гольджи представляет собой домен локализации в комплексе Гольджи маннозидазы II. Методы создания указанных слитых полипептидов и их применение для получения антител с повышенными эффекторными функциями описаны у Ferrara и др., *Biotechn Bioeng* 93, 2006, сс. 851-861 и в WO 2004/065540, полное содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Клетки-хозяева, которые содержат кодирующую последовательность иммуноконъюгата, предла-

гаемого в изобретении, и/или кодирующую последовательность полипептидов, обладающих гликозилтрансферазной активностью, и которые экспрессируют биологически активные генные продукты, можно идентифицировать, например, с помощью гибридизации ДНК-ДНК или ДНК-РНК; по присутствию или отсутствию функций определенных "маркерных" генов; путем оценки уровня транскрипции, измеряемого по экспрессии соответствующих мРНК-транскриптов в клетке-хозяине; или путем выявления генного продукта с помощью иммуноанализа или по его биологической активности - т.е. методов, хорошо известных в данной области. Активность GnTIII или ManII можно определять, например, применяя лектин, который связывается с продуктами биосинтеза GnTIII или ManII соответственно. Примером указанного лектина является лектин E₄-PNA, который связывается предпочтительно с олигосахаридами, содержащими двурассекающий GlcNAc. Продукты биосинтеза (т.е. специфические олигосахаридные структуры) полипептидов, обладающих активностью GnTIII или ManII, можно выявлять также с помощью масс-спектрометрического анализа олигосахаридов, высвобождающихся из гликопротеинов, которые продуцируются клетками, экспрессирующими указанные полипептиды. В альтернативном варианте можно использовать функциональный анализ, в котором измеряют повышенную эффекторную функцию и/или повышенную способность связываться с Fc-рецептором, опосредуемую иммуноконъюгатами, которые продуцируются клетками, созданными с использованием полипептидов, обладающих активностью GnTIII.

В другом варианте осуществления изобретения Fc-домен конструируют так, чтобы он имел повышенное относительное содержание нефукозиллированных олигосахаридов по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом, путем получения иммуноконъюгата в клетке-хозяине с пониженной $\alpha(1,6)$ -фукозилтрансферазной активностью. Клетка-хозяин с пониженной $\alpha(1,6)$ -фукозилтрансферазной активностью может представлять собой клетку, в которой ген $\alpha(1,6)$ -фукозилтрансферазы разрушен или деактивирован иным образом, например "выключен" (см. Yamane-Ohnuki и др., *Biotech Bioeng* 87, 2004, с. 614; Kanda и др., *Biotechnol Bioeng* 94(4), 2006, сс. 680-688; Niwan др., *J. Immunol. Methods* 306, 2006, сс. 151-160).

Другими примерами клеточных линий, которые обладают способностью продуцировать дефукозиллированные иммуноглобулины, являются Lec13 CHO-клетки с дефицитом белкового фукозиллирования (Ripka и др., *Arch. Biochem. Biophys.* 249, 1986, сс. 533-545; заявка на патент США № US 2003/0157108 и WO 2004/056312, прежде всего в примере 11). В альтернативном варианте иммуноконъюгаты, предлагаемые в настоящем изобретении, можно подвергать гликоинженерии, что приводит к присутствию у них пониженного количества фукозных остатков в Fc-домене, с использованием методик, описанных в EP 1176195 A1, WO 03/084570, WO 03/085119 и опубликованных заявках на патент США № 2003/0115614, 2004/093621, 2004/110282, 2004/110704, 2004/132140, U.S. № 6946292 (на имя фирмы Kyowa), например, путем снижения или элиминации активности белка-транспортёра ГДФ-фукозы, в клетках-хозяевах, которые применяют для получения иммуноконъюгата.

Подвергнутые гликоинженерии иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно получать также в системах экспрессии, которые продуцируют модифицированные гликопротеины, например, описанных в WO 2003/056914 (фирма GlycoFi, Inc.) или WO 2004/057002 и WO 2004/024927 (на имя фирмы Greenovation).

В одном из вариантов осуществления изобретения Fc-домен иммуноконъюгата конструируют так, чтобы он обладал повышенной эффекторной функцией по сравнению с не подвергнутым инженерии Fc-доменом. Повышенная эффекторная функция может представлять собой (но не ограничиваясь только ими) одну или несколько функций, выбранных из группы, включающей повышенную комплементзависимую цитотоксичность (CDC), повышенную антитело-обусловленную клеточнозависимую цитотоксичность (ADCC), повышенный антителообусловленный клеточнозависимый фагоцитоз (ADCP), повышенную секрецию цитокинов, повышенное опосредованное иммунным комплексом поглощение антигена антигенпрезентирующими клетками, повышенное связывание с NK-клетками, повышенное связывание с макрофагами, повышенное связывание с моноцитами, повышенное связывание с полиморфоядерными клетками, повышенную непосредственную передачу сигнала, индуцирующего апоптоз, повышенное перекрестное связывание связанных с мишенью антител, повышенное созревание дендритных клеток или повышенное Т-клеточное примирование. В конкретном варианте осуществления изобретения повышенная эффекторная функция представляет собой одну или несколько функций, выбранных из группы, включающей повышенную CDC, повышенную ADCC, повышенный ADCP и повышенную секрецию цитокинов. В конкретном варианте осуществления изобретения повышенная эффекторная функция представляет собой повышенную ADCC. В одном из вариантов осуществления изобретения ADCC, индуцированная сконструированным Fc-доменом (или иммуноконъюгатом, который содержит сконструированный Fc-домен) по меньшей мере в 2 раза выше, чем ADCC, индуцируемая не подвергнутым инженерии Fc-доменом (или иммуноконъюгатом, содержащим не подвергнутый инженерии Fc-домен).

Эффекторные фрагменты.

Эффекторные фрагменты, предназначенные для применения в изобретении, представляют собой, как правило, полипептиды, которые влияют на клеточную активность, например, через пути трансдукции

сигналов. Таким образом, эффекторный фрагмент иммуноконъюгата, применяемого в изобретении, может быть ассоциирован с опосредуемой рецептором передачей сигналов, что приводит к передаче сигнала от наружной части клеточной мембраны, модулируя ответ в клетке. Например, эффекторный фрагмент иммуноконъюгата может представлять собой цитокин. В конкретных вариантах осуществления изобретения эффекторный фрагмент является человеческим.

В некоторых вариантах осуществления изобретения эффекторный фрагмент представляет собой одноцепочечный эффекторный фрагмент. В конкретном варианте осуществления изобретения эффекторный фрагмент представляет собой цитокин. Примерами приемлемых цитокинов являются (но не ограничиваясь только ими) GM-CSF, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-21, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , TGF- β , TNF- α и TNF- β . В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент иммуноконъюгата представляет собой цитокин, выбранный из группы, включающей GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-21, IFN- α , IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β и TGF- β . В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент иммуноконъюгата представляет собой цитокин, выбранный из группы, включающей IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IFN- α и IFN- γ . В некоторых вариантах осуществления изобретения цитокиновый эффекторный фрагмент подвергают мутации для удаления N-и/или O-связанных сайтов гликозилирования. Элиминация гликозилирования повышает выход гомогенного продукта, получаемого с помощью методов рекомбинации.

В конкретном варианте осуществления изобретения эффекторный фрагмент иммуноконъюгата представляет собой IL-2. В конкретном варианте осуществления изобретения эффекторный фрагмент IL-2 может обуславливать один или несколько клеточных ответов, выбранных из группы, включающей пролиферацию активированного Т-лимфоцита, дифференцировку активированного Т-лимфоцита, активность цитотоксической Т-клетки (CTL), пролиферацию активированной В-клетки, дифференцировку активированной В-клетки, пролиферацию естественной клетки-киллера (NK), дифференцировку NK-клетки, секрецию цитокинов активированной Т-клеткой или NK-клеткой и противоопухолевую цитотоксичность NK/лимфоцит-активированных клеток-киллеров (LAK). В другом конкретном варианте осуществления изобретения эффекторный фрагмент IL-2 представляет собой мутантный эффекторный фрагмент IL-2, обладающий пониженной аффинностью связывания с α -субъединицей IL-2-рецептора. В сочетании с β - и γ -субъединицами (которые известны также как CD122 и CD132 соответственно) α -субъединица (известная также как CD25) образует гетеротримерный высокоаффинный IL-2-рецептор, в то время как димерный рецептор, состоящий только из β - и γ -субъединиц, обозначают как IL-2-рецептор с промежуточной аффинностью. Как описано в заявке на патент PCT PCT/EP 2012/051991, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки, мутантный полипептид IL-2, обладающий пониженной способностью связываться с α -субъединицей IL-2 рецептор обладает пониженной способностью индуцировать передачу сигналов IL-2 в регуляторных Т-клетках, индуцирует пониженную индуцированную активацией клеточную гибель (AICD) Т-клеток и обладает пониженным профилем токсичности *in vivo* по сравнению с полипептидом IL-2 дикого типа. Применение такого эффекторного фрагмента, обладающего пониженной токсичностью, наиболее целесообразно в иммуноконъюгате, предлагаемом в изобретении, который обладает продолжительным временем полужизни в сыворотке из-за присутствия Fc-домена. В одном из вариантов осуществления изобретения представляющий собой мутантный IL-2 эффекторный фрагмент иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, содержит по меньшей мере одну аминокислотную мутацию, которая снижает или элиминирует аффинность содержащего мутантный IL-2 эффекторного фрагмента к α -субъединице IL-2-рецептора (CD25), но сохраняет аффинность содержащего мутантный IL-2 эффекторного фрагмента к IL-2-рецептору с промежуточной аффинностью (который состоит из β - и γ -субъединиц IL-2-рецептора) по сравнению с содержащим немутантный IL-2 эффекторным фрагментом. В одном из вариантов осуществления изобретения одна или несколько аминокислотных мутаций представляют собой аминокислотные замены. В конкретном варианте осуществления изобретения представляющий собой мутантный IL-2 эффекторный фрагмент несет одну, две или три аминокислотные замены в одном, двух или трех положении(ях), выбранных из положений, которые соответствуют остаткам 42, 45 и 72 человеческого IL-2. В более конкретном варианте осуществления изобретения представляющий собой мутантный IL-2 эффекторный фрагмент несет три аминокислотные замены в положениях, соответствующих остатку 42, 45 и 72 человеческого IL-2. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения представляющий собой мутантный IL-2 эффекторный фрагмент представляет собой человеческий IL-2, который содержит аминокислотные замены F42A, Y45A и L72G. В одном из вариантов осуществления изобретения представляющий собой мутантный IL-2 эффекторный фрагмент дополнительно содержит аминокислотную мутацию в положении, соответствующем положению 3 человеческого IL-2, которая приводит к элиминации сайта O-гликозилирования в IL-2. В частности, указанная дополнительная аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену остатка треонина на остаток аланина. Конкретный представляющий собой мутантный IL-2 эффекторный фрагмент, который можно применять в изобретении, содержит четыре аминокислотные замены в положениях, соответствующих остаткам 3, 42, 45 и 72 человеческого IL-2. Конкретные аминокислотные замены представляют собой T3A, F42A, Y45A и L72G. Как продемонстрировано в заявке на

патент РСТ РСТ/ЕР 2012/051991 и в прилагаемых к ней примерах, указанный четырехмутантный полипептид IL-2 (IL-2 qm) не обладает выявляемой способностью к связыванию с CD25, обладает пониженной способностью индуцировать апоптоз Т-клеток, пониженной способностью индуцировать передачу сигналов IL-2 в T_{reg}-клетках и пониженным профилем токсичности *in vivo*. Однако он сохраняет способность активировать передачу сигналов IL-2 в эффекторных клетках, индуцировать пролиферацию эффекторных клеток и создание NK-клетками IFN- γ в качестве вторичного цитокина.

IL-2 или мутантный IL-2, представляющий собой эффекторный фрагмент, указанный в любом из перечисленных выше вариантов осуществления изобретения, может содержать дополнительные мутации, которые обеспечивают дополнительные преимущества, такие как повышенный уровень экспрессии или повышенная стабильность. Например, цистеин в положении 125 можно заменять на нейтральную аминокислоту, такую как аланин, что позволяет избегать образования связанных дисульфидными мостиками димеров IL-2. Так, в некоторых вариантах осуществления изобретения IL-2 или мутантный IL-2, представляющий собой эффекторный фрагмент иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, содержит дополнительную аминокислотную мутацию в положении, соответствующем остатку 125 человеческого IL-2. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная дополнительная аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену C125A.

В конкретном варианте осуществления изобретения IL-2, представляющий собой эффекторный фрагмент иммуноконъюгата, содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 2. В другом конкретном варианте осуществления изобретения IL-2, представляющий собой эффекторный фрагмент иммуноконъюгата, содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3.

В другом варианте осуществления изобретения эффекторный фрагмент иммуноконъюгата представляет собой IL-12. В конкретном варианте осуществления изобретения указанный IL-12, представляющий собой эффекторный фрагмент, представляет собой содержащий одноцепочечный IL-12 эффекторный фрагмент. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения одноцепочечный IL-12, представляющий собой эффекторный фрагмент, содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 4. В одном из вариантов осуществления изобретения IL-12, представляющий собой эффекторный фрагмент, может вызывать один или несколько клеточных ответов, выбранных из группы, включающей пролиферацию NK-клетки, дифференцировку NK-клетки, пролиферацию Т-клетки и дифференцировку Т-клетки.

В другом варианте осуществления изобретения эффекторный фрагмент иммуноконъюгата представляет собой IL-10. В конкретном варианте осуществления изобретения указанный IL-10, представляющий собой эффекторный фрагмент, представляет собой содержащий одноцепочечный IL-10 эффекторный фрагмент. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения одноцепочечный IL-10, представляющий собой эффекторный фрагмент, содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 5. В другом конкретном варианте осуществления изобретения IL-10, представляющий собой эффекторный фрагмент, является мономерным IL-10, представляющим собой эффекторный фрагмент. В более конкретном варианте осуществления изобретения мономерный IL-10, представляющий собой эффекторный фрагмент, содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 6. В одном из вариантов осуществления изобретения IL-10, представляющий собой эффекторный фрагмент, может вызывать один или несколько клеточных ответов, выбранных из группы, включающей ингибирование секреции цитокинов, ингибирование презентации антигена антигенпрезентирующими клетками, снижение высвобождения кислородных радикалов и ингибирование Т-клеточной пролиферации. Иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, в котором эффекторный фрагмент представляет собой IL-10, наиболее предпочтительно применять для понижающей регуляции воспаления, например, при лечении воспалительного нарушения.

В другом варианте осуществления изобретения эффекторный фрагмент иммуноконъюгата представляет собой IL-15. В конкретном варианте осуществления изобретения указанный IL-15, представляющий собой эффекторный фрагмент, является мутантным IL-15, представляющим собой эффекторный фрагмент, который обладает пониженной аффинностью связывания с α -субъединицей IL-15-рецептора. Не вдаваясь в теорию, мутантный полипептид IL-15 с пониженной способностью связываться с α -субъединицей IL-15-рецептора, обладает пониженной способностью связываться с фибробластами в организме, что приводит к улучшенным фармакокинетическим характеристикам и улучшенному профилю токсичности по сравнению с полипептидом IL-15 дикого типа. Применение эффекторного фрагмента, обладающего пониженной токсичностью, такого как мутантный IL-2 и мутантный IL-15, которые представляют собой описанные эффекторные фрагменты, наиболее целесообразно в иммуноконъюгате, предлагаемом в изобретении, который обладает продолжительным временем полужизни в сыворотке из-за присутствия Fc-домена. В одном из вариантов осуществления изобретения мутантный IL-15, представляющий собой эффекторный фрагмент иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, содержит по меньшей мере одну аминокислотную мутацию, которая снижает или элиминирует аффинность мутантного IL-15, представляющего собой эффекторный фрагмент, к α -субъединице IL-15-рецептора, но сохраняет аффинность мутантного IL-15, представляющего собой эффекторный фрагмент, к IL-15/IL-2-

рецептору с промежуточной аффинностью (который состоит из β - и γ -субъединиц IL-15/IL-2-рецептора) по сравнению с немутатным IL-15, представляющим собой эффекторный фрагмент. В одном из вариантов осуществления изобретения аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену. В конкретном варианте осуществления изобретения мутантный IL-15, представляющий собой эффекторный фрагмент, содержит аминокислотную замену в положении, соответствующем остатку 53 человеческого IL-15. В более конкретном варианте осуществления изобретения мутантный IL-15, представляющий собой эффекторный фрагмент, представляет собой человеческий IL-15, который содержит аминокислотную замену E53A. В одном из вариантов осуществления изобретения мутантный IL-15, представляющий собой эффекторный фрагмент, дополнительно содержит аминокислотную мутацию в положении, соответствующем положению 79 человеческого IL-15, которая приводит к элиминации сайта N-гликозилирования в IL-15. В частности, указанная дополнительная аминокислотная мутация представляет собой аминокислотную замену, приводящую к замене остатка аспарагина на остаток аланана. В еще более конкретном варианте осуществления изобретения IL-15, представляющий собой эффекторный фрагмент, содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 7. В одном из вариантов осуществления изобретения IL-15, представляющий собой эффекторный фрагмент, может вызывать один или несколько клеточных ответов, выбранных из группы, включающей пролиферацию активированного Т-лимфоцита, дифференцировку активированного Т-лимфоцита, активность цитотоксической Т-клетки (CTL), пролиферацию активированной В-клетки, дифференцировку активированной В-клетки, пролиферацию естественной клетки-киллера (NK), дифференцировку NK-клетки, секрецию цитокинов активированной Т-клеткой или NK-клеткой и противоопухолевую цитотоксичность NK/лимфоцит-активированной клетки-киллера (LAK).

Мутантные молекулы цитокинов, применяемые в качестве эффекторных фрагментов в иммуноконъюгатах, можно получать путем делеции, замены, инсерции или модификации с использованием генетических или химических методов, хорошо известных в данной области. Генетические методы могут включать сайтспецифический мутагенез кодирующих последовательностей ДНК, ПЦР, синтез генов и т.п. Правильность нуклеотидных замен можно подтверждать, например, секвенированием. Замена или инсерция может затрагивать встречающиеся в естественных условиях или не встречающиеся в естественных условиях аминокислотные остатки. Модификацию аминокислот осуществляют с помощью хорошо известных методов химической модификации, таких как добавление или удаление сайтов гликозилирования или присоединения углеводов и т.п.

В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент, прежде всего одноцепочечный эффекторный фрагмент иммуноконъюгата, представляет собой GM-CSF. В конкретном варианте осуществления изобретения GM-CSF, представляющий собой эффекторный фрагмент, может вызывать пролиферацию и/или дифференцировку гранулоцита, моноцита или дендритной клетки. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент, прежде всего одноцепочечный эффекторный фрагмент иммуноконъюгата, представляет собой IFN- α . В конкретном варианте осуществления изобретения IFN- α , представляющий собой эффекторный фрагмент, может вызывать один или несколько клеточных ответов, выбранных из группы, включающей ингибирование вирусной репликации в зараженной вирусом клетке и повышающую регуляцию экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости I (ГКГ I). В другом конкретном варианте осуществления изобретения IFN- α , представляющий собой эффекторный фрагмент, может ингибировать пролиферацию опухолевой клетки. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент, прежде всего одноцепочечный эффекторный фрагмент иммуноконъюгата, представляет собой IFN- γ . В конкретном варианте осуществления изобретения IFN- γ , представляющий собой эффекторный фрагмент, может вызывать один или несколько клеточных ответов, выбранных из группы, включающей повышенную активность макрофагов, повышенную экспрессию молекул ГКГ и повышенную активность NK-клеток. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент, прежде всего одноцепочечный эффекторный фрагмент иммуноконъюгата, представляет собой IL-7. В конкретном варианте осуществления изобретения IL-7, представляющий собой эффекторный фрагмент, может вызывать пролиферацию Т- и/или В-лимфоцитов. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент, прежде всего одноцепочечный эффекторный фрагмент иммуноконъюгата, представляет собой IL-8. В конкретном варианте осуществления изобретения IL-8, представляющий собой эффекторный фрагмент, может вызывать хемотаксис нейтрофилов. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент, прежде всего одноцепочечный эффекторный фрагмент иммуноконъюгата, представляет собой MIP-1 α . В конкретном варианте осуществления изобретения MIP-1 α , представляющий собой эффекторный фрагмент, может вызывать хемотаксис моноцитов и Т-лимфоцитов. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент, прежде всего одноцепочечный эффекторный фрагмент иммуноконъюгата, представляет собой MIP-1 β . В конкретном варианте осуществления изобретения MIP-1 β , представляющий собой эффекторный фрагмент, может вызывать хемотаксис моноцитов и Т-лимфоцитов. В одном из вариантов осуществления изобретения эффекторный фрагмент, прежде всего одноцепочечный эффекторный фрагмент иммуноконъюгата, представляет собой TGF- β . В конкретном варианте осуществления изобретения

TGF- β , представляющий собой эффекторный фрагмент, может вызывать один или несколько клеточных ответов, выбранных из группы, включающей хемотаксис моноцитов, хемотаксис макрофагов, повышающую регуляцию экспрессии IL-1 в активированных макрофагах и повышающую регуляцию экспрессии IgA в активированных В-клетках.

В одном из вариантов осуществления изобретения связывание иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, с рецептором эффекторного фрагмента характеризуется константой диссоциации (K_D), которая по меньшей мере примерно в 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 или 10 раз выше по сравнению с применяемым в качестве контроля эффекторным фрагментом. В другом варианте осуществления изобретения связывание иммуноконъюгата с рецептором эффекторного фрагмента характеризуется величиной K_D , которая по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 раз выше по сравнению с соответствующей молекулой иммуноконъюгата, содержащей два или большее количество эффекторных фрагментов. В другом варианте осуществления изобретения связывание иммуноконъюгата с рецептором эффекторного фрагмента характеризуется константой диссоциации K_D , которая примерно в 10 раз выше по сравнению с соответствующей молекулой иммуноконъюгата, содержащей два или большее количество эффекторных фрагментов.

Антигенсвязывающие фрагменты

Иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, содержат по меньшей мере один антигенсвязывающий фрагмент. В конкретных вариантах осуществления изобретения иммуноконъюгаты содержат два антигенсвязывающих фрагмента, т.е. первый и второй антигенсвязывающий фрагмент. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит не более двух антигенсвязывающих фрагментов.

Антигенсвязывающий фрагмент иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, как правило, представляет собой молекулу полипептида, которая связывается со специфической антигенной детерминантой и обладает способностью направлять субстанцию, с которой она соединена (например, эффекторный фрагмент и Fc-домен) к сайту-мишени, например к конкретному типу опухолевой клетки или стромы опухоли, которая несет антигенную детерминанту. Иммуноконъюгат может связываться с антигенной детерминантой, например, присутствующей на поверхности опухолевых клеток, на поверхности инфицированных вирусом клеток, на поверхности других больных клеток, находящейся в свободном состоянии в сыворотке крови и/или во внеклеточном матриксе (ECM).

В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент направлен к антигену, ассоциированному с патологическим состоянием, такому как антиген, презентуемый на опухолевой клетке или в окружении опухолевой клетки, в области воспаления или в инфицированной вирусом клетке.

Примерами опухолевых антигенов являются (но не ограничиваясь только ими) MAGE, MART-1/Melan-A, gp100, дипептидилпептидаза IV (DPPIV), белок, связывающий аденозиндеаминазу (ADAбp), циклофилин B, антиген, ассоциированный с колоректальным раком (CRC)-C017-1A/GA733, карциноэмбриональный антиген (CEA) и его иммуногенные эпитопы CAP-1 и CAP-2, etv6, aml1, простатический антиген (PSA) и его иммуногенные эпитопы PSA-1, PSA-2 и PSA-3, простатический специфический мембранный антиген (PSMA), Т-клеточный рецептор/CD3-зета-цепь, семейство MAGE опухолевых антигенов (например, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2 (MAGE-B2), MAGE-Xp3 (MAGE-B3), MAGE-Xp4 (MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), семейство GAGE опухолевых антигенов (например, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, тирозиназа, p53, семейство MUC, HER2/neu, p21ras, RCAS1, α -фетопротеин, Е-кадгерин, α -катенин, β -катенин и γ -катенин, p120ctn, gp100 Pmel117, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, белок аденоматозного полипоза coli (APC), фодрин, коннексин 37, Ig-идиотип, p15, gp75, ганглиозиды GM2 и GD2, вирусные продукты, такие как белки человеческого вируса папилломы, семейство Smad опухолевых антигенов, Imp-1 P1A, кодируемый EBV ядерный антиген (EBNA)-1, гликогенфосфолипаза головного мозга, SSX-1, SSX-2 (HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-1 и CT-7 и c-erbB-2.

Примерами вирусных антигенов являются (но не ограничиваясь только ими) гемагглютинин вируса гриппа, LMP-1 вируса Эпштейна-Барра, гликопротеин вируса гепатита С E2, gp160 ВИЧ, и gp120 ВИЧ.

Примерами антигенов ECM являются (но не ограничиваясь только ими) синдекан, гепараназа, интегрины, остеопонтин, белки семейства link, кадхерины, ламинин, ламинин типа EGF, лектин, фибронектин, белки семейства notch, тенасцин и матриксин.

Иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, могут связываться со следующими специфическими антигенами клеточной поверхности, включающими (но не ограничиваясь только ими) FAP, Her2, EGFR, IGF-1R, CD22 (В-клеточный рецептор), CD23 (низкоаффинный IgE-рецептор), CD30 (цитокиновый рецептор), CD33 (поверхностный антиген клеток миелоидного ряда), CD40 (рецептор фактора некроза опухолей), IL-6R (IL6-рецептор), CD20, MCSP и PDGF β R (рецептор тромбоцитарного фактора роста β). В конкретных вариантах осуществления изобретения антиген представляет собой человеческий анти-

ген.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент направлен к антигену, презентуемому на опухолевой клетке или в окружении опухолевой клетки. В других вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент направлен к антигену, презентуемому в области воспаления. В конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент направлен к антигену, выбранному из группы, включающей фибробласт-активирующий белок (FAP), A1-домен тенасцина-С (TNC A1), A2-домен тенасцина-С (TNC A2), экстра-домен В фибронектина (EDB), карциноэмбриональный антиген (CEA) и ассоциированный с меланомой хондроитинсульфат-протеогликан (MCSP).

В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, содержит два или большее количество антигенсвязывающих фрагментов, в котором каждый из этих антигенсвязывающих фрагментов специфически связывается с одной и той же антигенной детерминантой.

Антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой антитело любого типа или его фрагмент, который сохраняет специфичность связывания с антигенной детерминантой. Фрагменты антитела включают (но не ограничиваясь только ими) V_H-фрагменты, V_L-фрагменты, Fab-фрагменты, F(ab')₂-фрагменты, scFv-фрагменты, Fv-фрагменты, минитела (минибоди), димерные антитела, тримерные антитела и тетрамерные антитела (см., например, Hudson и Souriau, Nature Med 9, 2003, сс. 129-134). В конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент представляет собой молекулу Fab. В одном из вариантов осуществления изобретения указанная молекула Fab является человеческой. В другом варианте осуществления изобретения указанная молекула Fab является гуманизированной. В следующем варианте осуществления изобретения указанная молекула Fab содержит константные области человеческой тяжелой и легкой цепи.

В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит по меньшей мере один, как правило, два или большее количество антигенсвязывающих фрагментов, которые являются специфическими для экстра-домена В фибронектина (EDB). В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит по меньшей мере один, как правило, два или большее количество антигенсвязывающих фрагментов, которые могут конкурировать с моноклональным антителом L19 за связывание с эпитопом EDB (см., например, публикацию PCT WO 2007/128563 A1, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

В следующем варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, полученного из моноклонального антитела L19, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию "выступа", которая в свою очередь объединена карбоксиконцевой пептидной связью с полипептидом IL-2. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 215 или ее вариант, который сохраняет функциональность. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, полученного из моноклонального антитела L19, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию "впадины". В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 213 или ее вариант, который сохраняет функциональность. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит легкую цепь Fab, полученного из моноклонального антитела L19. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 217 или ее вариант, который сохраняет функциональность. В следующем варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 213, SEQ ID NO: 215 и SEQ ID NO: 217 или их варианты, которые сохраняют функциональность. В другом конкретном варианте осуществления изобретения полипептиды ковалентно связаны, например, с помощью дисульфидного мостика. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая из субъединиц Fc-домена содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G.

В конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 216. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 216. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 214. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 214. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 218. В следующем конкретном варианте

осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 218.

В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, содержит по меньшей мере один, как правило, два или большее количество антигенсвязывающих фрагментов, которые являются специфическими в отношении A1-домена теназина (TNC-A1). В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит по меньшей мере один, как правило, два или большее количество антигенсвязывающих фрагментов, которые могут конкурировать с моноклональным антителом F16 за связывание с эпитопом TNC-A1 (см., например, публикацию PCT WO 2007/128563 A1, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки). В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит по меньшей мере один, как правило, два или большее количество антигенсвязывающих фрагментов, которые являются специфическими в отношении A1- и/или A4-домена теназина (TNC-A1 или TNC-A4, или TNC-A1/A4).

В конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариabельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична либо SEQ ID NO: 33, либо SEQ ID NO: 35 или их вариантам, сохраняющим функциональность. В другом конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариabельной области легкой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична либо SEQ ID NO: 29, либо SEQ ID NO: 31 или их вариантам, сохраняющим функциональность. В более конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариabельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична либо SEQ ID NO: 33, либо SEQ ID NO: 35 или их вариантам, сохраняющим функциональность, и последовательность вариabельной области легкой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична либо SEQ ID NO: 29, либо SEQ ID NO: 31 или их вариантам, сохраняющим функциональность.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариabельной области тяжелой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична либо SEQ ID NO: 34, либо SEQ ID NO: 36. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариabельной области тяжелой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью либо SEQ ID NO: 34, либо SEQ ID NO: 36. В другом конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариabельной области легкой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична либо SEQ ID NO: 30, либо SEQ ID NO: 32. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариabельной области легкой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью либо SEQ ID NO: 30, либо SEQ ID NO: 32.

В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении A1-домена теназина C, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию "выступа", которая в свою очередь объединена карбоксиконцевой пептидной связью с полипептидом IL-2. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении A1-домена теназина C, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию "впадины". В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит обе указанные полипептидные последовательности. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит также легкую цепь Fab, специфического в отношении A1-домена теназина C. В другом конкретном варианте осуществления изобретения полипептиды ковалентно связаны, например, дисульфидным мостиком. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая из субъединиц Fc-домена содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G.

В конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит по меньшей мере один, как правило, два или большее количество антигенсвязывающих фрагментов, специфических для A2-домена теназина C (TNC-A2). В конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариabельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 183 и SEQ ID NO: 187 или их вариантам, сохраняющим функциональность. В другом конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариabельной области легкой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% иден-

тична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 181 и SEQ ID NO: 185 или их вариантам, сохраняющим функциональность. В более конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариательной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 163, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 179, SEQ ID NO: 183 и SEQ ID NO: 187 или их вариантам, сохраняющим функциональность, и последовательность вариательной области легкой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25; SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 161, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 169, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 181 и SEQ ID NO: 185 или их вариантам, сохраняющим функциональность. В конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариательной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 27 и последовательность вариательной области легкой цепи SEQ ID NO: 25.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариательной области тяжелой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 184 и SEQ ID NO: 188. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариательной области тяжелой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 160, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 168, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 180, SEQ ID NO: 184 и SEQ ID NO: 188. В другом конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариательной области легкой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 182 и SEQ ID NO: 186. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариательной области легкой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 162, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 182 и SEQ ID NO: 186.

В следующем варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении A1-домена теназина С, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию "впадины", которая в свою очередь объединена карбоксиконцевой пептидной связью с полипептидом IL-10. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 235 или SEQ ID NO: 237 или ее вариант, сохраняющий функциональность. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении A1-домена теназина С, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию "выступа". В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит легкую цепь Fab, специфического в отношении A2-домена теназина С. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 239 или ее вариант, сохраняющий функциональность. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 235 и SEQ ID NO: 239 или их варианты, сохраняющие функциональность. В следующем варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 233, SEQ ID NO: 237 и SEQ ID NO: 239 или их варианты, сохраняющие функциональность. В другом конкретном варианте осуществления изобретения полипептиды ковалентно связаны, например, с помощью дисульфидного мостика. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая из субъединиц Fc-домена содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G.

В конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 236 или SEQ ID NO: 238. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 236 или SEQ ID NO: 238. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью,

которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 234. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 234. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 240. В следующем варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 240.

В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении A2-домена тенайсина C, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию "выступа", которая в свою очередь объединена карбоксиконцевой пептидной связью с полипептидом IL-2. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 285 или ее вариант, сохраняющий функциональность. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении A2-домена тенайсина C, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию "впадины". В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 287 или ее вариант, сохраняющий функциональность. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит легкую цепь Fab, специфического в отношении A2-домена тенайсина C. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 239 или ее вариант, сохраняющий функциональность. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 285, SEQ ID NO: 287 и SEQ ID NO: 239 или их варианты, сохраняющие функциональность. В другом конкретном варианте осуществления изобретения полипептиды ковалентно связаны, например, с помощью дисульфидного мостика. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая из субъединиц Fc-домена содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G.

В конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 286. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 286. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 288. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 288. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 240. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 240.

В конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит по меньшей мере один, как правило, два или более количество антигенсвязывающих фрагментов, специфических в отношении фибробласт-активирующего белка (FAP). В конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 151 и SEQ ID NO: 155 или их вариантам, сохраняющим функциональность. В другом конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 149 и SEQ ID NO: 153 или их вари-

антам, сохраняющим функциональность. В более конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 151 и SEQ ID NO: 155 или их вариантам, сохраняющим функциональность, и последовательность вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей: SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 125, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 149 и SEQ ID NO: 153 или их вариантам, сохраняющим функциональность. В конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 111 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 109. В другом конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 143 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 141. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 51 и последовательность вариабельной области легкой SEQ ID NO: 49.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариабельной области тяжелой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей: SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 152 и SEQ ID NO: 156. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариабельной области тяжелой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 152 и SEQ ID NO: 156. В другом конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариабельной области легкой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 150 и SEQ ID NO: 154. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариабельной области легкой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 146, SEQ ID NO: 150 и SEQ ID NO: 154.

В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении FAP, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию "выступа", которая, в свою очередь, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с полипептидом IL-2. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 195, SEQ ID

NO: 197, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 209, SEQ ID NO: 269, SEQ ID NO: 271 и SEQ ID NO: 273 или их варианты, сохраняющие функциональность. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении FAP, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию "выступа", которая, в свою очередь, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с полипептидом IL-15. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 199 или ее вариант, сохраняющий функциональность. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении FAP, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию "впадины". В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 201 и SEQ ID NO: 207, или ее вариант, сохраняющий функциональность. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит легкую цепь Fab, специфического в отношении FAP. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 205 или SEQ ID NO: 211 или ее вариант, сохраняющий функциональность. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 205, полипептидную последовательность SEQ ID NO: 193 и полипептидную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199 и SEQ ID NO: 269, или их варианты, сохраняющие функциональность. В следующем варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 201, SEQ ID NO: 203 и SEQ ID NO: 205 или их варианты, сохраняющие функциональность. В еще одном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 207, SEQ ID NO: 209 и SEQ ID NO: 211 или их варианты, сохраняющие функциональность. В следующем варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 193 и SEQ ID NO: 269 или варианты, сохраняющие функциональность. Еще в одном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 207 и SEQ ID NO: 271 или их варианты, сохраняющие функциональность. В следующем варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 211, SEQ ID NO: 207 и SEQ ID NO: 273 или их варианты, сохраняющие функциональность. В другом конкретном варианте осуществления изобретения полипептиды ковалентно связаны, например, с помощью дисульфидного мостика. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая из субъединиц Fc-домена содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G.

В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении FAP, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию "впадины", которая в свою очередь объединена карбоксиконцевой пептидной связью с полипептидом IL-10. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 243 или SEQ ID NO: 245 или ее вариант, сохраняющий функциональность. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении FAP, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию "выступа". В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 241 или ее вариант, который сохраняет функциональность. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит легкую цепь Fab, специфического в отношении FAP. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 205 или ее вариант, который сохраняет функциональность. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 241 и SEQ ID NO: 243 или их варианты, сохраняющие функциональность. В следующем варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 205, SEQ ID NO: 241 и SEQ ID NO: 245 или их варианты, сохраняющие функциональность. В другом конкретном варианте осуществления изобретения полипептиды ковалентно связаны, например, с помощью дисульфидного мостика. В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая из субъединиц Fc-домена содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G.

В конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 210, SEQ ID NO: 244, SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 270, SEQ ID NO: 272 и SEQ ID NO: 274. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность,

кодируемую полинуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 204, SEQ ID NO: 210, SEQ ID NO: 244, SEQ ID NO: 246, SEQ ID NO: 270, SEQ ID NO: 272 и SEQ ID NO: 274. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 208 и SEQ ID NO: 242. В еще одном конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая выбрана из группы, включающей SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 208 и SEQ ID NO: 242. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 206 или SEQ ID NO: 212. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 206 или SEQ ID NO: 212.

В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит по меньшей мере один, как правило, два или большее количество антигенсвязывающих фрагментов, которые являются специфическими для карциноэмбрионального антигена (CEA). В конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариативной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 191 или SEQ ID NO: 295 или ее варианту, сохраняющему функциональность. В другом конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариативной области легкой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 189 или SEQ ID NO: 293 или ее варианту, сохраняющему функциональность. В более конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариативной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 191 или ее варианту, сохраняющему функциональность, и последовательность вариативной области легкой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 189 или ее варианту, сохраняющему функциональность. В другом конкретном варианте осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты иммуноконъюгата содержат последовательность вариативной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 295 или ее варианту, сохраняющему функциональность, и последовательность вариативной области легкой цепи, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности SEQ ID NO: 293 или ее варианту, сохраняющему функциональность.

В другом конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариативной области тяжелой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 192 или SEQ ID NO: 296. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариативной области тяжелой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 192 или SEQ ID NO: 296. В другом конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариативной области легкой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 190 или SEQ ID NO: 294. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения последовательность вариативной области легкой цепи антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата кодируется полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 190 или SEQ ID NO: 294.

В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении CEA, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию "выступа", которая, в свою очередь, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с полипептидом IL-2. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 229, SEQ ID NO: 275, SEQ ID NO: 277 и SEQ ID NO: 279 или их варианты, которые сохраняют функциональность. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении CEA, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию "впадины". В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 227, или SEQ ID NO: 281, или ее вариант, который

сохраняет функциональность. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит легкую цепь Fab, специфического в отношении CEA. В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 231, или SEQ ID NO: 283, или ее вариант, который сохраняет функциональность. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 227, SEQ ID NO: 229 и SEQ ID NO: 231 или их варианты, которые сохраняют функциональность. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 275, SEQ ID NO: 281 и SEQ ID NO: 283 или их варианты, которые сохраняют функциональность. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 277, SEQ ID NO: 281 и SEQ ID NO: 283 или их варианты, которые сохраняют функциональность. В другом варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 279, SEQ ID NO: 281 и SEQ ID NO: 283 или их варианты, которые сохраняют функциональность. В другом конкретном варианте осуществления изобретения полипептиды ковалентно связаны, например, с помощью дисульфидного мостика. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидная цепь Fc-домена содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G. В конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, которая кодируется полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 230, SEQ ID NO: 276, SEQ ID NO: 278 и SEQ ID NO: 280. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, которая кодируется полинуклеотидной последовательностью, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 230, SEQ ID NO: 276, SEQ ID NO: 278 и SEQ ID NO: 280. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 228 или SEQ ID NO: 282. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит а полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 228 или SEQ ID NO: 282. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 232 или SEQ ID NO: 284. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 232 или SEQ ID NO: 284.

В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой полипептид эффекторного фрагмента объединен карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, содержащей модификацию, которая приводит к образованию "выступа". В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 247, SEQ ID NO: 249 и SEQ ID NO: 251 или их варианты, которые сохраняют функциональность. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит также полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении FAP, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, содержащей модификацию, которая приводит к образованию "впадины". В более конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит также полипептидную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 201 и SEQ ID NO: 207 или их варианты, которые сохраняют функциональность. В другом указанном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит также полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, специфического в отношении EDB, TNC A1, TNC A2 или CEA, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, содержащей модификацию, которая приводит к образованию "впадины". В некоторых вариантах осуществления изобретения каждая из субъединиц Fc- домена содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G. Согласно любому из вышеуказанных вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат может содержать также легкую цепь Fab, специфического в отношении соответствующего антигена.

Иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, включают иммуноконъюгаты, имеющие последовательности, которые по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175, 177, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 191, 293, 295, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 227, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 241, 243, 245, 247, 249, 251, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285 и 287, включая их функциональные фрагменты или варианты. Изобретение относится также к иммуноконъюгатам, которые содержат указанные последовательности с консервативными аминокислотными заменами.

Полинуклеотиды

Изобретение относится также к выделенным полинуклеотидам, кодирующим иммуноконъюгаты, указанные в настоящем описании, или их фрагменты.

Полинуклеотиды, предлагаемые в изобретении, включают полинуклеотиды, которые по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны последовательностям, представленным в SEQ ID NO: 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 264, 266, 268, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286 и 288, включая их функциональные фрагменты или варианты.

Полинуклеотиды, кодирующие иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно экспрессировать в виде индивидуального полинуклеотида, который кодирует полный иммуноконъюгат, или в виде нескольких (например, двух или большего количества) совместно экспрессируемых полинуклеотидов. Полипептиды, кодируемые совместно экспрессируемыми полинуклеотидами, можно соединять, например, через дисульфидные мостики или другими путями с образованием функционального иммуноконъюгата. Например, представляющая собой легкую цепь часть антигенсвязывающего фрагмента может кодироваться полинуклеотидом, отличным от полинуклеотида, кодирующего часть иммуноконъюгата, содержащего область тяжелой цепи антигенсвязывающего фрагмента, субъединицы Fc-домена и необязательно эффекторного фрагмента. При совместной экспрессии полипептиды тяжелой цепи должны связываться с полипептидами легкой цепи с образованием антигенсвязывающего фрагмента. В другом примере часть иммуноконъюгата, содержащая область тяжелой цепи первого антигенсвязывающего фрагмента, одну из двух субъединиц Fc-домена и эффекторный фрагмент, может кодироваться полинуклеотидом, отличным от полинуклеотида, который кодирует часть иммуноконъюгата, содержащую область тяжелой цепи второго антигенсвязывающего фрагмента и вторую из двух субъединиц Fc-домена. При совместной экспрессии субъединицы Fc-домена должны связываться с образованием Fc-домена.

В одном из вариантов осуществления изобретения выделенный полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, кодирует фрагмент иммуноконъюгата, содержащий первый антигенсвязывающий фрагмент, Fc-домен, состоящий из двух субъединиц, и один эффекторный фрагмент, при этом, антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антигенсвязывающий домен, который содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, в частности молекулы Fab. В одном из вариантов осуществления изобретения выделенный полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, кодирует тяжелую цепь первого антигенсвязывающего фрагмента, субъединицу Fc-домена и эффекторный фрагмент. В другом варианте осуществления изобретения выделенный полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, кодирует тяжелую цепь первого антигенсвязывающего фрагмента и субъединицу Fc-домена. В следующем варианте осуществления изобретения выделенный полинуклеотид, предлагаемый в изобретении, кодирует субъединицу Fc-домена и эффекторный фрагмент. В более конкретном варианте осуществления изобретения выделенный полинуклеотид кодирует полипептид, в котором тяжелая цепь Fab объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена. В другом конкретном варианте осуществления изобретения выделенный полинуклеотид кодирует полипептид, в котором субъединица Fc-домена объединена карбоксиконцевой пептидной связью с полипептидом эффекторного фрагмента. В следующем конкретном варианте осуществления изобретения выделенный полинуклеотид кодирует полипептид, в котором тяжелая цепь Fab объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, которая в свою очередь объединена карбоксиконцевой пептидной связью с полипептидом эффекторного фрагмента. В другом конкретном варианте осуществления изобретения выделенный полинуклеотид кодирует полипептид, в котором полипептид эффекторного фрагмента объединен карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена.

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий иммуноконъюгат или его фрагмент, где полинуклеотид содержит последовательность, которая кодирует последовательность вариабельной области, представленную в SEQ ID NO 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175, 177, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 191, 193 или 195. Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий иммуноконъюгат или его фрагмент, где полинуклеотид содержит последовательность, которая кодирует полипептидную последовательность, представленную в SEQ ID NO 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 241, 243, 245, 247, 249, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285 или 287. Следующим вариантом осуществления изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий иммуноконъюгат или его фрагмент, где полинуклеотид содержит последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична нуклеотидной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80,

82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 264, 266, 268, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286 или 288. Другим вариантом осуществления изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий иммуноконъюгат или его фрагмент, где полинуклеотид содержит нуклеотидную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 182, 184, 186, 188, 190, 192, 194, 196, 198, 200, 202, 204, 206, 208, 210, 212, 214, 216, 218, 220, 222, 224, 226, 228, 230, 232, 234, 236, 238, 240, 242, 244, 246, 248, 250, 252, 254, 256, 258, 260, 262, 264, 266, 268, 270, 272, 274, 276, 278, 280, 282, 284, 286 или 288. Другим вариантом осуществления изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий иммуноконъюгат или его фрагмент, где полинуклеотид содержит последовательность, которая кодирует последовательность вариабельной области, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175, 177, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 191, 193 или 195. Другим вариантом осуществления изобретения является выделенный полинуклеотид, кодирующий иммуноконъюгат или его фрагмент, где полинуклеотид содержит последовательность, кодирующую полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 241, 243, 245, 247, 249, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285 или 287. Изобретение относится также к выделенному полинуклеотиду, кодирующему иммуноконъюгат или его фрагмент, где полинуклеотид содержит последовательность, которая кодирует последовательности вариабельной области SEQ ID NO: 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, 101, 103, 105, 107, 109, 111, 113, 115, 117, 119, 121, 123, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175, 177, 179, 181, 183, 185, 187, 189, 191, 193 или 195, имеющие консервативные аминокислотные замены. Изобретение относится также к выделенному полинуклеотиду, который кодирует иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, или его фрагмент, где полинуклеотид содержит последовательность, которая кодирует полипептидные последовательности SEQ ID NO: 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209, 211, 213, 215, 217, 219, 221, 223, 225, 227, 229, 231, 233, 235, 237, 239, 241, 243, 245, 247, 249, 251, 253, 255, 257, 259, 261, 263, 265, 267, 269, 271, 273, 275, 277, 279, 281, 283, 285 или 287, имеющие консервативные аминокислотные замены.

В определенных вариантах осуществления изобретения полинуклеотид или нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В других вариантах осуществления изобретения полинуклеотид, предлагаемый в настоящем изобретении, представляет собой РНК, например, в форме матричной РНК (мРНК). РНК, предлагаемая в настоящем изобретении, может быть одноцепочечной или двухцепочечной.

"Ненаправленные" (не имеющие специфической мишени) конъюгаты

Изобретение относится не только к иммуноконъюгатам, направленным к специфическому антигену (например, опухолевому антигену), но также и к "ненаправленным" конъюгатам, которые содержат одну или несколько молекул Fab, которые не связываются специфически с каким-либо антигеном, в частности не связываются с каким-либо человеческим антигеном. Отсутствие способности к специфическому связыванию у этих конъюгатов с каким-либо антигеном (т.е. отсутствие какого-либо связывания, которое можно отличить от неспецифического взаимодействия) можно оценивать, например, с помощью методов ELISA или резонанса поверхностного плазмона, которые представлены в настоящем описании. Указанные конъюгаты, в частности, можно применять, например, для удлинения времени полужизни в сыворотке эффекторного фрагмента по сравнению со временем полужизни в сыворотке неконъюгированного эффекторного фрагмента, когда не требуется направленный перенос к конкретной ткани.

В частности, в изобретении предложен конъюгат, который содержит первую молекулу Fab, которая не связывается специфически с каким-либо антигеном, Fc-домен, состоящий из двух субъединиц, и эффекторный фрагмент, где в конъюгате присутствует не более одного эффекторного фрагмента. Более конкретно, в изобретении предложен конъюгат, который содержит первую молекулу Fab, содержащую последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 299 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 297, Fc-домен, состоящий из двух субъединиц, и эффекторный фрагмент, где в конъюгате присутствует не более одного эффекторного фрагмента. Подобно предлагаемому в изобретении иммуноконъюгатам, конъюгаты могут иметь различные конфигурации, описанные в разделе "Форматы иммуноконъюгатов" (антигенсвязывающий фрагмент иммуноконъюгата можно заменять на молекулу Fab, которая не связывается специфически с каким-либо антигеном, такую как молекула Fab, которая содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 299 и

последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 297). Аналогично этому, особенности Fc-домена, а также эффекторного фрагмента, описанные выше в разделах "Fc-домен" и "Эффекторные фрагменты" для иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, равным образом применимы, индивидуально или в комбинации, к "ненаправленным" конъюгатам, предлагаемым в изобретении.

В конкретном варианте осуществления изобретения конъюгат содержит (I) молекулу иммуноглобулина, содержащую первую и вторую молекулу Fab, которая не связывается специфически с каким-либо антигеном, и Fc-домен, и (II) эффекторный фрагмент, где в конъюгате присутствует не более одного эффекторного фрагмента и где молекула иммуноглобулина представляет собой человеческий иммуноглобулин подкласса IgG₁; Fc-домен содержит модификацию, приводящую к образованию "выступа", в одной из его двух субъединиц и модификацию, приводящую к образованию "впадины", в другой из указанных субъединиц, и аминокислотные замены L234A, L235A и P329G в каждой из его субъединиц; и эффекторный фрагмент представляет собой молекулу IL-2, слитую с карбоксиконцевой аминокислотной одной из тяжелых цепей иммуноглобулина, необязательно через линкерный пептид. В конкретном варианте осуществления изобретения конъюгат содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 299 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 297.

В определенных вариантах осуществления изобретения конъюгат содержит (I) молекулу иммуноглобулина, которая содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 299 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 297, (II) эффекторный фрагмент, где в конъюгате присутствует не более одного эффекторного фрагмента. В одном из таких вариантов осуществления изобретения молекула иммуноглобулина представляет собой человеческий иммуноглобулин подкласса IgG₁. В одном из таких вариантов осуществления изобретения Fc-домен содержит модификацию, приводящую к образованию "выступа", в одной из его двух субъединиц и модификацию, приводящую к образованию "впадины", в другой из его двух субъединиц. В конкретном указанном варианте осуществления изобретения Fc-домен содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G в каждой из его субъединиц. В следующем указанном варианте осуществления изобретения эффекторный фрагмент представляет собой молекулу IL-2, слитую с карбоксиконцевой аминокислотой одной из тяжелых цепей иммуноглобулина, необязательно через линкерный пептид.

В одном из вариантов осуществления изобретения конъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab, который не связывается специфически с каким-либо антигеном, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, содержащей модификацию, приводящую к образованию "выступа", которая, в свою очередь, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с полипептидом IL-2. В более конкретном варианте осуществления изобретения конъюгат содержит полипептидную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 221, SEQ ID NO: 223, SEQ ID NO: 289 и SEQ ID NO: 291, или ее вариант, который сохраняет функциональность. В одном из вариантов осуществления изобретения конъюгат содержит полипептидную последовательность, в которой тяжелая цепь Fab-фрагмента, который не связывается специфически с каким-либо антигеном, объединена карбоксиконцевой пептидной связью с субъединицей Fc-домена, содержащей модификацию, приводящую к образованию "впадины". В более конкретном варианте осуществления изобретения конъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 219 или ее вариант, который сохраняет функциональность. В другом варианте осуществления изобретения конъюгат содержит легкую цепь Fab-фрагмента, который не связывается специфически с каким-либо антигеном. В более конкретном варианте осуществления изобретения конъюгат содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 225 или ее вариант, который сохраняет функциональность. В другом варианте осуществления изобретения конъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 221 и SEQ ID NO: 225 или их варианты, которые сохраняют функциональность. В другом варианте осуществления изобретения конъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 223 и SEQ ID NO: 225 или их варианты, которые сохраняют функциональность. В другом варианте осуществления изобретения конъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 289 и SEQ ID NO: 225 или их варианты, которые сохраняют функциональность. В другом варианте осуществления изобретения конъюгат содержит полипептидные последовательности SEQ ID NO: 219, SEQ ID NO: 291 и SEQ ID NO: 225 или их варианты, которые сохраняют функциональность. В другом конкретном варианте осуществления изобретения полипептиды ковалентно связаны, например, с помощью дисульфидного мостика. В некоторых вариантах осуществления изобретения полипептидные цепи Fc-домена содержат аминокислотные замены L234A, L235A и P329G.

В конкретном варианте осуществления изобретения конъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 300, SEQ ID NO: 220, SEQ ID NO: 222, SEQ ID NO: 224, SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO: 290 и SEQ ID NO: 292. В другом конкретном варианте осуществления изобретения иммуноконъюгат содержит полипептидную последовательность, кодируемую полинуклеотидной последовательностью, которая выбрана из группы, включающей SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 300, SEQ ID NO: 220, SEQ ID NO: 222, SEQ ID NO: 224, SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO: 290 и SEQ ID NO: 292.

Изобретение относится также к выделенному полинуклеотиду, который кодирует конъюгат, предлагаемый в изобретении, или его фрагмент. В конкретном варианте осуществления изобретения выделенный полинуклеотид содержит последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 298, SEQ ID NO: 300, SEQ ID NO: 220, SEQ ID NO: 222, SEQ ID NO: 224, SEQ ID NO: 226, SEQ ID NO: 290 и SEQ ID NO: 292. Изобретение относится также к экспрессионному вектору, содержащему выделенный полинуклеотид, и клетке-хозяину, содержащей выделенный полинуклеотид или экспрессионный вектор, предлагаемый в изобретении. Следующим объектом изобретения является способ получения конъюгата, предлагаемого в изобретении, заключающийся в том, что осуществляют стадии, на которых а) культивируют клетку-хозяин, предлагаемую в изобретении, в условиях, пригодных для экспрессии конъюгата, и б) выделяют конъюгат. Изобретение относится также к конъюгату, полученному способом, предлагаемым в изобретении. В настоящем описании представлены способы получения иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении (см., например, раздел "Методы рекомбинации"), которые равным образом можно применять к конъюгатам, предлагаемым в изобретении.

Изобретение относится также к фармацевтической композиции, которая содержит конъюгат, предлагаемый в изобретении, и фармацевтически приемлемый носитель. В настоящем описании представлены фармацевтические композиции иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении (см., например, раздел "Композиции, препаративные формы и пути введения"), которые равным образом можно применять к конъюгатам, предлагаемым в изобретении.

Кроме того, конъюгаты можно применять в способах применения, представленных в настоящем описании для иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении. В настоящем описании представлены способы применения иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, для лечения заболевания (см., например, разделы "Терапевтические методы и композиции", "Другие агенты и пути лечения" и "Изделия"), которые равным образом можно применять к конъюгатам, предлагаемым в изобретении.

Методы рекомбинации

Иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно получать, например, путем твердофазного пептидного синтеза (например, твердофазный синтез Меррифилда) или методом рекомбинации. Для рекомбинантного получения один или несколько полинуклеотидов, кодирующих иммуноконъюгат (фрагмент), например описанный выше, выделяют и встраивают в один или несколько векторов для дополнительного клонирования и/или экспрессии в клетке-хозяине. Указанный полинуклеотид легко выделять и секвенировать с помощью общепринятых процедур. Одним из вариантов осуществления изобретения является вектор, предпочтительно экспрессионный вектор, содержащий один или несколько полинуклеотидов, предлагаемых в изобретении. Методы, хорошо известные специалистам в данной области, можно применять для конструирования экспрессионных векторов, содержащих кодирующую последовательность иммуноконъюгата (фрагмента) наряду с приемлемыми контролирующими транскрипцию/трансляцию сигналами. Эти методы включают технологии рекомбинантной ДНК *in vitro*, методы синтеза и рекомбинации/генетической рекомбинации *in vivo* (см., например, методы, описанные у Maniatis и др., Maniatis и др., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., 1989; и Ausubel и др., *Current Protocols in Molecular Biology*, изд-во Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989). Экспрессионный вектор может представлять собой часть плазмиды, вируса или может представлять собой фрагмент нуклеиновой кислоты. Экспрессионный вектор включает кассету экспрессии, в которой полинуклеотид, кодирующий иммуноконъюгат (фрагмент) (т.е. кодирующую область), клонируют с обеспечением функциональной связи с промотором и/или другими элементами, контролирующими транскрипцию или трансляцию. В контексте настоящего описания "кодирующая область" представляет собой часть нуклеиновой кислоты, которая состоит из кодонов, транслируемых в аминокислоты. Хотя "стоп-кодон" (TAG, TGA или TAA) не транслируется в аминокислоту, он, в случае его присутствия, может рассматриваться как часть кодирующей области, однако любые фланкирующие последовательности, например промоторы, сайты связывания рибосом, терминаторы транскрипции, интроны, 5'- и 3'-нетранслируемые области и т.п., не являются частью кодирующей области. Две или большее количество кодирующих областей может присутствовать в индивидуальной полинуклеотидной конструкции, например индивидуальном векторе, или в отдельных полинуклеотидных конструкциях, например отдельных (различных) векторах. Кроме того, любой вектор может содержать одну кодирующую область или может содержать две или большее количество кодирующих областей, например вектор, предлагаемый в настоящем изобретении, может кодировать один или несколько полипептидов, которые пост- или котрансляционно разделяются на конечные белки посредством протеолитического расщепления. Кроме того, вектор, полинуклеотид или нуклеиновая кислота, предлагаемый/предлагаемая в изобретении, может кодировать гетерологичные кодирующие области, либо слитые, либо не слитые с полинуклеотидом, который кодирует иммуноконъюгат (фрагмент), предлагаемый в изобретении, или его вариант или производное. Гетерологичные кодирующие области включают (но не ограничиваясь только ими) специализированные элементы или мотивы, такие как секреторный сигнальный пептид или гетерологичный функциональный домен. Функциональная связь имеет место, когда кодирующая область генного продукта, например полипептида, ассоциирована с одной или несколькими регуляторными после-

довательностями таким образом, чтобы экспрессия генного продукта находилась под воздействием или контролем регуляторной(ых) последовательности(ей). Два ДНК-фрагмента (таких как кодирующая область полипептида и ассоциированный с ней промотор) являются "функционально связанными", если индукция промоторной функции приводит к транскрипции мРНК, кодирующей требуемый генный продукт, и если природа связи между двумя ДНК-фрагментами не оказывает воздействия на способность регулирующих экспрессию последовательностей направлять экспрессию генного продукта, или не оказывает воздействия на способность ДНК-матрицы к транскрипции. Таким образом, промоторная область должна быть функционально связана с нуклеиновой кислотой, кодирующей полипептид, если промотор обладает способностью осуществлять транскрипцию нуклеиновой кислоты. Промотор может представлять собой специфический для клетки промотор, который обеспечивает значительную транскрипцию ДНК только в предварительно отобранных клетках. Другие контролирующие транскрипцию элементы, помимо промотора, например энхансеры, операторы, репрессоры и сигналы терминации транскрипции, можно функционально связывать с полинуклеотидом для обеспечения специфической для клетки транскрипции. Приемлемые промоторы и другие контролирующие транскрипцию области представлены в настоящем описании. Специалистам в данной области известно широкое разнообразие контролирующих транскрипцию областей. Они включают (но не ограничиваясь только ими) контролирующие транскрипцию области, которые функционируют в клетках позвоночных животных, такие как (но, не ограничиваясь только ими) сегменты промоторов и энхансеров из цитомегаловирусов (например, немедленно-ранний промотор в сочетании с интроном-А), обезьяньего вируса 40 (например, ранний промотор) и ретровирусов (таких как вирус саркомы Рауса). Другие контролирующие транскрипцию области включают области, выведенные из генов позвоночных животных, таких как ген актина, белка теплового шока, бычьего гормона роста и кроличьего β -глобина, а также другие последовательности, которые могут контролировать экспрессию генов в эукариотических клетках. Дополнительные приемлемые контролирующие транскрипцию области включают тканеспецифические промоторы и энхансеры, а также индуцибельные промоторы (например, промоторы, индуцируемые тетрациклином). Аналогично этому, обычным специалистам в данной области известно широкое разнообразие контролирующих трансляцию элементов. Они включают (но не ограничиваясь только ими) сайты связывания рибосом, кодоны инициации трансляции и терминирующие кодоны и элементы, выведенные из вирусных систем (в частности, внутренний сайт связывания (посадки) рибосом или IRES, который обозначают так же как CITE-последовательность). Кассета экспрессии может включать также другие характерные структуры, такие как сайт инициации репликации и/или интегрированные в хромосому элементы, такие как длинные концевые повторы (LTR) ретровирусов, или инвертированные концевые повторы (ITR) аденоассоциированного вируса (AAV).

Кодирующие области полинуклеотида и нуклеиновой кислоты, предлагаемые в настоящем изобретении, могут быть ассоциированы с дополнительными кодирующими областями, которые кодируют секреторные или сигнальные пептиды, которые направляют секрецию полипептида, кодируемого полинуклеотидом, предлагаемым в настоящем изобретении. Например, если требуется секреция иммуноконъюгата, то ДНК, кодирующая сигнальную последовательность, можно помещать против хода транскрипции относительно нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, или их фрагмент. Согласно гипотезе, касающейся сигналов, белки, секретируемые клетками млекопитающих, имеют сигнальный пептид или секреторную лидерную последовательность, который/которая отщепляется от зрелого белка после инициации экспорта растущей белковой цепи через шероховатый эндоплазматический ретикулум. Обычным специалистам в данной области должно быть очевидно, что полипептиды, секретируемые клетками позвоночных животных, как правило, имеют сигнальный пептид, слитый с N-концом полипептида, который отщепляется от транслируемого полипептида с образованием секретрируемой или "зрелой" формы полипептида. В некоторых вариантах осуществления изобретения используют нативный сигнальный пептид, например сигнальный пептид тяжелой цепи или легкой цепи иммуноглобулина или функциональное производное указанной последовательности, которое сохраняет способность обеспечивать секрецию полипептида, функционально связанного с ним. Альтернативно этому, можно применять гетерологичный сигнальный пептид млекопитающих или его функциональное производное. Например, лидерную последовательность дикого типа можно заменять на лидерную последовательность человеческого тканевого активатора плазминогена (ТРА) или мышинной β -глюкуронидазы. Примеры аминокислотных и полинуклеотидных последовательностей секреторных сигнальных пептидов представлены в SEQ ID NO: 8-16.

ДНК, кодирующую короткую белковую последовательность, которую можно применять для облегчения дальнейшей очистки (например, гистидиновую метку), или предназначенную для мечения иммуноконъюгата, можно включать внутрь или на концы полинуклеотида, кодирующего иммуноконъюгат (фрагмент).

Дополнительным вариантом осуществления изобретения является клетка-хозяин, содержащая один или несколько полинуклеотидов, предлагаемых в изобретении. Некоторыми вариантами осуществления изобретения является клетка-хозяин, содержащая один или несколько векторов, предлагаемых в изобретении. Полинуклеотиды и векторы могут обладать любыми особенностями, индивидуально или в соче-

тании, указанными в настоящем описании касательно полинуклеотидов и векторов соответственно. В одном из таких вариантов осуществления изобретения клетка-хозяин содержит (например, трансформирована или трансфектирована) вектором, содержащим полинуклеотид, который кодирует (часть) иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении. В контексте настоящего описания понятие "клетка-хозяин" относится к любому типу клеточной системы, которую можно конструировать для получения иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, и их фрагментов. Клетки-хозяева, пригодные для репликации и для поддержания экспрессии иммуноконъюгатов, хорошо известны в данной области. Такие клетки можно трансфектировать или трансдуцировать соответствующим образом конкретным экспрессионным вектором и можно выращивать большее количество содержащих вектор клеток с целью внесения в ферментеры для крупномасштабных процессов получения иммуноконъюгата в достаточных для клинических применений количествах. Приемлемыми клетками-хозяевами являются прокариотические микроорганизмы, такие как *E. coli*, или различные эукариотические клетки, такие как клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки насекомых или т.п. Например, полипептиды можно получать в бактериях, в частности, когда отсутствует потребность в гликозилировании. После экспрессии полипептид можно выделять из пасты бактериальных клеток в растворимую фракцию и можно дополнительно очищать. Помимо прокариот, в качестве хозяев для клонирования или экспрессии векторов, которые кодируют полипептид, можно использовать эукариотические микроорганизмы, такие как нитчатые грибы или дрожжи, включая штаммы грибов и дрожжей, пути гликозилирования которых были "гуманизированы", что позволяет получать полипептид с частично или полностью человеческой схемой гликозилирования (см. Gerngross, Nat. Biotech. 22, 2004, сс. 1409-1414 и Li и др., Nat. Biotech. 24, 2006, сс. 210-215). Клетки-хозяева, которые можно использовать для экспрессии (гликозилированных) полипептидов, получают также из многоклеточных организмов (беспозвоночных и позвоночных животных). Примерами клеток беспозвоночных являются клетки насекомых, а также можно применять клетки растений. Были выявлены многочисленные бакуловирусные штаммы и соответствующие пригодные для них в качестве хозяев клетки насекомых, прежде всего для трансфекции клеток *Spodoptera frugiperda*. В качестве хозяев можно применять также культуры растительных клеток (см., например, US №№ 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 и 6417429 (описание технологии PLANTIBODIES™ для получения антител в трансгенных растениях). В качестве хозяев можно применять также клетки позвоночных животных. Например, можно использовать клеточные линии млекопитающих, которые адаптированы к росту в суспензии. Другими примерами приемлемых линий клеток-хозяев млекопитающих являются линия клеток почки обезьяны CV1, трансформированная с помощью SV40 (COS-7); линия клеток почки эмбриона человека (293 или клетки линии 293, субклонированные с целью выращивания в суспензионной культуре, Graham и др., J. Gen. Virol., 36, 1977, с. 59); клетки почки детеныша хомяка (BHK); клетки Сертоли мыши (TM4-клетки, описанные, например, у Mather, Biol. Reprod., 23, 1980, сс. 243-251); клетки почки обезьяны (CV1); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76); клетки карциномы шейки матки человека (HELA); клетки почки собаки (MDCK); клетки печени бычьей крысы (BRL 3A); клетки легкого человека (W138); клетки печени человека (Hep G2); клетки опухоли молочной железы мыши (MMT 060562); клетки TRI, описанные, например, у Mather и др., Annals N.Y. Acad. Sci., 383, 1982, сс. 44-68); клетки MRC 5 и клетки FS4. Другими ценными линиями клеток-хозяев млекопитающих являются клетки яичника китайского хомячка (CHO), включая dhfr-CHO-клетки (Urlaub и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 1980, с. 4216); и клеточные линии миеломы, такие как Y0, NS0 и Sp2/0. Обзор конкретных линий клеток-хозяев млекопитающих, которые можно применять для производства белка, см., например, у Yazaki и Wu, в Methods in Molecular Biology под ред. B.K.C. Lo, изд-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 248, 2003, сс. 255-268. Клетки-хозяева включают культивируемые клетки, например культивируемые клетки млекопитающих, клетки дрожжей, клетки насекомых, клетки бактерий и клетки растений (но не ограничиваясь только ими), а также клетки, находящиеся в организме трансгенного животного, трансгенного растения или культивируемой растительной или животной ткани. В одном из вариантов осуществления изобретения клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку, предпочтительно клетку млекопитающего, такую как клетка яичника китайского хомячка (CHO), клетка почки человеческого эмбриона (HEK) или лимфоидная клетка (например, клетка Y0, NS0, Sp20).

В данной области известны стандартные технологии для экспрессии чужеродных генов в этих системах. Клетки, экспрессирующие полипептид, содержащий либо тяжелую, либо легкую цепь антигенсвязывающего домена, такого как антитело, можно конструировать таким образом, чтобы в них происходила экспрессия других цепей антитела, например, таким образом, чтобы экспрессируемый продукт представлял собой антитело, которое имеет как тяжелую, так и легкую цепь.

Одним из вариантов осуществления изобретения является способ получения иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, заключающийся в том, что культивируют клетку-хозяин, содержащую полинуклеотид, который кодирует иммуноконъюгат, представленный в настоящем описании, в условиях, пригодных для экспрессии иммуноконъюгата, и необязательно выделяют иммуноконъюгат из клетки-хозяина (или культуральной среды клетки-хозяина).

Компоненты иммуноконъюгата генетически слиты друг с другом. Иммуноконъюгаты можно создавать так, чтобы их компоненты сливать друг с другом непосредственно или косвенно через линкерную

последовательность. Состав и длину линкера можно определять с помощью методов, хорошо известных в данной области, и можно оценивать эффективность. Примеры линкерных последовательностей, расположенных между эффекторным фрагментом и Fc-доменом, представлены в последовательностях SEQ ID NO: 195, 197, 199, 203, 209, 215, 229, 235, 237, 243, 245, 247, 249, 251, 269, 271, 273, 275, 277, 279 и 285. Можно включать также дополнительные последовательности для встраивания сайта расщепления, если требуется разделение индивидуальных компонентов слияния, например последовательность, распознаваемую эндопептидазой.

В некоторых вариантах осуществления изобретения один или несколько антигенсвязывающих фрагментов иммуноконъюгата содержит(ат), по меньшей мере, переменную область антитела, обладающую способностью связываться с антигенной детерминантой. Переменные области могут образовывать часть встречающихся в естественных условиях или не встречающихся в естественных условиях антител или их фрагментов или могут быть выведены из них. Методы получения поликлональных антител и моноклональных антител хорошо известны в данной области (см., например, Harlow и Lane, "Antibodies a Laboratory Manual", изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, 1988). Не встречающиеся в естественных условиях антитела можно создавать с помощью твердофазного пептидного синтеза, можно получать с помощью методов рекомбинации (например, описанных в US № 4186567) или можно получать, например, путем скрининга комбинаторных библиотек, содержащих переменные области тяжелых цепей и переменные области легких цепей (см., например, US № 5969108 на имя McCafferty). Антигенсвязывающие фрагменты и методы их получения подробно описаны также в публикации PCT WO 2011/020783, полное содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Любые виды антител, фрагментов антител, антигенсвязывающих доменов или переменных областей животного происхождения можно применять в иммуноконъюгатах, предлагаемых в изобретении. Примерами антител, фрагментов антител, антигенсвязывающих доменов или переменных областей, которые можно применять согласно настоящему изобретению, являются (но не ограничиваясь только ими) конструкции, полученные из организма мышей, приматов или человека. Если иммуноконъюгат предназначен для применения на человеке, то можно применять химерную форму антитела, в которой константные области антитела получают из человеческого антитела. Гуманизированную или полностью человеческую форму антитела можно получать также с помощью методов, хорошо известных в данной области (см., например, US № 5565332 на имя Winter). Для осуществления гуманизации можно применять различные методы, такие как (но не ограничиваясь только ими) (а) трансплантация нечеловеческих (например, из антитела-донора) CDR в человеческий (например, антитело-реципиент) каркасный участок и константные области, сохраняющие или не сохраняющие имеющие решающее значение остатки каркасного участка (например, остатки, важные для сохранения хорошей антигенсвязывающей аффинности или функций антитела), (б) трансплантация только нечеловеческих определяющих специфичность участков (SDR или a-CDR; остатки имеют решающее значение для взаимодействия антитело-антиген) в человеческий каркасный участок и константные области, или (в) трансплантация полных нечеловеческих переменных доменов, но их "маскировка" напоминающим человеческий сегментом путем замены поверхностных остатков. Обзор гуманизированных антител и методов их получения см., например, у Altamagro и Fransson, *Front Biosci* 13, 12008, сс. 1619-1633, и они описаны также, например, у Riechmann и др., *Nature* 332, 1988, сс. 323-329; Queen и др., *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 1989, сс. 10029-10033; US №№ 5821337, 7527791, 6982321 и 7087409; Jones и др., *Nature* 321, 1986, сс. 522-525; Morrison и др., *Proc Natl Acad Sci* 81, 1984, сс. 6851-6855; Morrison и Oi, *Adv Immunol* 44, 1988, сс. 65-92; Verhoeyen и др., *Science* 239, 1988, сс. 1534-1536; Padlan, *Molec Immunol* 31(3), 1994, сс. 169-217; Kashmiri и др., *Methods* 36, 2005, сс. 25-34 (описание трансплантации SDR (a-CDR)); Padlan, *Mol. Immunol.* 28, 1991, сс. 489-498 (описание "повторного покрытия"); Dall'Acqua и др., *Methods* 36, 2005, сс. 43-60 (описание "перестановки FR") и Osbourn и др., *Methods* 36, 2005, сс. 61-68, и Klimka и др., *Br. J. Cancer.* 83, 2000, сс. 252-260 (описание подхода на основе "целенаправленной селекции" для перестановки FR). Человеческие антитела и человеческие переменные области можно получать с помощью различных методик, известных в данной области. Человеческие антитела описаны в целом у van Dijk и van de Winkel, *Curr Opin Pharmacol* 5, 2001, сс. 368-374 и Lonberg, *Curr Opin Immunol* 20, 2008, сс. 450-459. Человеческие переменные области могут образовывать часть человеческих моноклональных антител или могут быть получены из них с помощью метода гибридом (см., например, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, изд-во Marcel Dekker, Inc., New York, 1987, сс. 51-63). Человеческие антитела и человеческие переменные области можно получать также путем введения иммуногена трансгенному животному, которое модифицировано таким образом, что может продуцировать интактные человеческие антитела или интактные антитела с человеческими переменными областями в ответ на контрольное заражение антигеном (см., например, Lonberg, *Nat Biotech* 23, 2005, сс. 1117-1125). Человеческие антитела и человеческие переменные области можно создавать также путем выделения последовательностей переменных областей Fv-клона, отобранных из человеческих фаговых дисплейных библиотек (см., например, Hoogenboom и др. в *Methods in Molecular Biology*, под ред. O'Brien и др., изд-во Human Press, Totowa, NJ, 178, 2001, сс. 1-37); и McCafferty и др., *Nature* 348, 552-554; Clackson и др., *Nature* 352, 1991, сс. 624-628). Фаг, как правило, экспонирует фрагменты антител либо в виде одноцепочечных Fv- (scFv)-фрагментов, либо в виде Fab-

фрагментов. Подробное описание получения антигенсвязывающих фрагментов для иммуноконъюгатов с помощью фагового дисплея представлено в примерах, прилагаемых к публикации PCT WO 2011/020783.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающие фрагменты, пригодные для применения согласно настоящему изобретению, создают так, чтобы они обладали повышенной аффинностью связывания, например, с помощью методов, описанных в публикации PCT WO 2011/020783 (см. примеры, касающиеся созревания аффинности) или публикации заявки на патент США № 2004/0132066, полное содержание которых включено в настоящее описание в качестве ссылки. Способность иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, связываться со специфической антигенной детерминантой можно оценивать количественно либо с помощью твердофазного ферментного анализа (ELISA), либо другими методиками, известными специалисту в данной области, например, с помощью метода резонанса поверхностно плазмона (осуществляя анализ с использованием системы BIACORE T100) (Liljeblad и др., Glyco J. 17, 2000, сс. 323-329), и традиционных анализов связывания (Heeley, Endocr Res 28, 2002, сс. 217-229). Анализы в условиях конкуренции можно применять для идентификации антитела, фрагмента антитела, антигенсвязывающего домена или переменного домена, конкурирующего с референс-антителом за связывание с конкретным антигеном, например антитела, которое конкурирует с антителом L19 за связывание с экстра-доменом В фибронектина (EDB). В некоторых вариантах осуществления изобретения указанное конкурирующее антитело связывается с тем же эпитопом (например, линейным или конформационным эпитопом), с которым связывается референс-антитело. Подробные приведенные в качестве примеров методы картирования эпитопа, с которым связывается антитело, представлены у Morris, "Epitope Mapping Protocols", в Methods in Molecular Biology, изд-во Humana Press, Totowa, NJ, т. 66, 1996. При осуществлении приведенного в качестве примера анализа в условиях конкуренции иммобилизованный антиген (например, EDB) инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, которое связывается с антигеном (например, антитело L19), и вторым немеченым антителом, которое подлежит тестированию в отношении его способности конкурировать с первым антителом за связывание с антигеном. Второе антитело может присутствовать в супернатанте гибридомы. В качестве контроля иммобилизованный антиген инкубируют в растворе, содержащем первое меченое антитело, но не содержащем второе немеченое антитело. После инкубации в условиях, обеспечивающих связывание первого антитела с антигеном, избыток несвязанного антитела удаляют и оценивают количество метки, ассоциированной с иммобилизованным антигеном. Если количество метки, ассоциированной с иммобилизованным антигеном, существенно снижено в тестируемом образце по сравнению с контрольным образцом, то это свидетельствует о том, что второе антитело конкурирует с первым антителом за связывание с антигеном (см. Harlow и Lane. Antibodies: A Laboratory Manual, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, гл. 14, 1988).

Иммуноконъюгаты, полученные с помощью представленных в настоящем описании методов, можно очищать с использованием известных в данной области методик, таких как жидкостная хроматография высокого разрешения, ионообменная хроматография, гель-электрофорез, аффинная хроматография, гель-фильтрация и т.п. Фактические условия, применяемые для очистки конкретного белка, зависят, в частности, от таких факторов, как чистый заряд, гидрофильность и т.д., и они должны быть очевидны специалисту в данной области. Для очистки антитела с помощью аффинной хроматографии можно использовать лиганд, рецептор или антиген, с которым связывается иммуноконъюгат. Например, для очистки с помощью аффинной хроматографии иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, можно использовать матрикс с белком А или белком G. Например, последовательное применение аффинной хроматографии на белке А или G и гель-фильтрации можно применять для выделения иммуноконъюгата, практически согласно методу, описанному в разделе "Примеры". Чистоту иммуноконъюгатов можно определять с помощью любого из широкого разнообразия хорошо известных аналитических методов, включая гель-электрофорез, жидкостную хроматографию высокого давления и т.п. Например, установлено, что содержащие тяжелые цепи слитые белки, которые экспрессировали согласно описанным в разделе "Примеры" методам, являются интактными и правильно собранными, что продемонстрировано с помощью ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях (см., например, фиг. 4). Разделяли три полосы, соответствующие примерно Mr 25000, Mr 50000 и Mr 60000, которые соответствовали предсказанным молекулярным массам легкой цепи, тяжелой цепи иммуноглобулина и слитому белку тяжелая цепь/эффекторный фрагмент.

Анализы

Представленные в настоящем описании иммуноконъюгаты можно идентифицировать, подвергать скринингу или характеризовать их физические/химические свойства и/или виды биологической активности с помощью различных анализов, известных в данной области.

Анализ аффинности.

Аффинность иммуноконъюгата к рецептору эффекторного фрагмента (например, IL-10R или различных форм IL-2R), Fc-рецептору или антигену-мишени можно определять согласно методу, описанному в разделе "Примеры" с помощью резонанса поверхностного плазмона (SPR), используя стандартную инструментальную базу, например устройство BIACore (фирма GE Healthcare), и рецепторы или белки-мишени, которые можно получать с помощью рекомбинантной экспрессии. Альтернативно этому, свя-

звание иммуноконъюгатов с различными рецепторами или антигенами-мишенями можно оценивать с использованием клеточных линий, экспрессирующих конкретный рецептор или антиген-мишень, например, с помощью проточной цитометрии (FACS). Конкретный иллюстративный и приведенный в качестве примера вариант измерения аффинности связывания описан ниже в разделе "Примеры".

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения величину K_D измеряли методом резонанса поверхностного плазмона с помощью устройства BIACORE® T100 (фирма GE Healthcare) при 25°C с использованием лиганда (например, рецептора эффекторного фрагмента, Fc-рецептора или антигена-мишени), иммобилизованного на CM5-чипах. В целом, метод состоял в следующем: биосенсорные чипы из карбоксиметилированного декстрана (CM5, фирма GE Healthcare) активировали с помощью гидрохлорида N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимид (NHS) согласно инструкциям поставщика. Рекомбинантный лиганд разводили 10 mM ацетатом натрия, pH 5,5 до концентрации 0,5-30 мкг/мл перед инъекцией со скоростью потока 10 мкл/мин для достижения примерно 100-5000 ед. ответа (RU) связанного белка. После инъекции лиганда инъецировали 1M этаноламина для блокады непрореагировавших групп. Для кинетических измерений инъецировали трех-пятикратные серийные разведения иммуноконъюгата (диапазон от ~0,01 до 300 nM) в буфере HBS-EP+ (фирма GE Healthcare, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM ЭДТК, 0,05% сурфактанта P20, pH 7,4) при 25°C со скоростью потока примерно 30-50 мкл/мин. Скорость реакции ассоциации (k_{on}) и реакции диссоциации (k_{off}) рассчитывали с использованием простой модели связывания Ленгмюра 1:1 (программа BIACORE® T100 Evaluation Software, версия 1.1.1) путем одновременной аппроксимации сенсограмм ассоциации и диссоциации. Константу равновесия реакции диссоциации (K_D) рассчитывали как соотношение k_{off}/k_{on} (см., например, Chen и др., J. Mol. Biol. 293, 1999, сс. 865-881).

Анализ активности.

Биологическую активность иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, можно определять с помощью различных анализов, описанных в разделе "Примеры". Виды биологической активности могут включать, например, индукцию пролиферации несущих рецептор эффекторного фрагмента клеток, индукцию передачи сигнала несущих рецептор эффекторного фрагмента клеток, индукцию секреции цитокинов несущими рецептор эффекторного фрагмента клетками, и индукцию регресса опухоли и/или повышение времени выживания.

Композиции, препаративные формы и пути введения

Следующим объектом изобретения являются фармацевтические композиции, содержащие любой из иммуноконъюгатов, представленных в настоящем описании, например, предназначенные для применения в любом из указанных ниже терапевтических методов. В одном из вариантов осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит любой из иммуноконъюгатов, представленных в настоящем описании, и фармацевтически приемлемый носитель. В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит любой из иммуноконъюгатов, представленных в настоящем описании, и по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например указанное ниже.

Кроме того, представлен способ получения иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, в форме, пригодной для введения *in vivo*, заключающийся в том, что (а) получают иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, и (б) объединяют в препаративной форме иммуноконъюгат по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым носителем, где приготовленный препарат иммуноконъюгата, пригоден для применения *in vivo*.

Фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, содержат в терапевтически эффективном количестве один или несколько иммуноконъюгатов, который(ые) растворен(ы) или диспергирован(ы) в фармацевтически приемлемом носителе. Понятия "фармацевтически или фармакологически приемлемый" относится к молекулярным субстанциям и композициям, которые, в целом, нетоксичны для реципиентов в применяемых дозах и концентрациях, т.е. не вызывают вредные, аллергические или другие нежелательные реакции при введении при необходимости животному, такому, например, как человек. Приготовление фармацевтической композиции, которая содержит по меньшей мере один иммуноконъюгат и необязательно дополнительное действующее вещество, должно быть очевидно специалистам в данной области в свете настоящего описания, например, из справочника Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-е изд., изд-во Mack Printing Company, 1990, включенного в настоящее описание в качестве ссылки. Кроме того, очевидно, что препараты, предназначенные для введения животному (например, человеку), должны удовлетворять требованиям стандартов стерильности, пирогенности и общей безопасности и чистоты, разработанных отделением биологических стандартов (Управление контроля пищевых продуктов и лекарственных средств) FDA или соответствующим уполномоченным органом других стран. Предпочтительными композициями являются лиофилизированные препаративные формы или водные растворы. В контексте настоящего описания "фармацевтически приемлемый носитель" включает любые и все растворители, буферы, дисперсионные среды, покрытия, поверхностно-активные вещества, антиоксиданты, консерванты (например, антибактериальные агенты, противогрибковые агенты), агенты для придания изотоничности, замедляющие абсорбцию агенты, соли, белки, лекарственные средства,

стабилизаторы лекарственных средств, полимеры, гели, связующие вещества, эксципиенты, разрыхлители, замасливатели, подслащивающие вещества, корригенты, красители и подобные материалы и их комбинации, которые должны быть известны обычному специалисту в данной области (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-е изд., изд-во Mack Printing Company, 1990, сс. 1289-1329, включенный в настоящее описание в качестве ссылки). В терапевтических или фармацевтических композициях можно применять любой общепринятый носитель, если только он совместим с действующим веществом. Композиция может содержать различные типы носителей в зависимости от того, вводят ли ее в твердой, жидкой или аэрозольной форме, и от того, должна ли она быть стерильной, как в случае использования таких путей введения, как инъекция. Иммуноконъюгаты, предлагаемые в настоящем изобретении (и дополнительное терапевтическое средство), можно вводить внутривенно, внутрикожно, внутриартериально, внутрибрюшинно, внутрь повреждения, внутрь черепа, внутрь сустава, внутрь предстательной железы, внутрь селезенки, внутрирентально, внутриплеврально, внутритрахеально, внутриназально, внутрь стекловидного тела, внутривагинально, внутривнутриректально, внутрь опухоли, внутримышечно, внутрибрюшинно, подкожно, подконъюнктивально, интравезикулярно, в слизистую оболочку, интраперикардially, внутрь пуповины, интраокулярно, орально, топикально, место, путем ингаляции (например, аэрозольной ингаляции), инъекции, инфузии, непрерывной инфузии, локализованной перфузии, омывающей непосредственно клетки-мишени, через катетер, посредством лаважа, в виде кремов, в липидных композициях (например, липосомах), или с помощью любого другого метода или любой комбинации вышеуказанных путей, известных обычному специалисту в данной области (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18-е изд., изд-во Mack Printing Company, 1990, включенный в настоящее описание в качестве ссылки). Для введения молекул полипептидов, таких как иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, наиболее часто применяют парентеральное введение, в частности внутривенную инъекцию.

Парентеральные композиции включают композиции, созданные для введения путем инъекции, например, подкожной, внутрикожной, внутрь повреждения, внутривенной, внутриартериальной, внутримышечной, подболовочной или внутрибрюшинной инъекции. Для инъекции иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно включать в препаративные формы в виде водных растворов, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический соляной буфер. Раствор может содержать предназначенные для получения препаративной формы агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Альтернативно этому, иммуноконъюгаты могут находиться в порошкообразной форме, предназначенной для восстановления перед применением приемлемым наполнителем, например стерильной не содержащей пирогенов водой. Стерильные инъекционные растворы готовят путем включения иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, в требуемом количестве в соответствующий растворитель при необходимости в сочетании с различными другими ингредиентами, перечисленными ниже. Стерильность можно легко обеспечивать, например, путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны. Как правило, дисперсии получают путем включения различных стерилизованных действующих веществ в стерильный наполнитель, который содержит основную дисперсионную среду и/или другие ингредиенты. В случае стерильных порошков для получения стерильных инъекционных растворов, суспензий или эмульсий предпочтительными методами получения являются вакуумная сушка или сушка вымораживанием, которые позволяют получать порошок действующего вещества в сочетании с любым дополнительным требуемым ингредиентом из предварительно стерилизованной фильтрацией жидкой среды. При необходимости жидкая среда перед осуществлением инъекции должна быть соответствующим образом забуферена и жидкому разбавителю сначала придана изотоничность с помощью достаточного количества соляного раствора или глюкозы. Композиция должна быть стабильной с условиями приготовления и хранения и защищена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Принято поддерживать загрязнение эндотоксинами на минимальном безопасном уровне, например менее 0,5 нг/мг белка. Пригодные фармацевтически приемлемые носители включают (но не ограничиваясь только ими) буферы, такие как фосфатный, цитратный и буферы на основе других органических кислот; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензилламмонийхлорид; гексаметионийхлорид; бензалконийхлорид; бензетонийхлорид; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол, резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол и метакрезол); низкомолекулярные (содержащие менее примерно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как ЭДТК; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы с металлами (например, комплексы Zn-белок); и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль (ПЭГ). Водные суспензии для инъекций могут содержать соединения, которые повышают вязкость суспензии, такие как натриевая соль карбоксиметилцеллюлозы, сорбит, декстран или т.п. Необязательно суспензия может содержать также стабилизаторы или агенты, которые повышают растворимость соединений, что позволяет получать высококонцентрированные растворы. Кроме того, суспензии действующих веществ

можно получать в виде соответствующих масляных предназначенных для инъекции суспензий. Приемлемые липофильные растворители или наполнители включают жирные нелетучие масла, такие как кунжутное масло, или синтетические эфиры жирных кислот, такие как этилолеаты или триглицериды, или липосомы.

Действующие вещества можно заключать в микрокапсулы, например, полученные с помощью методов коацервации или межфазной полимеризации, например в гидроксипропилметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметакрилатные) микрокапсулы соответственно, в коллоидные системы введения лекарственного средства (например, в липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в макроэмульсии. Такие методы описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, под ред. А. Osol, 1980. Можно приготавливать препараты с замедленным высвобождением. Приемлемыми примерами препаратов с замедленным высвобождением являются полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, включающие полипептид, такие матрицы представляют собой изделия определенной формы, например пленки или микрокапсулы. В конкретном варианте осуществления изобретения для достижения пролонгированной абсорбции инъектируемой композиции можно применять в композиции агенты, замедляющие абсорбцию, такие, например, как моностеарат алюминия, желатин или их комбинации.

Помимо описанных выше композиций, иммуноконъюгаты можно приготавливать также в виде препарата в форме депо. Указанные препаративные формы длительного действия можно применять путем имплантации (например, подкожной или внутримышечной) или внутримышечной инъекции. Так, например, иммуноконъюгаты можно включать в препаративные формы в сочетании с приемлемыми полимерными или гидрофобными материалами (например, в виде эмульсии в приемлемом масле) или ионообменными смолами, или в виде умеренно растворимых производных, например умеренно растворимой соли.

Фармацевтические композиции, содержащие иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно приготавливать с помощью общепринятых процессов смешения, растворения, эмульгирования, капсулирования, захвата или лиофилизации. Фармацевтические композиции можно включать в препаративные формы с помощью общепринятого метода с использованием одного или нескольких физиологически приемлемых носителей, разбавителей, эксципиентов или вспомогательных веществ, которые облегчают обработку белков, с получением препаратов, которые можно применять в фармацевтических целях. Соответствующая форма зависит от выбранного пути введения.

Иммуноконъюгаты можно включать в композиции в виде свободной кислоты или свободного основания, в нейтральной форме или в форме соли. Фармацевтически приемлемые соли представляют собой соли, которые практически сохраняют биологическую активность свободной кислоты или свободного основания. Они включают кислотно-аддитивные соли, например соли, образованные со свободными аминокетонами белковой композиции, или образованные с неорганическими кислотами, такими, например, как соляная или фосфорная кислота, или такими органическими кислотами, как уксусная, щавелевая, винная или миндальная кислота. Соли, образованные со свободной карбоксильной группой, можно получать также из неорганических оснований, таких, например, как гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа; или таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, гистидин или прокаин. Фармацевтические соли имеют тенденцию к более высокой растворимости в водных и других протонных растворителях по сравнению с соответствующими формами в виде свободных оснований.

Способы и композиции для терапевтического применения

Любые иммуноконъюгаты, представленные в настоящем описании, можно применять в терапевтических методах. Иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно использовать в качестве иммунотерапевтических агентов, например, при лечении различных видов рака.

Для применения в терапевтических методах иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно включать в состав препаративных форм, дозировать и вводить в соответствии с надлежащей клинической практикой. Рассматриваемые в этом контексте факторы включают конкретное нарушение, подлежащее лечению, конкретное млекопитающее, подлежащее лечению, клиническое состояние индивидуального пациента, причину заболевания, область введения агента, метод введения, схему введения и другие факторы, известные практикующим медикам.

Одним из объектов изобретения являются иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, предназначенные для применения в качестве лекарственного средства. Следующими объектами изобретения являются иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, предназначенные для применения для лечения заболевания. Некоторыми вариантами осуществления изобретения являются иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, предназначенные для применения в способе лечения. Одним из вариантов осуществления изобретения является иммуноконъюгат, представленный в настоящем описании, предназначенный для применения при лечении заболевания у индивидуума, который нуждается в этом. Некоторыми вариантами осуществления изобретения является иммуноконъюгат, предназначенный для применения в способе лечения индивидуума, который имеет заболевание, заключающееся в том, что вводит индивидууму в терапевтически эффективном количестве иммуноконъюгат. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание, подлежащее лечению, представляет собой пролиферативное на-

рушение. В конкретном варианте осуществления изобретения заболевание представляет собой рак. В других вариантах осуществления изобретения заболевание, подлежащее лечению, представляет собой воспалительное нарушение. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ заключается также в том, что вводят индивидууму в терапевтически эффективном количестве по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например противораковое средство, если заболевание, подлежащее лечению, представляет собой рак. "Индивидуум" в контексте любого из указанных выше вариантов осуществления изобретения представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека.

Следующим объектом изобретения является применение иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, для производства или приготовления лекарственного средства, которое предназначено для лечения заболевания у индивидуума, нуждающегося в этом. В одном из вариантов осуществления изобретения лекарственное средство предназначено для применения в способе лечения заболевания, заключающемся в том, что вводят индивидууму, который имеет заболевание, в терапевтически эффективном количестве лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание, подлежащее лечению, представляет собой пролиферативное нарушение. В конкретном варианте осуществления изобретения заболевание представляет собой рак. В других вариантах осуществления изобретения заболевание, подлежащее лечению, представляет собой воспалительное нарушение. В одном из указанных вариантов осуществления изобретения способ заключается также в том, что вводят индивидууму в терапевтически эффективном количестве по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например противораковое средство, если заболевание, подлежащее лечению, представляет собой рак. "Индивидуум" в контексте любого из указанных выше вариантов осуществления изобретения представляет собой млекопитающее, предпочтительно человека.

Следующим объектом изобретения является способ лечения заболевания у индивидуума, заключающийся в том, что вводят указанному индивидууму в терапевтически эффективном количестве иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении. В одном из вариантов осуществления изобретения указанному индивидууму вводят композицию, которая содержит иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, в фармацевтически приемлемой форме. В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание, подлежащее лечению, представляет собой пролиферативное нарушение. В предпочтительном варианте осуществления изобретения заболевание представляет собой рак. В других вариантах осуществления изобретения заболевание, подлежащее лечению, представляет собой воспалительное нарушение. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ заключается также в том, что вводят индивидууму в терапевтически эффективном количестве по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое средство, например противораковое средство, если заболевание, подлежащее лечению, представляет собой рак. "Индивидуум" в контексте любого из указанных выше вариантов осуществления изобретения может представлять собой млекопитающее, предпочтительно человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения заболевание, подлежащее лечению, представляет собой пролиферативное нарушение, предпочтительно рак. Примерами рака являются (но не ограничиваясь только ими) рак мочевого пузыря, рак головного мозга, рак головы и шеи, рак поджелудочной железы, рак легкого, рак молочной железы, рак яичника, рак матки, рак шейки матки, рак эндометрия, рак пищевода, рак ободочной кишки, колоректальный рак, ректальный рак, рак желудка, рак предстательной железы, рак крови, рак кожи, плоскоклеточная карцинома, рак кости и рак почки. Другие нарушения клеточной пролиферации, которые можно лечить с использованием иммуноконъюгата, предлагаемого в настоящем изобретении, включают (но не ограничиваясь только ими) неоплазмы, локализованные в животе, кости, молочной железе, пищеварительной системе, печени, поджелудочной железе, брюшине, эндокринных железах (надпочечник, парашитовидная, гипофиз, яички, яичник, тимус, щитовидная), глазу, голове и шеи, нервной системе (центральной и периферической), лимфатической системе, тазовой области, коже, мягкой ткани, селезенке, грудном отделе и мочеполовой системе. Также под объем изобретения попадают предраковые состояния или повреждения и метастазы рака. В некоторых вариантах осуществления изобретения рак выбирают из группы, включающей почечноклеточный рак, рак кожи, рак легкого, колоректальный рак, рак молочной железы, рак головного мозга, рак головы и шеи. В некоторых вариантах осуществления изобретения, в частности, когда эффекторный фрагмент иммуноконъюгата представляет собой IL-10, подлежащее лечению заболевание представляет собой воспалительное нарушение. Примерами воспалительных нарушений являются (но не ограничиваясь только ими) ревматоидный артрит, псориаз или болезнь Крона.

Специалисту в данной области должно быть очевидно, что во многих случаях иммуноконъюгаты не могут обеспечивать исцеление, а могут только оказывать частичное благоприятное воздействие. В некоторых вариантах осуществления изобретения физиологические изменения, обладающие некоторым благоприятным действием, рассматриваются также как терапевтически ценные. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения количество иммуноконъюгата, которое обеспечивает физиологическое изменение, рассматривается как "эффективное количество" или "терапевтически эффективное количество". Субъект, пациент или индивидуум, нуждающийся в лечении, представляет собой, как правило, млекопитающее, более конкретно человека.

Иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно применять также в качестве диагностиче-

ских реагентов. Связывание иммуноконъюгата с антигенной детерминантой можно легко выявлять, используя вторичное антитело, специфическое в отношении эффекторного фрагмента. В одном из вариантов осуществления изобретения вторичное антитело и иммуноконъюгат облегчают выявление связывания иммуноконъюгата с антигенной детерминантой, локализованной на поверхности клетки или ткани.

В некоторых вариантах осуществления изобретения иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, в эффективном количестве вводят в клетку. В других вариантах осуществления изобретения иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, вводят в терапевтически эффективном количестве индивидууму для лечения заболевания.

Для предупреждения или лечения заболевания соответствующая доза иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении (при его применении индивидуально или в сочетании с одним или несколькими другими дополнительными терапевтическими средствами), должна зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, пути введения, веса тела пациента, типа иммуноконъюгата, серьезности и течения заболевания, от того, вводят ли иммуноконъюгат в превентивных или терапевтических целях, предшествующих или осуществляемых одновременно терапевтическим вмешательствам, истории болезни пациента и ответа на иммуноконъюгат и предписания лечащего врача. Практикующий специалист, ответственный за введение, в любом случае, должен определять концентрацию действующего(их) вещества(в) в композиции и соответствующую(ие) дозу(ы) для индивидуального пациента. Различные схемы введения доз включают (но не ограничиваясь только ими) однократное введение или несколько введений в различные моменты времени, болюсное введение и пульсирующую инфузию.

Иммуноконъюгат можно вводить пациенту в виде одной обработки или серий обработок. В зависимости от типа и серьезности заболевания возможная начальная доза иммуноконъюгата для введения пациенту, например, с использованием одного или нескольких индивидуальных введений или с помощью непрерывной инфузии может составлять примерно от 1 до 15 мг/кг (например, 0,1-10 мг/кг). Типичная суточная доза может составлять от примерно 1 до 100 мг/кг или более в зависимости от отмеченных выше факторов. Для повторных введений в течение нескольких дней или более продолжительного периода в зависимости от состояния лечение, как правило, должно продолжаться до достижения требуемого подавления имеющихся симптомов заболевания. В качестве примера доза иммуноконъюгата может составлять от примерно 0,005 до примерно 10 мг/кг. В другом примере (но не ограничиваясь только указанным) доза на одно введение может составлять от примерно 1, примерно 5, примерно 10, примерно 50, примерно 100, примерно 200, примерно 350, примерно 500 мкг/кг веса тела, примерно 1, примерно 5, примерно 10, примерно 50, примерно 100, примерно 200, примерно 350, примерно 500 до примерно 1000 мг/кг/веса тела или более и находиться в любом указанном диапазоне. В качестве примеров (но не ограничиваясь только ими) указанного диапазона значений, можно вводить от примерно 5 до примерно 100 мг/кг веса тела, от примерно 5 мкг/кг веса тела до примерно 500 мг/кг веса тела и т.д. с учетом указанных выше уровней доз. Так, пациенту можно вводить одну или несколько доз, составляющих примерно 0,5, 2,0, 5,0 или 10 мг/кг (или любую их комбинацию). Указанные дозы можно вводить прерывисто, например, каждую неделю или каждые три недели (например, таким образом, чтобы пациент получал от примерно двух до примерно двадцати или, например, примерно шесть доз иммуноконъюгата). Можно вводить начальную более высокую ударную дозу, после которой применять одну или несколько более низких доз. Однако можно использовать другие схемы введения доз. Успех такой терапии легко оценивать с помощью общепринятых методик и анализов.

Иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, как правило, следует применять в количестве, эффективном для достижения поставленной цели. При применении для лечения или предупреждения болезненного состояния иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, или их фармацевтические композиции, вводят или применяют в терапевтически эффективном количестве. Определение терапевтически эффективного количества находится в компетенции специалистов в данной области, прежде всего в свете представленного подробного описания изобретения.

Для системного введения терапевтически эффективную дозу можно сначала определять с помощью анализов *in vitro*, например, анализов с использованием клеточных культур. Затем дозу можно включать в формулу для изучения на животных моделях для достижения концентрации в кровотоке, находящейся в диапазоне, включающем значение IC_{50} , определенное на клеточной культуре. Указанную информацию можно использовать для более точного определения доз, которые можно применять на людях.

Начальные дозы можно оценивать также, исходя из данных, полученных *in vivo*, например, на животных моделях, используя методики, хорошо известные в данной области. Обычный специалист в данной области легко может оптимизировать применение на людях на основе данных, полученных на животных.

Уровень доз и интервал можно регулировать индивидуально для получения уровней в плазме иммуноконъюгатов, которые являются достаточными для поддержания терапевтического действия. Обычные дозы, предназначенные для введения пациенту путем инъекции, составляют от примерно 0,1 до 50 мг/кг/день, как правило, от примерно 0,5 до 1 мг/кг/день. Для достижения терапевтически эффективных уровней в плазме можно вводить несколько доз каждый день. Уровни в плазме можно оценивать, например, с помощью ЖХВР.

В случаях местного применения или избирательного поглощения эффективная местная концентрация иммуноконъюгатов может не соответствовать концентрации в плазме. Специалист в данной области может оптимизировать терапевтически эффективные местные дозы без чрезмерных экспериментов.

Применение в терапевтически эффективной дозе иммуноконъюгатов, представленных в настоящем описании, должно, как правило, обеспечивать терапевтическую пользу, не вызывая существенной токсичности. Токсичность и терапевтическую эффективность иммуноконъюгата можно определять с помощью стандартных фармацевтических процедур на культурах клеток или экспериментальных животных. Анализы на клеточных культурах или опыты на животных можно применять для определения значений LD₅₀ (доза, смертельная для 50% популяции) и ED₅₀ (доза, терапевтически эффективная для 50% популяции). Соотношение доз, характеризующих токсические и терапевтические действия, обозначают как терапевтический индекс, который можно выражать в виде соотношения LD₅₀/ED₅₀. Иммуноконъюгаты, имеющие высокие терапевтические индексы, являются предпочтительными. В одном из вариантов осуществления изобретения иммуноконъюгат, предлагаемый в настоящем изобретении, характеризуется высоким терапевтическим индексом. Данные, полученные в анализах с использованием клеточных культур и в опытах на животных, можно применять для определения диапазона доз, которые можно применять на людях. Доза лежит предпочтительно в диапазоне концентраций в кровотоке, которые включают ED₅₀, обладающих невысокой токсичностью или не обладающих токсичностью. Доза может варьироваться в зависимости от различных факторов, например от применяемой лекарственной формы, применяемого пути введения, состояния индивидуума и т.п. Точную препаративную форму, путь введения и дозу может выбирать индивидуально врач в зависимости от состояния пациента (см., например, Fingl и др., в *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, гл. 1, 1975, с. 1, публикация полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки).

Лечащему врачу пациентов, которым вводят иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, должно быть очевидно, как и когда заканчивать, прерывать или регулировать введение из-за токсичности, дисфункции органов и т.п. И, наоборот, лечащему врачу должны быть очевидно, как регулировать лечение в сторону применения более высоких доз, если клинический ответ является неадекватным (предотвращая токсичность). Величина вводимой дозы при лечении представляющего интерес нарушения должна варьироваться в зависимости от серьезности состояния, подлежащего лечению, пути введения и т.п. Серьезность состояния можно, например, оценивать, среди прочего, с помощью стандартных прогностических методов оценки. Кроме того, доза и предполагаемая частота введения дозы должны также варьироваться в зависимости от возраста, веса тела и ответа индивидуального пациента.

Другие средства и варианты лечения.

Иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, при лечении можно вводить в сочетании с одним или несколькими другими средствами. Например, иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении, можно вводить совместно по меньшей мере с одним дополнительным терапевтическим средством. Понятие "терапевтическое средство" включает любое средство, которое вводят для лечения симптома или заболевания у индивидуума, который нуждается в таком лечении. Указанное дополнительное терапевтическое средство может представлять собой любое действующее вещество, которое можно применять при конкретном показании, подлежащем лечению, предпочтительно с дополнительными видами активности, которые не оказывают отрицательное действие друг на друга. В некоторых вариантах осуществления изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой иммуномодулятор, цитостатическое средство, ингибитор клеточной адгезии, цитотоксическое средство, активатор клеточного апоптоза или средство, повышающее чувствительность клеток к индукторам апоптоза. В конкретном варианте осуществления изобретения дополнительное терапевтическое средство представляет собой противоопухолевое средство, например агент, разрушающий микротрубочки, антиметаболит, ингибитор топоизомеразы, интеркалятор ДНК, алкилирующий агент, средство гормональной терапии, ингибитор киназ, антагонист рецептора, активатор апоптоза опухолевых клеток или антиангиогенное средство.

Указанные другие средства могут присутствовать в комбинации в количествах, эффективных для указанных целей. Эффективное количество указанных других средств зависит от количества применяемого иммуноконъюгата, типа нарушения или лечения и других указанных выше факторов. Иммуноконъюгаты, как правило, применяют в таких же дозах и с использованием указанных в настоящем описании путей введения, или в дозах, составляющих примерно от 1 до 99% от указанных в настоящем описании доз, или в любой дозе и с использованием любого пути введения, которые согласно эмпирическим/клиническим данным рассматриваются как приемлемые.

Отмеченные выше комбинированные терапии предусматривают совместное введение (когда два или большее количество терапевтических средств включают в одну и ту же или в отдельные композиции) и раздельное введение, в этом случае введение иммуноконъюгата, предлагаемого в изобретении, можно осуществлять до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического средства и/или адъюванта. Иммуноконъюгаты, предлагаемые в изобретении, можно применять также в сочетании с лучевой терапией.

Изделия

Другим объектом изобретения является изделие, которое содержит продукты, применяемые для ле-

чения, предупреждения и/или диагностирования указанных выше нарушений. Изделие представляет собой контейнер и этикетку или листовку-вкладыш в упаковку, которые размещены на контейнере или прилагаются к нему. Приемлемыми контейнерами являются, например, банки, пузырьки, шприцы, пакеты для внутривенного (IV) раствора и т.д. Контейнеры можно изготавливать из различных материалов, таких как стекло или пластмасса. Контейнер содержит композицию, которая сама по себе или в сочетании с другой композицией является эффективной для лечения, предупреждения и/или диагностирования состояния и может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или пузырек, снабженный пробкой, которую можно прокалывать с помощью иглы для подкожных инъекций). По меньшей мере одно действующее вещество в композиции представляет собой иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении. На этикетке или листовке-вкладыше в упаковку указано, что композицию применяют для лечения выбранного состояния. Кроме того, изделие может включать (а) первый контейнер с находящейся в нем композицией, где композиция содержит иммуноконъюгат, предлагаемый в изобретении; и (б) второй контейнер с находящейся в нем композицией, где композиция содержит дополнительное цитотоксическое или иное терапевтическое средство. Согласно этому варианту осуществления изобретения изделие может содержать листовку-вкладыш в упаковку, которая содержит информацию о том, что композиции можно использовать для лечения конкретного состояния. В альтернативном или дополнительном варианте изделие может дополнительно включать второй (или третий) контейнер с фармацевтически приемлемым буфером, таким как бактериостатическая вода для инъекций (БСВИ), забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Кроме того, оно может включать другие материалы, необходимые с коммерческой точки зрения и с точки зрения потребителя, в частности другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Примеры

Ниже представлены примеры способов и композиций, предлагаемых в изобретении. Как должно быть очевидно, можно осуществлять на практике различные другие варианты осуществления изобретения с учетом представленного выше описания изобретения в целом.

Пример 1.

Общие методы.

Методы рекомбинантной ДНК.

Для манипуляций с ДНК использовали стандартные методы, описанные у Sambrook J. и др., *Molecular cloning: A laboratory manual*; изд-во Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Реагенты для молекулярной биологии применяли согласно инструкциям производителей. Общую информацию, касающуюся нуклеотидных последовательностей легких и тяжелых цепей человеческих иммуноглобулинов, см. у Kabat E.A. и др., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е изд., изд-во NIH, публикация N91-3242, 1991.

Секвенирование ДНК.

Последовательности ДНК определяли с помощью секвенирования двух цепей.

Синтез генов.

Требуемые сегменты генов либо создавали с помощью ПЦР с использованием соответствующих матриц, либо синтезировали на фирме Genear AG (Регенсбург, Германия) из синтетических олигонуклеотидов и ПЦР-продуктов посредством автоматического синтеза генов. В случаях, когда точная генная последовательность не была доступна, создавали олигонуклеотидные праймеры на основе последовательностей ближайших гомологов и гены выделяли с помощью ОТ-ПЦР из РНК, полученной из соответствующей ткани. Сегменты генов, фланкированные единичными сайтами, распознаваемыми рестриктазами, клонировали в стандартных клонирующих/секвенирующих векторах. Плазмидную ДНК очищали из трансформированных бактерий и определяли концентрацию с помощью УФ-спектроскопии. Последовательность ДНК субклонированных фрагментов генов подтверждали ДНК-секвенированием. Создавали сегменты генов с требуемыми сайтами рестрикции, позволяющими субклонировать их в соответствующих экспрессионных векторах. Все конструкции создавали с 5'-концевой последовательностью ДНК, кодирующей лидерный пептид, который направляет секрецию белков в эукариотических клетках. В SEQ ID NO: 8-16 представлены примеры лидерных пептидов и кодирующих их полинуклеотидных последовательностей.

Получение слияний $\beta\gamma$ -субъединица IL-2R-Fc и слияния α -субъединица IL-2R-Fc.

Для изучения аффинности связывания рецептора IL-2 создавали инструмент, который позволяет экспрессировать гетеродимерный рецептор IL-2; β -субъединицу рецептора IL-2 сливали с молекулой Fc, которую создавали таким образом, что она обладала способностью к гетеродимеризации (Fc("впадина")) (см. SEQ ID NO: 17 и 18), используя технологию "knobs-into-holes" (Merchant и др., *Nat Biotech.* 16, 1998, сс. 677-68). Затем γ -субъединицу рецептора IL-2 сливали с вариантом Fc("выступ") (см. SEQ ID NO: 19 и 20), гетеродимеризованным с Fc("впадина"). Затем указанный гетеродимерный содержащий Fc-слияние белок применяли в качестве субстрата для анализа взаимодействия IL-2/IL-2-рецептор. α -Субъединицу IL-2R экспрессировали в виде мономерной цепи, несущей сайт расщепления AcTev и Avi His-метку (SEQ ID NO: 21 и 22). Соответствующие субъединицы IL-2R кратковременно экспрессировали в клетках HEK

EBNA 293 с сывороткой в случае конструкции $\beta\gamma$ -субъединицы IL-2R и без сыворотки в случае конструкции α -субъединицы. Конструкцию $\beta\gamma$ -субъединицы IL-2R очищали на белке А (фирма GE Healthcare) с последующей гель-фильтрацией (фирма GE Healthcare, Супердекс 200). α -Субъединицу IL-2R очищали с использованием His-метки на колонке NiNTA (фирма Qiagen) с последующей гель-фильтрацией (фирма GE Healthcare, Супердекс 75). Аминокислотные и соответствующие нуклеотидные последовательности различных конструкций рецепторов представлены в SEQ ID NO: 17-22 и 255-268.

Получение иммуноконъюгатов.

Более подробное описание создания и процесса созревания аффинности антигенсвязывающих фрагментов, мишенью которых является FAP, представлено в разделе "Примеры", прилагаемом к публикации PCT WO 2012/020006, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. Как описано в указанной публикации, различные антигенсвязывающие домены, мишенью которых является FAP, создавали с помощью метода фагового дисплея, включая клоны, обозначенные как 4G8, 28H1 и 4B9, которые применяли в описанных ниже примерах. Клон 28H1 представлял собой антитело с созревшей аффинностью, основой которого является родительский клон 4G8, а клон 4B9 представлял собой антитело с созревшей аффинностью, основой которого являлся родительский клон 3F2. Мишенью антигенсвязывающего домена, обозначенного в контексте настоящего описания 2B10, является A2-домен теназина С (TNC A2). Подробное описание этого и других антигенсвязывающих фрагментов, мишенью которых является TNC A2, представлено в публикации PCT WO 2012/020038, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. Антигенсвязывающий домен, обозначенный как L19, мишенью которого является экстра-домен В (EDB) фибронектина, получали из антитела L19, которое описано в публикации PCT WO 2007/128563. Мишенью антигенсвязывающих доменов, обозначенных в контексте настоящего описания как CH1A1A и CH1A1A 98/99 2F1, является СЕА, и они описаны более подробно в опубликованной заявке на патент PCT PCT/EP 2012/053390, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки.

Четырехмутантный IL-2 (qm), применяемый в качестве эффекторного фрагмента в некоторых из приведенных ниже примеров, описан более подробно в опубликованной заявке на патент PCT PCT/EP 2012/051991, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки. В целом, для IL-2 qm характерны следующие мутации:

1. Т3А - обеспечивает "выключение" предсказанного сайта О-гликозилирования,
2. F42A - обеспечивает "выключение" взаимодействия IL-2/IL-2R α ,
3. Y45A - обеспечивает "выключение" взаимодействия IL-2/IL-2R α ,
4. L72G - обеспечивает "выключение" взаимодействия IL-2/IL-2R α ,
5. C125A - мутация, препятствующая связыванию посредством дисульфидного мостика димеров IL-2.

Т3А-мутация выбрана для элиминации сайта О-гликозилирования и получения белкового продукта с более высокой гомогенностью и чистотой, когда содержащий ее полипептид или иммуноконъюгат IL-2 qm экспрессируется в эукариотических клетках, таких как CHO или HEK293-клетки. Три мутации F42A, Y45A и L72G выбраны для воздействия на связывание с CD25, т.е. α -субъединицей IL-2-рецептора. Снижение или элиминация связывания с CD25 приводит к пониженной индуцированной активацией клеточной гибели (AICD), отсутствию предпочтительной активации регуляторных Т-клеток, а также к пониженной токсичности (как описано в EP 11153964.9).

Создавали последовательности ДНК путем генного синтеза и/или с помощью классических методов молекулярной биологии и субклонировали в экспрессионных векторах млекопитающих под контролем промотора MPSV и против хода транскрипции относительно синтетического поли А-сайта, каждый вектор нес последовательность EBV OriP. Иммуноконъюгаты, которые применяли в описанных ниже примерах, получали путем котрансфекции находящихся на экспоненциальной фазе роста клеток HEK293-EBNA экспрессионными векторами млекопитающих, применяя трансфекцию, опосредуемую фосфатом кальция. Альтернативно этому, клетки HEK293, выращаемые в суспензии, трансфектировали полиэтиленимином (ПЭИ) в сочетании с соответствующими экспрессионными векторами. Альтернативно этому, пулы стабильно трансфектированных CHO-клеток или клоны CHO-клеток применяли для получения в бессывороточных средах. Затем слитые белки IgG-цитокин очищали из супернатанта. В целом, слитые белки IgG-цитокин очищали с использованием одной стадии очистки на основе аффинности с использованием белка А (колонка HiTrap ProtA, фирма GE Healthcare), применяя для уравнивания 20 мМ фосфат натрия, 20 мМ цитрат натрия, pH 7,5. После внесения супернатанта колонку сначала промывали 20 мМ фосфатом натрия, 20 мМ цитратом натрия, pH 7,5, а затем промывали 13.3 мМ фосфатом натрия, 20 мМ цитратом натрия, 500 мМ хлоридом натрия, pH 5,45. Слитый белок IgG-цитокин элюировали 20 мМ цитратом натрия, 100 мМ хлоридом натрия, 100 мМ глицином, pH 3. Фракции нейтрализовали, объединяли и очищали с помощью гель-фильтрации (колонка HiLoad 16/60 Супердекс 200, фирма GE Healthcare) в буфере для конечного продукта: 25 мМ фосфат калия, 125 мМ хлорид натрия, 100 мМ глицин, pH 6,7. Ниже представлено подробное описание приведенных в качестве примеров процессов очистки и результаты, полученные для отобранных конструкций. Концентрацию белка в очищенных белковых образ-

цах определяли, измеряя оптическую плотность (ОП) при 280 нм, используя молярный коэффициент экстинкции, рассчитанный на основе аминокислотной последовательности. Чистоту и молекулярную массу иммуноконъюгатов анализировали с помощью ДСН-ПААГ в присутствии восстановителя (5 мМ 1,4-дитиотреитол) или без него и окрашивали кумасси бриллиантовым голубым (SimpleBlue™ SafeStain, фирма Invitrogen). Гелевую систему NuPAGE® Pre-Cast (фирма Invitrogen) применяли согласно инструкциям производителя (4-20% Трис-глициновые гели или 3-12% бис-Трис). Содержание агрегатов в образцах иммуноконъюгатов анализировали, используя колонку для аналитической гель-фильтрации Супердеке 200 10/300GL (фирма GE Healthcare), в подвижном буфере, содержащем 2 мМ MOPS, 150 мМ NaCl, 0,02% NaN₃, pH 7,3 при 25°C. Целостность аминокислотного каркаса восстановленных легких и тяжелых цепей антител можно подтверждать с помощью масс-спектрометрии с использованием наноэлектроспрея (NanoElectrospray Q-TOF) после удаления N-гликанов путем обработки ферментом гликозидазой F пептида-N (фирма Roche Molecular Biochemicals). Олигосахариды, присоединенные к Fc-домену иммуноконъюгатов, анализировали с помощью описанного ниже метода MALDI TOF-МС. Олигосахариды высвобождали из иммуноконъюгатов путем обработки ферментом с помощью расщепления PNGазой F. Полученный после расщепления раствор, содержащий высвободившиеся олигосахариды, либо непосредственно готовили для анализа с помощью MALDI TOF-МС, либо дополнительно расщепляли гликозидазой EndoH перед подготовкой образца для анализа с помощью MALDI TOF-МС.

Пример 2.

Слитые белки IgG-IL-2 qm, мишенью которых является FAP, создавали на основе антител к FAP 4G8, 28H1 и 4B9, при этом только один четырехмутантный (qm) IL-2 сливали с C-концом одной из гетеродимерных тяжелых цепей, как показано на фиг. 2А. Для достижения направленного переноса к строме опухоли, в которой происходит избирательная экспрессия FAP, применяли Fab-область двухвалентного антитела (явление авидности). Для достижения гетеродимеризации, приводящей к образованию индивидуального четырехмутантного IL-2, применяли технологию "knob-into-hole". Для того чтобы минимизировать создание гомодимерных слияний IgG-цитокин, цитокин сливали с C-концом (с делецией C-концевого остатка Lys), содержащей "выступ" тяжелой цепи IgG через (G₄S)₃- или G₄-(SG₄)₂-линкер. Слитый белок антитело-цитокин обладал IgG-подобными свойствами. Для снижения связывания с FcγR/эффektorной функции и предупреждения коактивации FcR в Fc-домен интродуцировали мутации P329G L234A L235A (LALA). Последовательности этих иммуноконъюгатов представлены в SEQ ID NO: 193, 269 и 205 (28H1 с линкером (G₄S)₃), SEQ ID NO: 193, 195 и 205 (28H1 с линкером G₄-(SG₄)₂), SEQ ID NO: 201, 203 и 205 (4G8 с линкером G₄-(SG₄)₂), SEQ ID NO: 207, 209 и 211 (4B9 с линкером G₄-(SG₄)₂), SEQ ID NO: 207, 271 и 211 (4B9 с линкером (G₄S)₃).

Кроме того, создавали слитый белок, мишенью которого является CEA, такой как IgG-IL-2 qm, на основе антитела к CEA CH1A1A 98/99 2F1, контрольный на основе DP47GS "ненаправленный" слитый белок IgG-IL-2 qm, в котором IgG не связывается со специфической мишенью, а также специфический слитый белок на основе 2B10, такой как IgG-IL-2 qm, мишенью которого является A2-домен тенастина-С. Последовательности этих иммуноконъюгатов представлены в SEQ ID NO: 275, 281 и 283 (CH1A1A 98/99 2F1 с линкером G₄-(SG₄)₂), SEQ ID NO: 277, 281 и 283 (CH1A1A 98/99 2F1 с линкером (G₄S)₃), SEQ ID NO: 219, 221 и 225 (DP47GS с линкером G₄-(SG₄)₂), SEQ ID NO: 219, 289 и 225 (DP47GS с линкером (G₄S)₃), SEQ ID NO: 285, 287 и 239 (2B10 с линкером (G₄S)₃). Конструкции создавали путем кратковременной экспрессии в клетках линии HEK293 EBNA и очищали в целом согласно методу, описанному выше. На фиг. 3-9 приведены примеры хроматограмм и профилей элюции, полученные при очистке (А, Б), а также результаты аналитического ДСН-ПААГ и гель-фильтрации конечных очищенных конструкций (В, Г). Выходы кратковременной экспрессии составляли 42 мг/л для содержащих IgG-IL-2 qm иммуноконъюгатов на основе 4G8, 20 мг/л на основе 28H1, 10 мг/л на основе 4B9, 5,3 мг/л на основе CH1A1A 98/99 2F1, 36,7 мг/л на основе 2B10 и 13,8 мг/л на основе DP47GS.

Кроме того, создавали иммуноконъюгат на основе 28H1 IgG-IL-15, мишенью которого является FAP, последовательности которого представлены в SEQ ID NO: 193, 199 и 205. В последовательности полипептида IL-15 остаток глутаминовой кислоты в положении 53 заменяли на аланин для снижения способности связываться в α-субъединицей IL-15-рецептора, а остаток аспарагина в положении 79 заменяли на аланин для элиминации гликозилирования. Слитый белок IgG-IL-15 получали путем кратковременной экспрессии и очищали согласно описанному выше методу.

Аффинность связывания FAP.

Способность связывать FAP иммуноконъюгатов IgG-IL-2 qm на основе антител к FAP 4G8 и 28H1 определяли на основе резонанса поверхностного плазмона (SPR) с использованием устройства Biacore в сравнении с соответствующими немодифицированными антителами типа IgG. В целом, метод состоял в следующем: антитело к His (Penta-His, фирма Qiagen 34660) иммобилизовали на CM5-чипах для захвата 10 нМ человеческого меченного с помощью His FAP (20 с). Температура составляла 25°C и применяли HBS-EP в качестве буфера. Концентрация анализируемого вещества составляла от 50 до 0,05 нМ, скорость потока составляла 50 мкл/мин (ассоциация: 300 с, диссоциация: 900 с, регенерация: 60 с, 10 мМ глицин pH 2). Аппроксимацию осуществляли на основе модели связывания 1:1, RI = 0, R_{max} = локальное

значение (поскольку применяли формат захвата). Ниже в таблице представлены установленные кажущиеся значения аффинности двухвалентных компонентов (авидность, пМ) по данным SPR при аппроксимации на основе модели связывания 1:1, $RI = 0$, R_{max} = локальное.

	Hu FAP
4G8 IgG-IL-2 qm	100пМ
4G8 IgG	50пМ
28H1 IgG-IL-2 qm	175пМ
28H1 IgG	200пМ

Данные демонстрируют, что в пределах ошибки метода аффинность к человеческому FAP сохранялась для иммуноконъюгата на основе 28H1 или только в незначительной степени снижалась для иммуноконъюгата на основе 4G8 по сравнению с соответствующими немодифицированными антителами.

Аналогично с помощью SPR при 25°C определяли аффинность (K_D) конструкций 4B9 IgG-IL-2 qm (16 пМ), CH1A1A 98/99 2F1 IgG-IL-2 qm (400 пМ), CH1A1A 98/99 2F1 IgG-IL-2 wt (см. пример 4; 470 пМ) и 2B10 IgG-IL-2 qm (150 пМ ср. 300 пМ для неконъюгированного 2B10 IgG) к человеческим FAP, CEA и TNC A2 соответственно. Подтверждали также перекрестную реактивность антител 4B9 и 2B10 к FAP или TNC A2 человека, мышей и обезьян циномоглус соответственно.

Далее определяли аффинность иммуноконъюгатов на основе 4G8 и 28H1 IgG-IL-2 qm к гетеродимеру $\beta\gamma$ IL-2R и к α -субъединице IL-2R с помощью резонанса поверхностного плазмона (SPR) при непосредственном сравнении с α -форматом иммуноконъюгата Fab-IL-2 qm-Fab, который описан в опубликованной заявке на патент РСТ № РСТ/ЕР 2012/051991. В целом, метод состоял в следующем: лиганды - либо α -субъединицу человеческого IL-2R, либо гетеродимер $\beta\gamma$ человеческого IL-2R - иммобилизовали на CM5-чипе. Затем на чип вносили в качестве анализируемых веществ иммуноконъюгаты на основе 4G8 и 28H1 IgG-IL-2 qm или для сравнения иммуноконъюгаты на основе 4G8 и 28H1 Fab-IL-2 qm-Fab при 25°C в буфере HBS-EP, используя их в диапазоне концентраций от 300 до 1,2 нМ (разведение 1:3). Скорость потока составляла 30 мкл/мин и использовали следующие условия: ассоциация: 180 с, диссоциация: 300 с и регенерация: 2×30 с с помощью 3М $MgCl_2$ для гетеродимера $\beta\gamma$ IL-2R, 10 с с помощью 50 мМ NaOH для α -субъединицы IL-2R. Для аппроксимации использовали модель связывания 1:1 (связывание 1:1 $RI \neq 0$, R_{max} = локальное для IL-2R $\beta\gamma$, кажущееся значение K_D , связывание 1:1 $RI = 0$, R_{max} = локальное для IL-2R α). Соответствующие значения K_D представлены ниже в таблице.

Кажущееся значение K_D [нМ]	Hu IL-2R $\beta\gamma$	Hu IL-2R α
4G8 IgG-IL-2 qm	5,9	нет связывания
4G8 Fab-IL-2 qm-Fab	10,4	нет связывания
28H1 IgG-IL-2 qm	6,2	нет связывания
28H1 Fab-IL-2 qm-Fab	11,4	нет связывания

Данные демонстрируют, что иммуноконъюгаты на основе 4G8 и 28H1 IgG-IL-2 qm связываются, по меньшей мере, с такой же высокой аффинностью, что и иммуноконъюгаты Fab-IL-2 qm-Fab с гетеродимером $\beta\gamma$ IL-2R, но они не связываются с α -субъединицей IL-2R из-за интродукции мутаций, воздействующих на связывание с CD25. По сравнению с соответствующими иммуноконъюгатами Fab-IL-2 qm-Fab аффинность слитых белков IgG-IL-2 qm оказалась несколько повышенной, в пределах ошибки метода.

Аналогично с помощью SPR при 25°C определяли аффинность других конструкций (4B9, DP47GS, 2B10, CH1A1A 98/99 2F1), которые содержат либо IL-2 wt (см. пример 4), либо IL-2 qm, к гетеродимеру $\beta\gamma$ IL-2R и к α -субъединице IL-2R. Для всех конструкций кажущееся значение K_D в отношении гетеродимера $\beta\gamma$ человеческого IL-2R составляло от 6 до 12 нМ (вне зависимости от того, содержала конструкция IL-2 wt или IL-2 qm), при этом только конструкции, содержащие IL-2 wt, связывались с α -субъединицей IL-2R (K_D для человеческой IL-2R α составляло около 20 нМ).

Анализ биологической активности иммуноконъюгатов IgG-цитокин.

Биологическую активность слитых конструкций на основе 4G8 IgG-IL-2 qm, мишенью которых является FAP, изучали с использованием нескольких клеточных анализов в сравнении с поступающим в продажу IL-2 (пролейкин, фирма Novartis/Chiron) и/или иммуноконъюгатами Fab-IL-2-Fab, которые описаны в EP 11153964.9.

Связывание с экспрессирующими FAP клетками.

Связывание иммуноконъюгата на основе 4G8 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является FAP, с экспрессирующими человеческий FAP стабильно трансфектированными клетками HEK293 измеряли с помощью FACS. В целом, метод состоял в следующем: 250000 клеток на лунку инкубировали с взятыми в указанных концентрациях иммуноконъюгатами в круглодонном 96-луночном планшете в течение 30 мин при 4°C и однократно отмывали 3ФР/0,1% БСА. Связанные иммуноконъюгаты определяли после инкубации в течение 30 мин при 4°C с конъюгированным с ФИТЦ $F(ab')_2$ -фрагментом козьего антитела, специфического в отношении $F(ab')_2$, AffiniPure (фирма Jackson Immuno Research Lab, № 109-096-097, рабочий раствор: разведение 1:20 в 3ФР/0,1% БСА, свежеприготовленный), используя устройство FACS Can-

toII (программное обеспечение FACS Diva). Результаты представлены на фиг. 10. Данные демонстрируют, что связывание иммуноконъюгата IgG-IL-2 qm с экспрессирующими FAP клетками характеризуется значением EC_{50} , составляющим 0,9 нМ, что сопоставимо со значением (0,7 нМ) соответствующей конструкции на основе 4G8 Fab-IL-2 qm-Fab.

Высвобождение IFN- γ NK-клетками (в растворе).

Далее изучали способность иммуноконъюгата на основе 4G8 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является FAP, индуцировать высвобождение IFN- γ NK92-клетками путем активации передачи сигналов IL-2R $\beta\gamma$. В целом, метод состоял в следующем: NK92-клетки с дефицитом IL-2 (100000 клетки/лунку в 96-луночном планшете с U-образным дном) инкубировали с иммуноконъюгатами IL-2 в различных концентрациях, которые содержали четырехмутантный IL-2, в течение 24 ч в NK-среде (среда MEM- α фирмы Invitrogen (№ 22561-021), дополненная 10% FCS, 10% лошадиной сыворотки, 0,1 мМ 2-меркаптоэтанолом, 0,2 мМ инозитом и 0,02 мМ фолиевой кислотой). Супернатанты собирали и высвобождение IFN- γ анализировали с использованием набора II для ELISA, содержащего антитело к человеческому IFN- γ , фирма Becton Dickinson (№ 550612). Пролейкин (фирма Novartis) служил в качестве положительного контроля при оценке опосредуемой IL-2 активации клеток. На фиг. 11 продемонстрировано, что иммуноконъюгат на основе 4G8 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является FAP, обладал такой же эффективностью в отношении индукции высвобождения IFN- γ , что иммуноконъюгат на основе клона с созревшей аффинностью 28H1 Fab-IL-2 qm-Fab.

Анализ фосфорилирования STAT5.

В последней проведенной при создании изобретения серии экспериментов исследовали воздействие иммуноконъюгата на основе 4G8 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является FAP, на индукцию фосфорилирования STAT5 в сравнении с иммуноконъюгатами на основе 28H1 Fab-IL-2-Fab и Fab-IL-2 qm-Fab, а также с пролейкином с использованием человеческих NK-клеток, CD4⁺-Т-клеток, CD8⁺-Т-клеток и T_{reg}-клеток из человеческих PBMC. В целом, метод состоял в следующем: получали образцы крови здоровых добровольцев в содержащие гепарин шприцы и выделяли PBMC. PBMC обрабатывали указанными иммуноконъюгатами в указанных концентрациях или пролейкином (фирма Novartis) в качестве контроля. После 20-минутной инкубации при 37°C PBMC фиксировали предварительно нагретым Cytofix-буфером (фирма Becton Dickinson, № 554655) в течение 10 мин при 37°C, после чего повышали проницаемость клеток с помощью буфера III Phosflow Perm (фирма Becton Dickinson, № 558050) в течение 30 мин при 4°C. Клетки отмывали дважды 3ФР, содержащим 0,1% БСА, перед осуществлением FACS-окрашивания, для которого использовали смеси антител для проточной цитометрии для выявления различных клеточных популяций и фосфорилирования STAT5. Образцы анализировали с использованием устройства FACSCantoII с HTS фирмы Becton Dickinson. NK-клетки определяли как CD3⁺CD56⁺, CD8-позитивные Т-клетки определяли как CD3⁺CD8⁺, CD4-позитивные Т-клетки определяли как CD4⁺CD25⁺CD127⁺ и T_{reg}-клетки определяли как CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺.

Для NK-клеток и CD8⁺-Т-клеток, которые не экспрессируют или экспрессируют очень низкие уровни CD25 (что означает, что передача сигналов IL-2R опосредуется прежде всего гетеродимером $\beta\gamma$ IL-2R), результаты демонстрируют, что иммуноконъюгат на основе 4G8 IgG-IL-2 qm оказался менее чем в 10 раз менее эффективным в отношении индукции фосфорилирования STAT5, чем пролейкин, но несколько более эффективным, чем иммуноконъюгаты на основе 28H1 Fab-IL-2-Fab и Fab-IL-2 qm-Fab. Для CD4⁺-Т-клеток, для которых характерна быстрая повышающая регуляция CD25 при стимуляции, иммуноконъюгат на основе 4G8 IgG-IL-2 qm оказался менее эффективным по сравнению с иммуноконъюгатом 28H1 Fab-IL-2-Fab, но несколько более эффективным по сравнению с иммуноконъюгатом 28H1 Fab-IL-2 qm-Fab, и для него все еще была характерна способность индуцировать передачу сигналов IL-2R в насыщающих концентрациях, сопоставимую с пролейкином и 28H1 Fab-IL-2-Fab. Это противоположно результатам, полученным с использованием T_{reg}-клеток, в отношении которых эффективность иммуноконъюгата на основе 4G8 IgG-IL-2 qm оказалась существенно более низкой по сравнению с иммуноконъюгатом Fab-IL-2-Fab из-за высокого уровня экспрессии CD25 на T_{reg}-клетках и пониженной аффинности связывания иммуноконъюгата на основе 4G8 IgG-IL-2 qm с CD25. Вследствие отсутствия связывания с CD25 у иммуноконъюгата на основе 4G8 IgG-IL-2 qm передача сигналов IL-2 в T_{reg}-клетках активируется через гетеродимер $\beta\gamma$ IL-2R только в концентрациях, при которых происходит активация передачи сигналов IL-2R на CD25-негативных эффекторных клетках через гетеродимер $\beta\gamma$ IL-2R. Таким образом, обобщая полученные результаты, можно заключить, что иммуноконъюгат на основе 4G8 IgG-IL-2 qm, представленный в настоящем описании, обладает способностью активировать передачу сигналов IL-2R через гетеродимер $\beta\gamma$ IL-2R, но не обеспечивает предпочтительную стимуляцию T_{reg}-клеток по сравнению с другими эффекторными клетками. Результаты этих экспериментов представлены на фиг. 12.

Связывание 2B10 IgG-IL-2 qm с клетками, экспрессирующими TNC A2.

Связывание иммуноконъюгата на основе 2B10 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является TNC A2, с человеческим TNC A2, экспрессируемым на U87MG-клетках, измеряли с помощью FACS. В целом, метод состоял в следующем: 200000 клеток на лунку инкубировали с взятым в указанных концентрациях иммуноконъюгатом в круглодонном 96-луночном планшете в течение 30 мин при 4°C и дважды отмыва-

ли ЗФР/0,1% БСА. Связанный иммуноконъюгат определяли после инкубации в течение 30 мин при 4°C с конъюгированным с ФИТЦ F(ab')₂-фрагментом козьего антитела к человеческому IgG, Fcγ-специфическим, AffiniPure (фирма Jackson Immuno Research Lab, № 109-096-098, рабочий раствор: разведение 1:20 в ЗФР/0,1% БСА, свежеприготовленный), используя устройство FACS CantoII (программное обеспечение FACS Diva). Результаты представлены на фиг. 13. Данные демонстрируют, что связывание иммуноконъюгата 2B10 IgG-IL-2 qm с экспрессирующими TNC A2 клетками U87MG такое же, как и у соответствующего неконъюгированного IgG.

Индукция пролиферации NK92-клеток иммуноконъюгатами IgG-IL-2.

Иммуноконъюгаты 2B10 IgG-IL-2 qm, CH1A1A 98/99 2F1 IgG-IL-2 qm, CH1A1A 98/99 2F1 IgG-IL-2 wt, 4B9 IgG-IL-2 qm и 4B9 IgG-IL-2 wt тестировали в отношении их способности индуцировать пролиферацию NK92-клеток. Для анализа пролиферации NK92-клетки выращивали в свободной от IL-2 среде в течение 2 ч, высевали 10000 клеток/лунку в плоскодонный 96-луночный планшет, а затем инкубировали в течение 3 дней во влажной камере при 37°C, 5% CO₂ в присутствии содержащих IL-2 иммуноконъюгатов. Через 3 дня содержание АТФ в клеточных лизатах измеряли, определяя на основе люминисценции количество жизнеспособных клеток с использованием набора для анализа "CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay" фирмы Promega (№ G7571/2/3). Процент роста рассчитывали, принимая рост при использовании пролейкина (фирма Novartis) в концентрации 1,1 мг/мл за 100% пролиферации и рост необработанных клеток без стимуляции IL-2 за 0% пролиферации. Результаты представлены на фиг. 14 и 15. Данные демонстрируют, что все конструкции обладали способностью индуцировать пролиферацию NK92-клеток, при этом конструкции на основе CH1A1A являлись более активными, чем иммуноконъюгат 2B10 IgG-IL-2 qm, а конструкции, содержащие IL-2 wt, оказались более активными, чем соответствующие конструкции, содержащие IL-2 qm.

Пример 3.

В целом, интродуцировали мутации P329G LALA, которые практически полностью элиминируют способность взаимодействовать с FcγR у человеческих антител типа IgG₁ (см. заявку на европейский патент EP 11160251.2, которая полностью включена в настоящее описание в качестве ссылки), для снижения способности связываться с FcγR/эффекторной функции и, как следствие, предупреждения избыточного высвобождения цитокина, когда происходит совместная активация соответствующих цитокиновых рецепторов посредством передачи сигналов FcγR. В конкретных случаях, например, когда мишенью антитела является высокоспецифический опухолевый антиген, связанные с Fc эффекторные функции можно сохранять, используя Fc-домен немодифицированного IgG или можно даже дополнительно повышать посредством гликоинженерии Fc-домена IgG.

Например, при создании изобретения был создан иммуноконъюгат клона CH1A1A на основе антитела к СЕА IgG-IL-2 qm, мишенью которого является СЕА, в котором один четырехмутантный IL-2 сливали с С-концом одной гетеродимерной тяжелой цепи через (SG₄)₃-линкер. В этот иммуноконъюгат не интродуцировали мутации P329G LALA (см. последовательности SEQ ID NO: 227, 229 и 231). Иммуноконъюгат экспрессировали и очищали в виде слитого белка, содержащего IgG дикого типа, или созданного с помощью гликоинженерии слитого белка IgG-IL-2 qm согласно описанному ниже методу.

Получение (подвергнутого гликоинженерии) иммуноконъюгата IgG-IL-2 qm.

Иммуноконъюгат на основе CH1A1A IgG-IL-2 qm, мишенью которого является СЕА, получали путем совместной трансфекции клеток HEK293-EBNA экспрессионными векторами, пригодными для антител млекопитающих. Клетки HEK293-EBNA на экспоненциальной фазе роста трансфектировали с помощью метода на основе фосфата кальция. Альтернативно этому, клетки HEK293, выращиваемые в суспензии, трансфектировали полиэтиленминимом. Для получения немодифицированного не подвергнутого гликоинженерии иммуноконъюгата IgG-IL-2 qm клетки трансфектировали только экспрессионными векторами для тяжелой и легкой цепей антитела в соотношении 1:1 (при этом вектор для тяжелой цепи антитела представлял собой смесь в соотношении 1:1 двух следующих векторов: вектор для тяжелой цепи с эффекторным фрагментом и вектор для тяжелой цепи без эффекторного фрагмента).

Для получения подвергнутого гликоинженерии иммуноконъюгата IgG-IL-2 qm, мишенью которого является СЕА, клетки совместно трансфектировали двумя дополнительными плазмидами, одна из которых предназначена для экспрессии слитого полипептида GnTIII (экспрессионный вектор для GnT-III), и одна из которых предназначена для экспрессии маннозидазы II (экспрессионный вектор для маннозидазы II комплекса Гольджи) в соотношении 4:4:1:1 соответственно. Клетки выращивали в виде прикрепленных монослойных культур в Т-колбах, используя культуральную среду DMEM, дополненную 10% FCS, и осуществляли их трансфекцию при конfluэнтности от 50 до 80%. Для трансфекции за 24 ч до осуществления трансфекции в T150-колбу высевали 15 миллионов клеток в 25 мл культуральной среды DMEM, дополненной FCS (конечная концентрация 10 об.%), и клетки выдерживали при 37°C в течение ночи в инкубаторе в атмосфере 5% CO₂. Для трансфекции каждой T150-колбы приготавливали раствор, содержащий ДНК, CaCl₂ и воду, путем смешения 94 мкг общей плазмидной ДНК вектора, взятой поровну из экспрессионных векторов легкой и тяжелой цепи, воды до конечного объема 469 мкл и 469 мкл раствора 1M CaCl₂. К этому раствору добавляли раствор, содержащий 938 мкл 50 mM HEPES, 280 mM

NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄, pH 7,05, немедленно перемешивали в течение 10 с и давали выстояться при комнатной температуре в течение 20 с. Суспензию разводили 10 мл среды DMEM, дополненной 2% FCS, и вносили в T150-колбу вместо находящейся в ней среды. Затем дополнительно вносили 13 мл среды для трансфекции. Клетки инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение примерно 17-20 ч, затем среду заменяли 25 мл DMEM, 10% FCS. Кондиционированную культуральную среду собирали примерно через 7 дней после замены среды путем центрифугирования в течение 15 мин при 210×g. Раствор стерилизовали фильтрацией (фильтр 0,22 мкм) и добавляли азид натрия в конечной концентрации 0,01% (мас./об.) и выдерживали при 4°C.

Секретируемые антитела дикого типа или подвергнутые гликоинженерии иммуноконъюгаты IgG-IL-2 qm, мишенью которого является СЕА, очищали из супернатантов клеточных культур с помощью аффинной хроматографии, используя аффинную хроматографию на белке А, а затем стадию гель-фильтрации на колонке HiLoad Супердекс 200 (фирма GE Healthcare) согласно описанному выше методу. Концентрацию белка, чистоту, молекулярную массу, содержание агрегатов и целостность анализировали согласно описанному выше методу.

Анализ олигосахаридной структуры (подвергнутых гликоинженерии) иммуноконъюгатов IgG-IL-2 qm.

Для определения относительных соотношений содержащих фукозу и не содержащих фукозу (афукозилированных) олигосахаридных структур высвободившиеся гликаны очищенных образцов иммуноконъюгатов анализировали с помощью MALDI-ToF-масс-спектрометрии. Образец иммуноконъюгата (примерно 50 мкг) инкубировали в течение ночи при 37°C с 5 мед. N-гликозидазы F (фирма QABio; PNGa3aF: E-PNG01) в 2 mM Трис, pH 7,0 для высвобождения олигосахарида из белкового каркаса. Для деаминации гликанов добавляли уксусную кислоту до конечной концентрации 150 mM и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Для анализа с помощью MALDI TOF-масс-спектрометрии 2 мкл образца смешивали на MALDI-мишени с 2 мкл матричного раствора DHB (2,5-дигидробензойная кислота (фирма Bruker Daltonics, № 201346), растворенного в смеси 50% этанола/5 mM NaCl в концентрации 4 мг/мл), и анализировали с помощью MALDI TOF-масс-спектрометра Autoflex II (фирма Bruker Daltonics). Как правило, в одном эксперименте получали и обобщали 50-300 изображений. Полученные спектры оценивали с помощью программы для flex-анализа (фирма Bruker Daltonics) и определяли массы для каждого обнаруженного пика. Затем пики оценивали в отношении содержащих фукозу и не содержащих фукозу (нефукозилированных) структур путем сравнения рассчитанных масс и теоретически ожидаемых масс для соответствующих структур (например, комплексных, гибридных структур и олигоманнозных или с высоким содержанием маннозы структур, соответственно, с фукозой и без фукозы).

Для определения относительного содержания гибридных структур образцы антител расщепляли одновременно с помощью N-гликозидазы F и эндогликозидазы H (фирма QABio; EndoH: E-EH02). N-гликозидаза F обеспечивает высвобождение всех N-связанных структур гликанов (комплексных, гибридных структур и олигоманнозных или с высоким содержанием маннозы структур) из белкового каркаса, а эндогликозидаза H расщепляет все гибридные типы гликанов дополнительно между двумя остатками N-ацетилглюкозамина (GlcNAc) на редуцирующем конце гликана. Этот продукт расщепления затем обрабатывали и анализировали с помощью MALDI TOF-масс-спектрометрии так же, как описано выше для расщепления образца N-гликозидазой F. Путем сравнения схемы, полученной в результате расщепления N-гликозидазой F и в результате расщепления комбинацией N-гликозидаза F/Endo H, уровень снижения сигналов конкретной углеводной структуры применяли для определения относительного содержания гибридных структур. Относительное содержание каждой углеводной структуры рассчитывали из соотношения высоты пика индивидуальной структуры и суммы высот пиков всех обнаруженных олигосахаридов. Количество фукозы определяли как процент содержащих фукозу структур относительно всех углеводных структур, идентифицированных в образце, обработанном N-гликозидазой F (например, комплексных, гибридных структур и олигоманнозных или с высоким содержанием маннозы структур). Количество нефукозилированных структур определяли как процент структур, в которых отсутствовала фукоза, относительно всех углеводных структур, идентифицированных в образце, обработанном N-гликозидазой F (например, комплексных, гибридных структур и олигоманнозных или с высоким содержанием маннозы структур).

Анализ антитело-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичности.

Осуществляли сравнение с использованием анализов ADCC иммуноконъюгатов CH1A1A IgG-IL-2, мишенью которых является СЕА, дикого типа и созданных с помощью гликоинженерии в отношении их способности опосредовать клеточную цитотоксичность. В целом, метод состоял в следующем: собирали в качестве клеток-мишеней сверхэкспрессирующие СЕА человеческие опухолевые клетки линии A549, отмывали и ресуспендировали в культуральной среде, окрашивали свежеприготовленным кальцеином АМ (фирма Molecular Probes) при 37°C в течение 30 мин, отмывали трижды, подсчитывали количество клеток и разводили до 300000 клеток/мл. Эту суспензию переносили в круглодонный 96-луночный планшет (N = 30000 клеток/луночку), добавляли разведение соответствующего иммуноконъюгата и инкубировали в течение 10 мин для облегчения связывания тестируемого иммуноконъюгата с клетками до контакта с эффекторными клетками. Соотношение эффекторных клеток и клеток-мишеней составляло

25:1 в случае свежевыделенных РВМС. Совместную инкубацию осуществляли в течение 4 ч. Применяли две различные системы получения выходных данных: высвобождение лактатдегидрогеназы (LDH) в супернатант после расщепления "атакуемых" клеток и сохранение кальцеина в выживших клетках. LDH из супернатанта совместной культуры собирали и анализировали с помощью набора для выявления LDH (фирма Roche Applied Science). Превращение субстрата с помощью фермента LDH измеряли с использованием ридера абсорбции для ELISA (программа SoftMaxPro, длины референс-волн: 490 нм, 650 нм). Остаточный кальцин в живых клетках анализировали с помощью ридера флуоресценции (Wallac VICTOR3 1420 Multilabel COUNTER (фирма Perkin Elmer)) после отделения оставшегося супернатанта от клеточного дебриса, однократно промывали в 3ФР перед осуществлением лизиса и фиксировали клетки с помощью боратного буфера (50 мМ борат, 0,1% Тритон). На фиг. 16 продемонстрированы результаты, основанные на определении LDH. Аналогичные результаты получали на основе оценки сохранения кальцеина (данные не представлены). Обе конструкции обладали способностью опосредовать ADCC, при этом созданная с помощью гликоинженерии конструкция обладала такой же активностью, что и соответствующий созданный с помощью гликоинженерии неконъюгированный IgG. Как и ожидалось, у не подвергнутой гликоинженерии конструкции обнаружена пониженная активность по сравнению с созданной с помощью гликоинженерии конструкции.

Пример 4.

Создавали иммуноконъюгаты IgG-IL-2, мишенью которых является FAP, на основе 28H1 или 4B9, иммуноконъюгаты, мишенью которых является CEA, на основе CH1A1A 98/99 2F1 и "ненаправленные" иммуноконъюгаты на основе DP47GS, в которых один полипептид IL-2 дикого типа сливали с С-концом одной гетеродимерной тяжелой цепи. Для гетеродимеризации, приводящей к получению иммуноконъюгата с одним IL-2-фрагментом, использовали технологию "knob-into-hole". Для того чтобы минимизировать создание гомодимерных слияний IgG-IL-2, цитокин сливали с содержащей "выступ" тяжелой цепью (с делецией С-концевого остатка Lys) через $G_4(SG_4)_2$ - или $(G_4S)_3$ -линкер. Последовательности этих иммуноконъюгатов представлены в SEQ ID NO: 193, 197 и 205 (28H1 с линкером $G_4(SG_4)_2$) SEQ ID NO: 207, 273 и 211 (4B9 с линкером $(G_4S)_3$), SEQ ID NO: 277, 279 и 283 (CH1A1A 98/99 2F1 с линкером $(G_4S)_3$), SEQ ID NO: 219, 223 и 225 (DP47GS с линкером $G_4(SG_4)_2$), SEQ ID NO: 219, 293 и 225 (DP47GS с линкером $(G_4S)_3$). Слияние антитело-цитокин обладало IgG-подобными свойствами. Для снижения способности связываться с Fc γ R/эффекторной функции и предупреждения совместной активации FcR в Fc-домен интродуцировали мутации P329G L234A L235A (LALA). Обе конструкции очищали согласно описанным выше методам. Конечную очистку осуществляли с помощью гель-фильтрации (HiLoad 26/60 Супердекс 200, фирма GE Healthcare) в буфере для конечного продукта, содержащем 20 мМ гистидин, 140 мМ хлорид натрия, pH 6. На фиг. 17-20 представлены соответствующие хроматограммы и профили элюции, полученные при очистке (А, Б), а также результаты, полученные с помощью аналитического ДСН-ПААГ и гель-фильтрации, конечных очищенных конструкций (В, Г). Выход составлял 15,6 мг/л для "ненаправленного" иммуноконъюгата DP47GS IgG-IL-2, 26,7 мг/мл для иммуноконъюгата 28H1 IgG-IL-2, 4,6 мг/л для иммуноконъюгата CH1A1A 98/99 2F1 IgG-IL-2 и 11 мг/л для иммуноконъюгата 4B9 IgG-IL-2.

Затем способность указанных иммуноконъюгатов связываться с FAP, соответственно отсутствие связывания, а также связывание с $\beta\gamma$ -цепью IL-2R и α -цепью IL-2R определяли с помощью SPR согласно описанному выше методу (см. пример 2). Изучали также клеточную активность в отношении популяций иммунных эффекторных клеток и фармакодинамическое действие *in vivo*.

Пример 5.

Иммуноконъюгаты IgG-IL-10 на основе 4G8, мишенью которых является FAP, а также на основе 2B10, мишенью которых является TNC A2, создавали путем слияния двух различных форматов цитокина IL-10 с С-концом тяжелой цепи гетеродимерного IgG, содержащего модификацию, приводящую к образованию "впадины": таких как формат в виде либо одноцепочечного IL-10, в который встраивали 20-мерный линкер $(G_4S)_4$ между двумя молекулами IL-10, либо сконструированного мономерного IL-10 (Josephson и др., J. Biol. Chem. 275, 2000, сс. 13552-13557). Обе молекулы сливали через 15-мерный линкер $(G_4S)_3$ с С-концом тяжелой цепи, содержащей модификацию, приводящую к образованию "впадины", с делецией С-концевого остатка Lys. Для достижения гетеродимеризации, приводящей к получению только одной тяжелой цепи, несущей IL-10-фрагмент, применяли технологию "knob-into-hole". Слияние IgG-цитокин обладало IgG-подобными свойствами. Для снижения способности связываться с Fc γ R/эффекторной функции и предупреждения совместной активации FcR в Fc-домен интродуцировали мутации P329G LALA. Последовательности соответствующих конструкций представлены в SEQ ID NO: 233, 235 и 239 (2B10 с scIL-10), SEQ ID NO: 233, 237 и 239 (2B10 с мономерным IL-10 "IL-10M1"), SEQ ID NO: 241, 243 и 205 (4G8 с scIL-10), SEQ ID NO: 241, 245 и 205 (4G8 с IL-10M1). Все эти иммуноконъюгаты очищали согласно описанным выше методам. Затем их способность связываться с FAP или TNC A2 соответственно, а также их аффинность к человеческому IL-10R1 определяли с помощью SPR, используя биосенсор ProteOn XPR36. В целом, метод состоял в следующем: мишени, т.е. FAP или TNC A2, а также человеческий IL-10R1 иммобилизовали, располагая их в вертикальном направлении на поверх-

ности сенсорного чипа (FAP с помощью стандартного аминного сочетания, TNC A2, и человеческий IL-10R1 (оба биотинилированные через C-концевую avi-метку) путем захвата нейтравидином). Затем иммуноконъюгаты IgG-IL-10 инъецировали в шести различных концентрациях, включая нулевую концентрацию, в качестве анализируемых веществ, располагая их в горизонтальном направлении. После оценки с использованием двух стандартов сенсограммы аппроксимировали, применяя модель взаимодействия 1:1, для определения кинетических констант скорости и аффинности. На фиг. 21 и 22 представлены результаты анализа с использованием аналитического ДСН-ПААГ и данные определения на основе SPR аффинности к антигенам-мишеням, а также к IL-10-рецептору. Данные демонстрируют, что связывание иммуноконъюгатов с TNC A2 или FAP характеризовалось значениями K_D 52 или 26 пМ соответственно, а значения K_D к IL-10-рецептору составляли 520 и 815 пМ.

Пример 6.

Согласно методам, описанным выше, создавали и экспрессировали слитые белки IgG-цитокин, которые состояли только из одной области Fab на основе 28H1 или на основе 4B9, мишенью которой является FAP, слитой с N-концом субъединицы Fc-домена, содержащей модификацию, приводящую к образованию "впадины", в то время как вторую область Fab тяжелой цепи IgG с модификацией, приводящей к образованию "выступа", заменяли на цитокиновый фрагмент, применяя линкер $(G_4S)_n$ ($n=1$). См. на фиг. 2B схематическое изображение этого формата иммуноконъюгата (обозначенного так же как формат "1+1"). Применяемые цитокиновые фрагменты представляли собой четырехмутантный IL-2, описанный выше, а также в заявке на патент PCT № PCT/EP 2012/051991 (см. SEQ ID NO: 3), IL-7 и IFN- α . Соответствующие последовательности слитых полипептидов, содержащие цитокиновый фрагмент, слитый с N-концом субъединицы Fc-домена, которая содержит модификацию, приводящую к образованию "выступа", через линкерный пептид, представлены в SEQ ID NO: 247 (содержит четырехмутантный IL-2), SEQ ID NO: 249 (содержит IL-7) и SEQ ID NO: 251 (содержит IFN- α). В этих конструкциях направленное действие иммуноконъюгата достигалось благодаря высокой аффинности одновалентной области Fab. Такой формат можно рекомендовать в случаях, в которых интернализацию антигена можно снижать с использованием одновалентного связывающего агента. Иммуноконъюгаты получали, очищали и анализировали согласно описанным выше методам. Для конструкций, содержащих IL-2 qm или IL-7 в одном цикле объединяли аффинную хроматографию на белке A и гель-фильтрацию. В качестве буфера для гель-фильтрации и для конечного продукта применяли буфер, содержащий 20 mM гистидин, 140 mM NaCl, pH 6.0. На фиг. 23-26 представлены профили элюции и хроматограммы, полученные при очистке, а также результаты, полученные с помощью аналитического ДСН-ПААГ и хроматограммы, полученные при гель-фильтрации, конечных очищенных конструкций. Выход составлял 11 мг/л для конструкции 4B9 "1+1" IgG-IL-2 qm, 43 мг/л для 28H1 "1+1" IgG-IL-2 qm, 20,5 мг/л для 4B9 "1+1" IgG-IL-7 и 10,5 мг/л для 4B9 "1+1" IgG-IFN- α .

Оценивали способность конструкций "1+1", содержащих IL-2 qm, индуцировать пролиферацию NK-клеток в сравнении с иммуноконъюгатами IgG-IL-2 qm. NK92-клетки выращивали в минимальной среде в течение 2 ч, затем высевали 10000 клеток/лунку в 96-луночный планшет с прозрачным черным плоским дном. Иммуноконъюгаты добавляли титрометрически к посеянным NK-92-клеткам. Через 72 ч определяли содержание АТФ для оценки количества жизнеспособных клеток с использованием набора для анализа "CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay" (фирма Promega) согласно инструкциям производителя. На фиг. 27 продемонстрировано, что конструкции "1+1" обладали способностью индуцировать пролиферацию клеток NK-92, обладая при этом несколько более низкой активностью по сравнению с соответствующими конструкциями IgG-IL-2 qm.

Конструкции "1+1" на основе 4B9, содержащие IL-2 qm или IL-7, оценивали в отношении их способности индуцировать Т-клеточную пролиферацию в сравнении с иммуноконъюгатами IgG-IL-2. Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) получали с помощью Histopaque-1077 (фирма Sigma Diagnostics Inc., Сент-Луис, шт. Миссури, США). В целом, метод состоял в следующем: лейкоцитарные пленки крови разводили в соотношении 5:1 3ФР, не содержащим кальций и магний, и наслаивали на Histopaque-1077. Градиент центрифугировали при 450×g в течение 30 мин при комнатной температуре (КТ) без перерыва. Собирали содержащую PBMC интерфазу, и отмывали трижды 3ФР (350×g, затем 300×g в течение 10 мин при КТ). PBMC предварительно стимулировали с использованием 1 мкг/мл ФГА-М (фирма Sigma Aldrich, № L8902) в течение ночи перед их мечением с помощью 100 нМ CFSE (сложный сукцинимидиловый эфир карбоксифлуоресцеина) в течение 15 мин при 37°C. Клетки отмывали 20 мл среды перед выделением меченых PBMC в течение 30 мин при 37°C. Клетки отмывали, подсчитывали и по 100000 клеток высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном. Иммуноконъюгаты добавляли титрометрически к посеянным клеткам, осуществляя инкубации в течение 6 дней. Затем клетки отмывали, окрашивали соответствующими маркерами клеточной поверхности и анализировали с помощью FACS, используя устройство BD FACSCantoII. CD4-Т-клетки идентифицировали как CD3⁺/CD8⁻, а CD8-Т-клетки как CD3⁺/CD8⁺.

На фиг. 28 продемонстрировано, что конструкции "1+1", содержащие либо IL-2 qm, либо IL-7, обладали способностью индуцировать пролиферацию ФГА-активированных CD4- (А) и CD8-Т-клеток (Б).

Также как в случае НК-клеток, конструкция "1+1", содержащая IL-2 qm, обладала несколько более низкой активностью по сравнению с конструкцией IgG-IL-2 qm.

Конструкцию "1+1" на основе 4B9, содержащую IFN- α , тестировали в отношении ее способности ингибировать пролиферацию клеток Дауди в сравнении с рофероном А (фирма Roche). В целом, метод состоял в следующем: клетки Дауди метили 100 нМ (витальным красителем) CFSE и высевали в 96-луночный планшет с U-образным дном (50000 клеток/луночку). Молекулы добавляли в указанных концентрациях, а затем инкубировали в течение 3 дней при 37°C. Пролиферацию оценивали количественно, анализируя разведение CFSE, при котором происходит исключение погибших клеток из анализа путем применения красителя, позволяющего анализировать живые/погибшие клетки.

На фиг. 29 продемонстрировано, что конструкция обладала способностью ингибировать пролиферацию клеток Дауди, по меньшей мере, столь же эффективно, что и роферон А.

Пример 7.

Фармакокинетическое (ФК) исследование одноразовой дозы иммуноконъюгатов IgG-IL2, мишенью которых является FAP, содержащих либо дикого типа, либо четырехмутантный IL-2, и "ненаправленных" иммуноконъюгатов IgG-IL-2, содержащих либо дикого типа, либо четырехмутантный IL-2, осуществляли на не имеющих опухолей иммунокомпетентных мышах линии 129.

Самок мышей линии 129 (фирма Harlan, Великобритания), возраст которых в начале эксперимента составлял 8-9 недель, содержали в специальных условиях без патогенов с суточными циклами 12 ч света/12 ч темноты согласно принятым руководствам (GV-Solas; Felasa; TierschG). Протокол экспериментального исследования был рассмотрен и одобрен местными органами управления (P 2008016). После доставки животных выдерживали в течение одной недели для акклиматизации к новому окружению и для обследования. В течение всего периода времени регулярно осуществляли мониторинг состояния здоровья.

Мышам однократно инъецировали i.v. иммуноконъюгаты, мишенью которых является FAP, такие как 28H1 IgG-IL2 wt (2,5 мг/кг) или 28H1 IgG-IL2 qm (5 мг/кг), или "ненаправленные" иммуноконъюгаты DP47GS IgG-IL2 wt (5 мг/кг) или DP47GS IgG-IL2 qm (5 мг/кг). Всем мышам инъецировали i.v. по 200 мкл соответствующего раствора. Для получения соответствующего количества иммуноконъюгата на 200 мкл маточные растворы при необходимости разводили 3ФР.

У мышей брали образцы крови в следующие моменты времени: 1, 8, 24, 48, 72, 96 ч и после этого через каждые 2 дня в течение 3 недель. Сыворотку экстрагировали и хранили при -20°C до осуществления анализа ELISA. Концентрации иммуноконъюгатов в сыворотке определяли, применяя ELISA для количественной оценки антитела, входящего в содержащий IL-2 иммуноконъюгат (фирма Roche-Penzberg). Абсорбцию определяли, осуществляя измерения при длине волны 405 нм и длине референс-волны 492 нм (настраиваемый ридер для микропланшетов типа VersaMax, фирма Molecular Devices).

На фиг. 30 представлены результаты фармакокинетического исследования указанных иммуноконъюгатов, содержащих IL-2. Как конструкции, мишенью которых является FAP (А), так и "ненаправленные" (Б) конструкции IgG-IL2 qm, имели более продолжительное время полужизни в сыворотке (примерно 30 ч) по сравнению с соответствующими конструкциями IgG-IL2 wt (примерно 15 ч). Следует отметить, что хотя экспериментальные условия не являлись непосредственно сопоставимыми, время полужизни в сыворотке содержащих IL-2 иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении, по-видимому, было более продолжительным, чем время полужизни в сыворотке известных в данной области иммуноконъюгатов "2+2" IgG-IL-2 (см. фиг. 1), которые описаны у Gillies и др., Clin Cancer Res 8, 2002, сс. 210-216.

Соединение	Доза	Состав буфера	Концентрация (мг/мл)
28H1-IgG-IL2 wt	2,5 мг/кг	20мМ гистидин, 140мМ NaCl, pH 6,0	3,84 (маточный раствор)
28H1-IgG-IL2 qm	5 мг/кг	20мМ гистидин, 140мМ NaCl, pH 6,0	2,42 (маточный раствор)
DP47GS-IgG-IL2wt	5 мг/кг	20мМ гистидин, 140мМ NaCl, pH 6,0	3,74 (маточный раствор)
DP47GS-IgG-IL2QM	5 мг/кг	20мМ гистидин, 140мМ NaCl, pH 6,0	5,87 (маточный раствор)

Пример 8.

Осуществляли изучение биораспределения для анализа направленного переноса к опухоли иммуноконъюгатов, предлагаемых в изобретении. Проводили сравнение иммуноконъюгата на основе 28H1 IgG-IL-2 qm, мишенью которого является FAP, и антител, мишенью которых является FAP, таких как 28H1 IgG и 4B9 IgG, и "ненаправленного" DP47GS IgG. Кроме того, осуществляли визуализацию с использованием СPECT (однофотонная эмиссионная компьютерная томография)/СТ (компьютерная томография) с использованием 4B9 IgG-IL-2 qm в сравнении с DP47GS IgG-IL-2 qm, 4B9 IgG и DP47GS IgG.

Конъюгация с DTPA и мечение с помощью ¹¹¹In.

Растворы 28H1 IgG-IL-2 qm, 28H1 IgG₁, 4B9 IgG-IL-2 qm, 4B9 IgG₁ и DP47 IgG₁ подвергали диализу в противотоке забуференного фосфатом физиологического раствора (ЗФР, 15 мМ). Два миллиграмма конструкций (5 мг/мл) конъюгировали с изотиоцианатбензильдиэтилентриаминпентауксусной кислотой

(ИТС-ДТРА, фирма Macrocyclis, Даллас, шт. Техас) в 0,1М NaHCO₃, pH 8,2, в условиях, строго отличающихся отсутствием металлов, путем инкубации с 5-кратным молярным избытком ИТС-ДТРА в течение 1 ч при комнатной температуре (КТ). Неконъюгированную ИТС-ДТРА удаляли путем диализа в противотоке буфера на основе 0,1М 2-(N-морфолино)этансульфоновой кислоты (MES), pH 5,5.

Очищенные конъюгаты радиоактивно метили путем инкубации с ¹¹¹In (фирма Covidien BV, Петтен, Нидерланды) в 0,1М MES-буфере, pH 5,5, содержащим 0,05% бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 0,05% Твин-80, при КТ в условиях, строго отличающихся отсутствием металлов, в течение 30 мин. После радиоактивного мечения добавляли этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТК) до конечной концентрации 5 мМ для образования хелатного комплекса с несвязанным ¹¹¹In. Меченные с помощью ¹¹¹In продукты очищали путем гель-фильтрации на одноразовых колонках G25M (PD10, фирма Amersham Biosciences, Уппсала, Швеция). Определяли радиохимическую чистоту очищенных меченных с помощью ¹¹¹In конструкции с помощью тонкослойной экспресс-хроматографии (ITLC) на хроматографических пластинах TEC Control (фирма Biodex, Ширли, шт. Нью-Йорк), используя 0,1М цитратный буфер, pH 6,0 в качестве подвижной фазы. Удельная активность меченных с помощью ¹¹¹In препаратов составляла 0,6-4,6 МВк/мкг.

Анализ Lindmo.

Определяли иммунореактивную фракцию меченных с помощью ¹¹¹In препаратов антител, применяя описанный ранее метод (Lindmo и др., J. Immunol. Methods 72, 1984 сс. 77-89). В целом, метод состоял в следующем: серии серийных разведений клеток почки человеческого эмбриона (НЕК), трансфектированных кДНК фибробласт-активирующего белка (FAP) (клетки НЕК-FAP), инкубировали с меченной 200 Вк ¹¹¹In конструкцией при 37°C в течение 1 ч. Дубликат с наименьшей концентрацией клеток инкубировали в присутствии избытка немеченой конструкции для коррекции неспецифического связывания. После инкубации клетки отмывали, интенсивно перемешивали и определяли ассоциированную с клетками радиоактивность в клеточном дебрисе с использованием счетчика γ -лучей (Wallac Wizzard 3" 1480 автоматический γ -счетчик, фирма Pharmacia LKB). Содержание иммунореактивной фракции составляло 75-94%.

Животные.

Самок бестимусных мышей линии BALB/c (8-9 недель, ± 20 г) покупали у фирмы Janvier и содержали в центральной лаборатории по разведению животных медицинского центра университета Радбода г. Неймегена в стандартных условиях по 5 животных в каждой вентилируемой клетке, при этом они имели свободный доступ к корму и воде. После акклиматизации в течение 1 недели животным инокулировали с.с. по 10×10^6 НЕК-FAP-клеток в матрикеле (1:3) в левую боковую область и необязательно по 5×10^6 НЕК-293-клеток в матрикеле (1:3) в правую боковую область. Осуществляли мониторинг роста ксенотрансплантатов путем измерения штангенциркулем (объем = $(4/3 \times \pi) \times (1/2 \times \text{длина}) \times (1/2 \times \text{ширина}) \times (1/2 \times \text{глубина})$). Когда ксенотрансплантаты достигали объема 100 мм³ мышам инъецировали i.v. меченные с помощью ¹¹¹In конструкции.

Биораспределение (28H1 IgG-IL-2 qm, 28H1 IgG₁, 4B9 IgG₁ и DP47GS IgG₁).

Меченные с помощью ¹¹¹In конструкции (5 МВк, 150 мкг, 200 мкл) инъецировали i.v. в хвостовую вену. Через 24 ч после инъекции животных умерщвляли путем асфиксии в атмосфере CO₂/O₂. Получали образцы крови, мышц, ксенотрансплантата, легкого, селезенки, поджелудочной железы, почки, желудка (пустой), двенадцатиперстной кишки (пустая) и печени, взвешивали и определяли радиоактивность с помощью счетчика γ -лучей (Wallac Wizard). Стандарты инъецированной дозы (1%) подсчитывали одновременно и поглощение тканью рассчитывали как % от инъецированной дозы на грамм ткани (% ID/g).

SPECT-КТ-анализ (4B9 IgG-IL-2 qm, 4B9 IgG₁, DP47GS IgG-IL-2 qm и DP47GS IgG₁).

Меченные с помощью ¹¹¹In 4B9-IgG-IL-2 qm, 4B9-IgG₁, DP47GS-IgG-IL-2 qm и DP47GS-IgG₁ инъецировали i.v. (20 МВк, 50, 150, 300 мкг, 200 мкл). Через 4, 24, 72 и 144 ч после инъекции животных анестезировали изофлураном/O₂ и сканировали в течение 30-60 мин с использованием камеры U-SPECT II microSPECT/CT (фирма MILabs, Утрехт, Нидерланды), снабженной 1,0-миллиметровым коллиматором для мышей. Компьютерную томографию (СТ) осуществляли непосредственно после SPECT. Как полученные с помощью SPECT (размер воксела 0,4 мм), так и СТ-сканы реконструировали с помощью программы MILabs и SPECT- и СТ-сканы регистрировали совместно для определения точной локализации радиосигнала. Создавали 3D-изображения с помощью программы Siemens Inveon Research Workplace.

На фиг. 31 продемонстрировано, что не обнаружены существенные различия в распределении между тканями и направленным переносом в опухоль конструкций 28H1- и 4B9-IgG₁ и 28H1 IgG-IL-2 qm через 24 ч (т.е. цитокин не изменяет существенно распределение в тканях и направленный перенос в опухоль иммуноконъюгатов), а также, что соотношение содержаний в опухоли/крови конструкций, мишенью которых является FAP, существенно выше "ненаправленного" контрольного DP47GS IgG.

Эти результаты подтверждали при визуализации с использованием SPECT/CT для иммуноконъюгата 4B9 IgG-IL-2 qm (данные не представлены). 4B9 IgG-IL-2 qm локализовался в FAP-позитивных НЕК-FAP-клетках, но не локализовался в FAP-негативных контрольных опухолях из НЕК-293, в то время как "ненаправленный" иммуноконъюгат на основе DP47GS не локализовался ни в какой опухоли. В отличие

от неконъюгированных IgG слабое поглощение 4B9 IgG-IL-2 qm обнаружено также в селезенке.

Пример 9.

Осуществляли сравнение связывания иммуноконъюгатов на основе 28H1 IgG-IL-2 qm и на основе 28H1 IgG-(IL-2 qm)₂ (т.е. иммуноконъюгата, имеющего формат "2+2", представленного на фиг. 1; последовательности представлены в SEQ ID NO: 253 и 205) с NK92-клетками. В 96-луночный планшет высевали по 200000 NK92-клеток на лунку. Иммуноконъюгаты добавляли титрометрически к NK92-клеткам и инкубировали в течение 30 мин при 4°C, давая пройти связыванию. Клетки отмывали дважды 3ФР, содержащим 0,1% БСА, для удаления несвязанных конструкций. Для выявления иммуноконъюгатов добавляли меченное с помощью ФИТЦ античеловеческое Fc-специфическое антитело в течение 30 мин при 4°C. Клетки вновь отмывали дважды 3ФР, содержащим 0,1% БСА, и анализировали с помощью FACS с использованием устройства BD FACSCantoII.

Как проиллюстрировано на фиг. 32, для иммуноконъюгата "2+2" характерен более высокий уровень связывания с NK92-клетками по сравнению с соответствующей конструкцией "2+1".

Пример 10.

Индукция пролиферации человеческих PBMC содержащими IL-2 иммуноконъюгатами.

Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) получали с помощью Histopaque-1077 (фирма Sigma Diagnostics Inc., Сент-Луис, шт. Миссури, США). В целом, метод состоял в следующем: образцы венозной крови здоровых добровольцев отбирали в гепаринизированные шприцы. Кровь разводили в соотношении 2:1 3ФР, не содержащим кальций и магний, и наслаивали на Histopaque-1077. Градиент центрифугировали при 450×g в течение 30 мин при комнатной температуре (КТ) без перерыва. Собирали содержащую PBMC интерфазу, и отмывали трижды 3ФР (350×g, после чего центрифугировали при 300×g в течение 10 мин при КТ).

Затем PBMC метили с помощью 40 нМ CFSE (сложный сукцинимидиловый эфир карбоксифлуоресцеина) в течение 15 мин при 37°C. Клетки отмывали 20 мл среды перед выделением меченых PBMC в течение 30 мин при 37°C. Клетки отмывали, подсчитывали и по 100000 клеток высевали в 96-луночные планшеты с U-образным дном. Предварительно разведенный пролейкин (поступающий в продажу IL-2 дикого типа) или содержащие IL2 иммуноконъюгаты добавляли титрометрически к посеянным клеткам, которые инкубировали в течение указанных промежутков времени. Через 4-6 дней клетки отмывали, окрашивали для выявления соответствующих маркеров клеточной поверхности и анализировали с помощью FACS, используя устройство BD FACSCantoII. NK-клетки определяли как CD3⁺/CD56⁺, CD4-T-клетки как CD3⁺/CD8⁺, а CD8-T-клетки как CD3⁺/CD8⁺.

На фиг. 33 продемонстрированы данные о пролиферации NK-клеток после инкубации с различными иммуноконъюгатами 28H1 IL-2, мишенью которых является FAP, в течение 4 (А), 5 (Б) или 6 (В) дней. Все тестируемые конструкции индуцировали пролиферацию NK-клеток в зависимости от концентрации. Пролейкин оказался более эффективным, чем иммуноконъюгаты при применении в более низких концентрациях, однако это различие не обнаружено при более высоких концентрациях. В более ранние моменты времени (день 4) конструкции IgG-IL2 обладали несколько более высокой эффективностью, чем конструкции Fab-IL2-Fab. В более поздние моменты времени (день 6) эффективность всех конструкций была сопоставимой, при этом конструкция Fab-IL2 qm-Fab обладала слабой эффективностью при применении в низких концентрациях.

На фиг. 34 продемонстрированы данные о пролиферации CD4-T-клеток после инкубации с различными иммуноконъюгатами 28H1 IL-2, мишенью которых является FAP, в течение 4 (А), 5 (Б) или 6 (В) дней. Все тестируемые конструкции индуцировали пролиферацию CD4-T-клеток в зависимости от концентрации. Пролейкин оказался более эффективным, чем иммуноконъюгаты, а иммуноконъюгаты, содержащие IL-2 дикого типа, обладали несколько более высокой эффективностью, чем содержащие четырехмутантный IL-2. Так же как и в случае NK-клеток, конструкция Fab-IL2 qm-Fab обладала наименьшей активностью. Наиболее вероятно, пролиферирующие CD4-T-клетки частично представляют собой регуляторные Т-клетки, по меньшей мере, при анализе результатов, полученных для конструкций, содержащих IL-2 дикого типа.

На фиг. 35 продемонстрированы данные о пролиферации CD8-T-клеток после инкубации с различными иммуноконъюгатами 28H1 IL-2, мишенью которых является FAP, в течение 4 (А), 5 (Б) или 6 (В) дней. Все тестируемые конструкции индуцировали пролиферацию CD8-T-клеток в зависимости от концентрации. Пролейкин оказался более эффективным, чем иммуноконъюгаты, а иммуноконъюгаты, содержащие IL-2 дикого типа, обладали несколько более высокой эффективностью, чем содержащие четырехмутантный IL-2. Так же как и в случае NK-клеток и CD4-T-клеток, конструкция Fab-IL2 qm-Fab обладала наименьшей активностью.

Пример 11.

Пролиферация и активация индуцированной клеточной гибели активируемых IL-2 PBMC.

Свежевыделенные из организма здоровых доноров PBMC предварительно активировали в течение ночи с помощью ФГА-М в концентрации 1 мкг/мл в среде RPMI1640, содержащей 10% FCS и 1% глутамина. После предварительной активации PBMC собирали, метили с помощью 40 нМ CFSE в 3ФР и вы-

севали в 96-луночные планшеты из расчета 100000 клеток/лунку. Предварительно активированные PBMC стимулировали, используя в различных концентрациях иммуноконъюгаты, содержащие IL-2 (4B9 IgG-IL-2 wt, 4B9 IgG-IL-2 qm, 4B9 Fab-IL-2 wt-Fab и 4B9 Fab-IL-2 qm-Fab). Через 6 дней после обработки с помощью IL-2 PBMC обрабатывали в течение ночи активирующим антителом к Fas в концентрации 0,5 мкг/мл. Через 6 дней анализировали пролиферацию CD4-(CD3⁺CD8⁻) и CD8-(CD3⁺CD8⁺) Т-клеток, используя разведения CFSE. Процент живых Т-клеток после обработки антителом к Fas определяли путем установки дискриминационного окна на CD3⁺, аннексин V-негативных живых клеток.

Как продемонстрировано на фиг. 36, все конструкции индуцировали пролиферацию предварительно активированных Т-клеток. При применении в низких концентрациях конструкции, содержащие IL-2 дикого типа (wt), оказались более активными, чем содержащие IL-2 qm конструкции. IgG-IL-2 wt, Fab-IL-2 wt-Fab и пролейкин обладали сходной активностью. Конструкция Fab-IL-2 qm-Fab обладала несколько более низкой активностью, чем IgG-IL-2 qm. Конструкции, содержащие IL-2 дикого типа, обладали более высокой активностью в отношении CD4-Т-клеток, чем в отношении CD8-Т-клеток, наиболее вероятно из-за активации регуляторных Т-клеток. Конструкции, содержащие четырехмутантный IL-2, обладали сходной активностью в отношении CD8- и CD4-Т-клеток.

Как продемонстрировано на фиг. 37, Т-клетки, стимулированные IL-2 дикого типа в высоких концентрациях, обладали большей чувствительностью к индуцируемому антителом к Fas апоптозу, чем Т-клетки, обработанные четырехмутантным IL-2.

Пример 12.

Дополнительно изучали "ненаправленные" конструкции на основе DP47GS (см. последовательности VH и VL в SEQ ID NO: 299 и 297 соответственно). Согласно описанному выше методу создавали конъюгаты на основе DP47GS IgG, содержащие дикого типа или четырехмутантный IL-2. Для этих конструкций обнаружена сходная способность связываться с IL-2R и индуцировать пролиферацию иммунной клетки (например, NK-клетки, CD8⁺-клетки и CD4⁺-клетки) *in vitro*, что и у соответствующих имеющих специфическую мишень конструкций (данные не представлены). Однако в отличие от иммуноконъюгатов, мишенью которых является опухолевый антиген, они не накапливались в опухолевой ткани (см. пример 8).

Дополнительное фармакокинетическое исследование (в дополнение к изложенному в примере 7) осуществляли с использованием "ненаправленных" конструкций DP47GS IgG-IL-2, содержащих либо дикого типа, либо четырехмутантный IL-2. Самцам мышей линии C57BL/6J (n = 6 на группу) инъецировали *i.v.* 0,3, 1, 3 или 10 мг/кг конструкции DP47GS IgG-IL-2 wt или DP47GS IgG-IL-2 qm. Инъецируемый объем составлял 1 мл для всех мышей. Образцы крови отбирали через 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96 и 168 ч после инъекции (из 3 мышей в каждый момент времени) и хранили при -20°C до анализа. Определяли количество конструкций в образцах сыворотки с помощью ELISA, используя антитела к Fab для иммобилизации и идентификации конструкций. Все образцы и применяемые для калибровки стандарты разводили в соотношении 1:25 в мышинной сыворотке (полученной от фирмы Bioreclamation) перед анализом. В целом, метод состоял в следующем: сенсibilизированные стрептавидином 96-луночные планшеты (фирма Roche) отмывали трижды в течение 10 с 3ФР/0,05% Твин 20, после чего инкубировали с 100 мкл/лунку (0,5 мкг/мл) биотинилированным антителом к человеческому Fab (M-1.7.10; фирма Roche Diagnostics) в течение 1 ч при комнатной температуре. После повторной отмывки планшета трижды 3ФР/0,05% Твин 20 добавляли по 50 мкл/лунку образца сыворотки или применяемых для калибровки стандартов и 50 мкл/лунку 3ФР/0,5% БСА до достижения конечного разведения образца 1:50. Образцы инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, а затем вновь отмывали планшет трижды с помощью 3ФР/0,05% Твин 20. Затем планшеты инкубировали с меченым с помощью дигоксигенина антителом к человеческому Fab (M-1.19.31; Roche Diagnostics), которое вносили из расчета 100 мкл/лунку (0,5 мкг/мл), в течение 1 ч при комнатной температуре, отмывали, инкубировали с антителом к дигоксигенину POD (Roche Diagnostics, каталожный № 11633716001), которое вносили из расчета 100 мкл/лунку, в течение 1 ч при комнатной температуре и вновь отмывали. И, наконец, добавляли по 100 мкл/лунку субстрата для пероксидазы TMB (фирма Roche Diagnostics, каталожный № 11484281001) в течение примерно 5 мин, затем для прекращения реакции с субстратом использовали по 50 мкл/лунку 2н. HCl. Планшет считывали в течение 2 мин после прекращения реакции при длине волны 450 нм и длине референс-волны 650 нм.

Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 38. Обе конструкции обладали удлинненным временем полужизни, при этом конструкция, содержащая четырехмутантный IL-2 (Б), обладала более продолжительным временем жизни, чем конструкция, содержащая IL-2 дикого типа (А).

Кроме того, было подтверждено отсутствие связывания DP47GS IgG с различными белками, а также с человеческими клетками (PBMC).

Наличие специфического связывания (или его отсутствие) антитела DP47GS оценивали с помощью тест-системы на основе ELISA с использованием панели различных неродственных антигенов. Анализ осуществляли в 384-луночных титрационных микропланшетах MaxiSorp™ (фирма Thermo Scientific Nunc, каталожный № 460372). После каждой стадии инкубации планшеты отмывали трижды 3ФР/0,05% Твин-20. Сначала различными антигенами, разведенными в 3ФР, сенсibilизировали планшеты в течение

ние ночи при 6°C. Тестируемые концентрации и подробная информация о применяемых антигенах представлены ниже в таблице.

Антиген	Источник	Поставщик	Каталожный №	Тестируемая концентрация [мкг/мл]
гистоны	тимус теленка	Roche Diagnostics	10223565601	2
БСА, фракция V	бычий	Roche Diagnostics	10735108001	2
инсулин	человеческий	Roche Diagnostics	11376497001	2
кардиолипид	бычий	Sigma-Aldrich	C1649	2
гепарин	свиной	Sigma-Aldrich	H9902	2
CD40 (hFc)	человеческий	Sino Biological	1077-H03H	1
паратиреоидный гормон, ак 1-34 (PTH) (биотинилированный)	человеческий	AnaSpec	20690	0,5
DsДНК	тимус теленка	Sigma-Aldrich	D4522	0,16
гемоцианин	лимфа улитки	Sigma-Aldrich	H7017	0,22
актин бета 2	человеческий	Cytoskeleton	APHL99	0,67
стрептавидин	<i>Streptomyces avidinii</i>	Roche Diagnostics	11721674001	1
желатин	бычий	Roche Diagnostics	11111965001	2%, блокирующий буфер
лизат <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i>	собственность фирмы-заявителя	-	разведение 1:600

Затем лунки блокировали 2% желатина в воде в течение 1 ч при комнатной температуре (КТ). Антитело DP47GS (1 мкг/мл в 3ФР) инкубировали с панелью иммобилизованных антигенов в течение 1,5 ч при КТ. Связанное антитело выявляли, используя антитело к человеческому IgG, конъюгированное с HRP (фирма GE Healthcare, каталожный № 9330V; разведенное в соотношении 1:1000 в 3ФР с 0,2% Твин-20 и 0,5% желатина). После инкубации в течение 1 ч планшеты отмывали 6 раз 3ФР/0,05% Твин-20 и осуществляли реакцию с использованием свежеприготовленного раствора субстрата BM blue POD (BM blue: 3,3'-5,5'-тетраметилбензидин, фирма Roche Diagnostics, каталожный номер 11484281001) в течение 30 мин при КТ. Абсорбцию измеряли при 370 нм. Контрольный уровень определяли без добавления антитела. В качестве положительного контроля служило являющееся собственностью фирмы-заявителя человеческое антитело типа IgG₁, которое обладает способностью к неспецифическому связыванию практически со всеми иммобилизованными антигенами.

Результаты этого эксперимента представлены на фиг. 39. Установлено, что антитело DP47GS не связывалось ни с одним из иммобилизованных антигенов. Выявленные сигналы находились в диапазоне, соответствующем контрольным образцам без антитела.

И, наконец, оценивали связывание антитела DP47GS с человеческими PBMC. Поскольку в процессе типичного иммунного ответа комбинация презентуемых на клеточной поверхности белков резко изменяется, связывание тестировали на PBMC непосредственно после их выделения из здоровых взрослых людей, а также после активации *in vitro* двумя различными стимулами.

Человеческие PBMC выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности фиколла из лейкоцитарных пленок или из гепаринизированной свежей крови здоровых добровольцев с помощью Histopaque 1077 (фирма Sigma-Aldrich, Германия). PBMC либо непосредственно использовали в анализах связывания (свежие PBMC), либо культивировали и дополнительно стимулировали. PBMC культивировали при клеточной плотности 2×10^6 клеток/мл в среде для Т-клеток, содержащей RPMI 1640 (фирма Gibco), дополненной 10 об.% инактивированной нагреванием FBS (фирма PAA Laboratories), 1 мМ пируватом натрия (фирма Sigma-Aldrich), 1 об.% L-аланил-L-глутамин (фирма Biochrom) и 10 нМ β-меркаптоэтанолом (фирма Sigma-Aldrich), при 37°C. Для стимуляции *in vitro* пролейкин (200 ед./мл, фирма Novartis) и фитогемагглютинин (ФГА-L; 2 мкг/мл, фирма Sigma-Aldrich) добавляли в течение 6 дней культивирования (активированные ФГА-L PBMC). Для повторной стимуляции *in vitro* 6-луночные планшеты для культуры ткани сенсibilizировали мышинным антителом к человеческому CD3 (клон KT3, 1 мкг/мл) и мышинным антителом к человеческому CD28 (клон 28.2, 2 мкг/мл, оба фирмы eBioscience) и добавляли активированные ФГА-L PBMC в течение еще 24 ч (повторно стимулированные PBMC). Осуществляли мониторинг связывания антитела DP47GS (с мутациями L234A L235A (LALA) P329G в Fc-домене или без них) с белками клеточной поверхности, применяя пятикратные серийные разведения (наиболее высокая концентрация 200 нМ), с использованием в качестве вторичного антитела козьего антитела к человеческому IgG, Fc-специфического, конъюгированного с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) (фирма Jackson Laboratories), и применяя проточную цитометрию. Все анализы осуществляли при 4°C для предупреждения интернализации поверхностных белков. Инкубацию с первичным и вторичным антителом осуществляли в течение 2 ч и 1 ч соответственно. Для достижения одновременно типирования лейкоцитов к вторичному антителу добавляли комбинации меченных флуорохромом мышинных антител к человеческому CD14, CD15, CD4, CD19 (все фирмы Biolegend), NKp46, CD3, CD56, CD8 (все от фирмы BD Pharmingen). Йодид пропидия (1 мкг/мл) добавляли непосредственно перед изме-

рением на устройстве FACSCantoII с использованием программы FACS Diva (оба от фирмы BD Bioscience) для исключения имеющих проницаемые мембраны погибших клеток. Не окрашенные (негативные) йодидом пропидия живые клетки соответствовали (дискриминационное окно) Т-клеткам (CD14⁺CD3⁺CD4⁺/CD8⁺), В-клеткам (CD14⁺CD19⁺), NK-клеткам (CD14⁺NKp46⁺/CD56⁺) или моноцитами/нейтрофилам (CD3⁺CD56⁺CD14⁺/CD15⁺). Медианную флуоресценцию ФИТЦ различных типов лейкоцитов определяли в качестве индикатора связанного первичного антитела и строили график зависимости от концентрации первичного антитела с использованием программы Prism4 (программа фирмы GraphPad).

Как продемонстрировано на фиг. 40, антитело DP47GS типа IgG без мутаций в Fc-домене обладало способностью связываться только с клетками, несущими Fcγ-рецептор, например NK-клетками и моноцитами/нейтрофилами. Отсутствие связывания DP47GS (LALA P329G) обнаружено при использовании человеческих РВМС вне зависимости от их статуса активации. Мутации LALA P329G в Fc-домене полностью элиминировали также и связывание с клетками, несущими Fcγ-рецептор.

Хотя выше изобретение описано достаточно подробно с помощью иллюстраций и примеров, приведенных для целей лучшего его понимания, описание и примеры не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения. Все процитированные в настоящем описании патентные и научные публикации полностью включены в него в качестве ссылки.

Перечень последовательностей

```
<110> Роше Гликарт АГ
<120> Новые иммуноконъюгаты
<130> 27444
<150> EP 11164237.7
<151> 2011-04-29
<160> 300
<170> PatentIn, версия 3.5
<210> 1
<211> 227
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1             5             10             15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20             25             30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35             40             45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50             55             60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65             70             75             80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85             90             95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100            105            110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115            120            125
```


034251

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
225

<210> 2
<211> 133
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> Человеческий IL-2 (C125A)

<400> 2

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

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

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 3
<211> 133
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Четырехмутантный человеческий IL-2 (IL-2 gm)

<400> 3

Ala Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys
35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80

034251

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 4
<211> 518
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Одноцепочечный IL-12 (p40-линкер-p35)

<400> 4

Ile Trp Glu Leu Lys Lys Asp Val Tyr Val Val Glu Leu Asp Trp Tyr
1 5 10 15

Pro Asp Ala Pro Gly Glu Met Val Val Leu Thr Cys Asp Thr Pro Glu
20 25 30

Glu Asp Gly Ile Thr Trp Thr Leu Asp Gln Ser Ser Glu Val Leu Gly
35 40 45

Ser Gly Lys Thr Leu Thr Ile Gln Val Lys Glu Phe Gly Asp Ala Gly
50 55 60

Gln Tyr Thr Cys His Lys Gly Gly Glu Val Leu Ser His Ser Leu Leu
65 70 75 80

Leu Leu His Lys Lys Glu Asp Gly Ile Trp Ser Thr Asp Ile Leu Lys
85 90 95

Asp Gln Lys Glu Pro Lys Asn Lys Thr Phe Leu Arg Cys Glu Ala Lys
100 105 110

Asn Tyr Ser Gly Arg Phe Thr Cys Trp Trp Leu Thr Thr Ile Ser Thr
115 120 125

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

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

Asp Asn Lys Glu Tyr Glu Tyr Ser Val Glu Cys Gln Glu Asp Ser Ala
165 170 175

Cys Pro Ala Ala Glu Glu Ser Leu Pro Ile Glu Val Met Val Asp Ala
180 185 190

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

Asp Ile Ile Lys Pro Asp Pro Pro Lys Asn Leu Gln Leu Lys Pro Leu
210 215 220

Lys Asn Ser Arg Gln Val Glu Val Ser Trp Glu Tyr Pro Asp Thr Trp
225 230 235 240

Ser Thr Pro His Ser Tyr Phe Ser Leu Thr Phe Cys Val Gln Val Gln
245 250 255

Gly Lys Ser Lys Arg Glu Lys Lys Asp Arg Val Phe Thr Asp Lys Thr
260 265 270

Ser Ala Thr Val Ile Cys Arg Lys Asn Ala Ser Ile Ser Val Arg Ala
275 280 285

Gln Asp Arg Tyr Tyr Ser Ser Ser Trp Ser Glu Trp Ala Ser Val Pro
290 295 300

Cys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

034251

```

305              310              315              320

Ser Arg Asn Leu Pro Val Ala Thr Pro Asp Pro Gly Met Phe Pro Cys
              325              330              335

Leu His His Ser Gln Asn Leu Leu Arg Ala Val Ser Asn Met Leu Gln
              340              345              350

Lys Ala Arg Gln Thr Leu Glu Phe Tyr Pro Cys Thr Ser Glu Glu Ile
              355              360              365

Asp His Glu Asp Ile Thr Lys Asp Lys Thr Ser Thr Val Glu Ala Cys
              370              375              380

Leu Pro Leu Glu Leu Thr Lys Asn Glu Ser Cys Leu Asn Ser Arg Glu
385              390              395              400

Thr Ser Phe Ile Thr Asn Gly Ser Cys Leu Ala Ser Arg Lys Thr Ser
              405              410              415

Phe Met Met Ala Leu Cys Leu Ser Ser Ile Tyr Glu Asp Leu Lys Met
              420              425              430

Tyr Gln Val Glu Phe Lys Thr Met Asn Ala Lys Leu Leu Met Asp Pro
              435              440              445

Lys Arg Gln Ile Phe Leu Asp Gln Asn Met Leu Ala Val Ile Asp Glu
              450              455              460

Leu Met Gln Ala Leu Asn Phe Asn Ser Glu Thr Val Pro Gln Lys Ser
465              470              475              480

Ser Leu Glu Glu Pro Asp Phe Tyr Lys Thr Lys Ile Lys Leu Cys Ile
              485              490              495

Leu Leu His Ala Phe Arg Ile Arg Ala Val Thr Ile Asp Arg Val Met
              500              505              510

Ser Tyr Leu Asn Ala Ser
              515

<210>  5
<211> 340
<212>  FRT
<213>  Искусственная последовательность

<220>
<223>  Однопочечный человеческий IL-10

<400>  5

Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro
1              5              10              15

Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg
              20              25              30

Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu
              35              40              45

Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala
              50              55              60

Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala
65              70              75              80

Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu
              85              90              95

Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu
              100             105             110

Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe
              115              120              125

Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp
              130              135              140

Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn
145              150              155              160

```

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 165 170 175
 Gly Gly Gly Ser Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys
 180 185 190
 Thr His Phe Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp
 195 200 205
 Ala Phe Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp
 210 215 220
 Asn Leu Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu
 225 230 235 240
 Gly Cys Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val
 245 250 255
 Met Pro Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn
 260 265 270
 Ser Leu Gly Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys
 275 280 285
 His Arg Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val
 290 295 300
 Lys Asn Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met
 305 310 315 320
 Ser Glu Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met
 325 330 335
 Lys Ile Arg Asn
 340
 <210> 6
 <211> 166
 <212> FRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Мономер человеческого IL-10 (IL-10M1)
 <400> 6
 Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro
 1 5 10 15
 Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg
 20 25 30
 Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu
 35 40 45
 Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala
 50 55 60
 Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala
 65 70 75 80
 Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu
 85 90 95
 Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu
 100 105 110
 Pro Cys Glu Asn Gly Gly Gly Ser Gly Gly Lys Ser Lys Ala Val Glu
 115 120 125
 Gln Val Lys Asn Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys
 130 135 140
 Ala Met Ser Glu Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met
 145 150 155 160
 Thr Met Lys Ile Arg Asn
 165
 <210> 7

<211> 114
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Мутантный человеческий IL-15 (E53A, N79A)

<400> 7

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
1 5 10 15

Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
20 25 30

Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
35 40 45

Val Ile Ser Leu Ala Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
50 55 60

Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Ala Val
65 70 75 80

Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
85 90 95

Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
100 105 110

Thr Ser

<210> 8
<211> 19
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> лидерная последовательность

<400> 8

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 9
<211> 57
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> лидерная последовательность

<400> 9
atggactgga cctggagaat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccaactcc 57

<210> 10
<211> 57
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> лидерная последовательность

<400> 10
atggactgga cctggaggat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccaactcc 57

<210> 11
<211> 22
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> лидерная последовательность

<400> 11

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys
20

<210> 12
<211> 66
<212> ДНК

```

<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> лидерная последовательность

<400> 12
atggacatga gggccccgc tcagctcctg ggcctcctgc tgcctcgggt cccaggtgcc      60

aggtgt                                          66

<210> 13
<211> 19
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> лидерная последовательность

<400> 13

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1          5          10          15

Val His Ser

<210> 14
<211> 57
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> лидерная последовательность

<400> 14
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccgggtg gcattcc      57

<210> 15
<211> 57
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> лидерная последовательность

<400> 15
atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggctaccg ccactggagt gcattcc      57
<210> 16
<211> 57
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> лидерная последовательность

<400> 16
atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtcgccacag ccaccggcgt gcactct      57

<210> 17
<211> 466
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Слитый белок человеческий IL-2R-бета-Fc(«впадина»)

<400> 17

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1          5          10          15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys Ala Val Asn Gly Thr Ser Gln Phe Thr Cys
20          25          30

Phe Tyr Asn Ser Arg Ala Asn Ile Ser Cys Val Trp Ser Gln Asp Gly
35          40          45

Ala Leu Gln Asp Thr Ser Cys Gln Val His Ala Trp Pro Asp Arg Arg
50          55          60

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

Ala Cys Asn Leu Ile Leu Gly Ala Pro Asp Ser Gln Lys Leu Thr Thr
85          90          95

Val Asp Ile Val Thr Leu Arg Val Leu Cys Arg Glu Gly Val Arg Trp
100         105         110

Arg Val Met Ala Ile Gln Asp Phe Lys Pro Phe Glu Asn Leu Arg Leu

```

034251

115	120	125	
Met Ala Pro Ile Ser Leu Gln Val Val His Val Glu Thr His Arg Cys			
130	135	140	
Asn Ile Ser Trp Glu Ile Ser Gln Ala Ser His Tyr Phe Glu Arg His			
145	150	155	160
Leu Glu Phe Glu Ala Arg Thr Leu Ser Pro Gly His Thr Trp Glu Glu			
165	170	175	
Ala Pro Leu Leu Thr Leu Lys Gln Lys Gln Glu Trp Ile Cys Leu Glu			
180	185	190	
Thr Leu Thr Pro Asp Thr Gln Tyr Glu Phe Gln Val Arg Val Lys Pro			
195	200	205	
Leu Gln Gly Glu Phe Thr Thr Trp Ser Pro Trp Ser Gln Pro Leu Ala			
210	215	220	
Phe Arg Thr Lys Pro Ala Ala Leu Gly Lys Asp Thr Gly Ala Gln Asp			
225	230	235	240
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly			
245	250	255	
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
260	265	270	
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
275	280	285	
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
290	295	300	
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg			
305	310	315	320
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
325	330	335	
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
340	345	350	
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys			
355	360	365	
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
370	375	380	
Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
385	390	395	400
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val			
405	410	415	
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp			
420	425	430	
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His			
435	440	445	
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro			
450	455	460	
Gly Lys			
465			
<210> 18			
<211> 1401			
<212> ДНК			
<213> Искусственная последовательность			
<220>			
<223> Слитый белок человеческий IL-2R-бета-Fc («впадина»)			
<400> 18			
atggacatga ggggtcccgcc tcagctcctg ggcctcctgc tgctctggtt cccaggtgcc			60
agggtgtcgg tgaatggcac ttcccagttc acatgcttct acaactcgag agccaacatc			120

```

tctctgtctt ggagccaaga tggggctctg caggacactt cctgccaagt ccatgcctgg      180
cgggacagac ggcggtggaa ccaaacctgt gagctgtccc cgtgagtca agcatcctgg      240
gcctgcaacc tgatctctcg agccccagat tctcagaaac tgaccacagt tgacatcgtc      300
accctgaggg tgctgtgccc tgagggggtg cgatggaggg tgatggccat ccaggacttc      360
aagccctttg agaaccttcg cctgatggcc cccatctccc tccaaagttgt ccaagtgagag      420
acccacagat gcaacataag ctgggaaatc tccaagcct cccactactt tgaagagacac      480
ctggagttcg agggccggac gctgtcccca ggccacacct gggaggaggg cccctgctg      540
actctcaagc agaagcagga atggatctgc ctggagacgc tcaccccaga caccagtat      600
gagtttcagg tgcgggtcaa gcctctgcaa ggcgagtcca cgacctggag cccctggagc      660
cagccctctg ccttcagaac aaagcctgca gcccttggga aggacacccg agctcaggac      720
aaaaactaca catgccacc gtgccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc      780
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc      840
gtgggtgttg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggtg cgtggacggc      900
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cactaccgt      960
gtggtcagcg tcttcacgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc     1020
aaggtctcca acaaaagcct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg     1080
cagcccccag aaccacaggt gtgcaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac     1140
caggtcagcc tctcgtgcgc agtcaaagge ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtg      1200
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac     1260
ggctccttct tctcgtgag caagctcacc gtggacaaga gcagggtggc gcagggggaa      1320
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc     1380
tcctgtcttc cgggtaaatg a                                         1401

```

```

<210> 19
<211> 492
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

```

```

<220>
<223> Слитый белок человеческий IL-2R-гамма-Fc(«выступ»)
<400> 19

```

```

Met Leu Lys Pro Ser Leu Pro Phe Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gln Leu
1           5           10          15

```

```

Pro Leu Leu Gly Val Gly Leu Asn Thr Thr Ile Leu Thr Pro Asn Gly
          20          25          30

```

```

Asn Glu Asp Thr Thr Ala Asp Phe Phe Leu Thr Thr Met Pro Thr Asp
35           40           45

```

```

Ser Leu Ser Val Ser Thr Leu Pro Leu Pro Glu Val Gln Cys Phe Val
50           55           60

```

```

Phe Asn Val Glu Tyr Met Asn Cys Thr Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro
65           70           75          80

```

```

Gln Pro Thr Asn Leu Thr Leu His Tyr Trp Tyr Lys Asn Ser Asp Asn
85           90          95

```

```

Asp Lys Val Gln Lys Cys Ser His Tyr Leu Phe Ser Glu Glu Ile Thr
100          105          110

```

```

Ser Gly Cys Gln Leu Gln Lys Lys Glu Ile His Leu Tyr Gln Thr Phe
115          120          125

```

```

Val Val Gln Leu Gln Asp Pro Arg Glu Pro Arg Arg Gln Ala Thr Gln
130          135          140

```

```

Met Leu Lys Leu Gln Asn Leu Val Ile Pro Trp Ala Pro Glu Asn Leu
145          150          155          160

```

```

Thr Leu His Lys Leu Ser Glu Ser Gln Leu Glu Leu Asn Trp Asn Asn
165          170          175

```

```

Arg Phe Leu Asn His Cys Leu Glu His Leu Val Gln Tyr Arg Thr Asp
180          185          190

```

```

Trp Asp His Ser Trp Thr Glu Gln Ser Val Asp Tyr Arg His Lys Phe

```


195 200 205
 Ser Leu Pro Ser Val Asp Gly Gln Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg
 210 215 220
 Ser Arg Phe Asn Pro Leu Cys Gly Ser Ala Gln His Trp Ser Glu Trp
 225 230 235 240
 Ser His Pro Ile His Trp Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Pro Phe
 245 250 255
 Leu Phe Ala Leu Glu Ala Gly Ala Gln Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 260 265 270
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 275 280 285
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 290 295 300
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 305 310 315 320
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 325 330 335
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 340 345 350
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 355 360 365
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 370 375 380
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg
 385 390 395 400
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly
 405 410 415
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 420 425 430
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 435 440 445
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 450 455 460
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 465 470 475 480
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

<210> 20

<211> 1479

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок человеческий IL-2R-гамма-FC(«выступ»)

<400> 20

atgttgaagc catcattacc attcacatcc ctcttattcc tgcagctgcc cctgctggga 60

gtggggctga acacgacaat tctgacgccc aatgggaatg aagacaccac agctgatttc 120

ttcctgacca ctatgcccac tgactccctc agtgtttcca ctctgcccct cccagagggt 180

cagtggtttg tgttcaatgt cgagtacatg aattgcactt ggaacagcag ctctgagccc 240

cagcctacca acctcactct gcattattgg tacaagaact cggataatga taaagtccag 300

aagtgcagcc actatctatt ctctgaagaa atcacttctg gctgtcagtt gcaaaaaaag 360

gagatccacc tctaccaaac atttggtgtt cagctccagg acccacggga acccaggaga 420

cagggcacac agatgctaaa actgcagaat ctggtgatcc cctgggctcc agagaacct 480

acacttcaca aactgagtga atcccagcta gaactgaact ggaacaacag attcttgaac 540

cactgtttgg agcacttggt gcagtaccgg actgactggg accacagctg gactgaacaa 600

tcagtggtatt atagacataa gttctccttg cctagtgtgg atgggcagaa acgctacacg 660

```

tttcgtgttc ggagccgctt taaccactc tgtggaagtg ctcagcatig gagtgaatgg      720
agccacccaa tccactgggg gagcaatact tcaaaagaga atcctttcct gtttgcattg      780
gaagccggag ctcaggacaa aactcacaca tgcccccggt gccccagacc tgaactcctg      840
gggggaccgt cagtcttctt ctcccccca aaacccaagg acacctcat gatctccggg      900
accctgaggg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc      960
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag     1020
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcacgctcc tgaccagga ctggtgaat     1080
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccac cgagaaaacc     1140
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatgccgg     1200
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg tgggtcctgg tcaaaggcct ctatcccagc     1260
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct     1320
cccgctctgg actccgacgg ctctctcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc     1380
aggtggcagc aggggaacgt ctctcatgc tccgtgatgc atgaggtctt gcacaaccac     1440
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatga                             1479

```

```

<210> 21
<211> 219
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

```

```

<220>
<223> Альфа-субъединица человеческого IL-2R + Avi-метка + His-метка

```

```

<400> 21

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1          5          10          15

```

```

Val His Ser Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro His Ala
20          25          30

```

```

Thr Phe Lys Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu
35          40          45
Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Leu Tyr Met Leu
50          55          60

```

```

Cys Thr Gly Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys
65          70          75          80

```

```

Thr Ser Ser Ala Thr Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro
85          90          95

```

```

Glu Glu Gln Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Pro Met Gln
100         105         110

```

```

Pro Val Asp Gln Ala Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro Pro Pro
115         120         125

```

```

Trp Glu Asn Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val Gly Gln
130         135         140

```

```

Met Val Tyr Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly
145         150         155         160

```

```

Pro Ala Glu Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg Trp Thr
165         170         175

```

```

Gln Pro Gln Leu Ile Cys Thr Gly Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln
180         185         190

```

```

Gly Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
195         200         205

```

```

His Glu Ala Arg Ala His His His His His His
210         215

```

```

<210> 22
<211> 660
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Альфа-субъединица человеческого IL-2R + Avi-метка + His-метка

```

<400> 22
 atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gttagcaacag ctacoggtgt gcattccgag 60
 ctctgtgacg atgacccgcc agagatccca cagccacat tcaaagccat ggcttacaag 120
 gaaggaacca tgttgaactg tgaatgcaag agaggtttcc gcagaataaa aagcgggtca 180
 ctctatatgc tctgtacagg aaactctagc cactcgctct gggacaacca atgtcaatgc 240
 acaagctctg ccaactcgaa cacaacgaaa caagtgcacac ctcaacctga agaacagaaa 300
 gaaaggaaaa ccacagaaat gcaaaagtcca atgcaagccag tggaccaagc gagccttcca 360
 ggctactgca gggaacctcc accatgggaa aatgaagcca cagagagaat ttatcatttc 420
 gtggtggggc agatgggtta ttatcagtgc gtccagggat acagggctct acacagaggt 480
 cctgctgaga gcgtctgcaa aatgacctac gggaagacaa ggtggaccca gccccagctc 540
 atatgcacag gtgtcgacga acagttatat ttccagggcg gctcaggcct gaacgacatc 600
 ttcgaggccc agaagatcga gtggcacgag gctcgagctc accaccatca ccatcactga 660

<210> 23
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 2B10; VL

<400> 23

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45

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

Gly Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Pro Ala
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 24
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 2B10; VL

<400> 24
 gatatccaga tgaccagtc tccatccctc ctgtctgcat ctgtoggaga cggggtcacc 60
 atcacctgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggtagca gcagaagcca 120
 gggaaagccc ctaagcgctt gatctatgct gcatccagtt tgcagagtgg cgtcccatca 180
 aggttcagcg gcggtggatc cgggacagag ttcactctca ccatcagcag cttgcagcct 240
 gaagattttg ccacctatta ctgcttgagc aatggtctgc agcccgcyac gtttggcag 300
 ggcaccaaaag tcgagatcaa g 321

<210> 25
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 2B10(GS); VL

<400> 25

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile

35	40	45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Pro Ala		
85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100	105	
<210> 26		
<211> 321		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> 2B10(GS); VL		
<400> 26		
gataaccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga ccgggtcacc	60	
atcacctgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggtacca gcagaagcca	120	
gggaaagccc ctaagcgct gatctatgct gcatccagtt tgcagagtgg cgtcccatca	180	
aggttcagcg gcagtggate cgggacagag ttcactctca ccatcagcag cttgcagcct	240	
gaagattttg ccacctatta ctgcttgtag aatggctctgc agcccgcgac gtttgccag	300	
ggcaccacaag tcgagatcaa g	321	
<210> 27		
<211> 121		
<212> PRT		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> 2B10; VH		
<400> 27		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
1 5 10 15		
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr		
20 25 30		
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
35 40 45		
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe		
50 55 60		
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
65 70 75 80		
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85 90 95		
Ala Arg Leu Tyr Gly Tyr Ala Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly		
100 105 110		
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
115 120		
<210> 28		
<211> 363		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> 2B10; VH		
<400> 28		
caggtgcaat tgggtcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc	60	
tccctgcaag cctctggagg catattcagc agctatgcct taagctgggt gcgacaggcc	120	
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatccccta tctttggtac agcaaaactac	180	
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac	240	
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagactgtac	300	
ggttacgctt actacggtgc ttttgactac tggggccaag ggaccaccgt gaccgtctcc	360	

tca 363

<210> 29
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 2F11; VL

<400> 29

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Tyr Thr Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 30
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 2F11; VL

<400> 30

gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtc gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcgtccca 180

gacaggttca gtggcagtg atccgggaca gacttcaact tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgt ttactgtcag cagggtcagt atactcccc cacgttcggc 300

caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 31
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 2F11(VI); VL

<400> 31

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Tyr Thr Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 32
 <211> 324
 <212> ДНК

```

<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2F11(VI); VL

<400> 32
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
cccccttgcg gggccagtcg gaggcttgcg agcagctacg tagccttggt ccagcagaaa      120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca      180
gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagggtcagt atactccccc cacttcgggc      300
cagggggacca aagtggaaat caaa                                           324

<210> 33
<211> 117
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2F11; VH

<400> 33

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20          25          30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Lys Trp Arg Trp Met Met Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100         105         110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 34
<211> 351
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2F11; VH

<400> 34
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgccg tgagctgggt ccgccaggct      120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac atggccgtat attactgtgc gaaatggaga      300
tggatgatgt ttgactactg gggccaagga accctgggtc cagtctcgag t                                           351

<210> 35
<211> 117
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2F11(MT); VH

<400> 35

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20          25          30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

```

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Lys Trp Arg Trp Met Met Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 36
 <211> 351
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 2F11 (MT); VH

<400> 36
 gaggtgcaat tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgaagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcc aagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggcaggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac accgccgtat attactgtgc gaaatggaga 300
 tggatgatgt ttgactactg gggccaagga accctgggtc ccgtctcgag t 351

<210> 37
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 3F2; VL

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 38
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 3F2; VL

<400> 38
 gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt atccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtc aagtggtacc agtagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatcaat gtgggtcccc gtagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgt ttactgtcag cagggtatta tgcttcccc gacgttcggc 300
 caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 39

```

<211> 108
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 3F2(YS); VL

<400> 39

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
20          25          30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35          40          45

Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50          55          60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65          70          75          80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
85          90          95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100          105

<210> 40
<211> 324
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 3F2(YS); VL

<400> 40
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcttgca gggccagtc gagtggtacc agtagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccaagg ctcccaggct cctcatcaat gtgggctccc gtagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag caggggtatta tgcttcoccc gacgttcggc 300
caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 41
<211> 117
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 3F2; VH

<400> 41

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20          25          30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100          105          110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 42
<211> 351
<212> ДНК

```



```

<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 3F2; VH

<400> 42
gaggtgcaat tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgccg tgagctgggt ccgccaggct      120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtg      300
tttggtgggtt ttaactactg gggccaagga accctgggtca cgtctcag t              351

<210> 43
<211> 108
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 3D9, VL

<400> 43

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
                20              25              30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
        35              40              45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
        50              55              60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65              70              75              80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Leu Ile Pro
        85              90              95
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
        100             105

<210> 44
<211> 324
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 3D9, VL

<400> 44
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccaggggg aagagccacc      60
ctctctttgca gggccaagtc gagtgtttag agcagctact tagcctggta ccagcagaaa      120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcaggggcac tggcatccca      180
gacaggttca gtggcagtg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgcagtgt ttactgtcag cagggtcagc ttattccccc tacgttcggc      300
cagggggacca aagtggaaat caaa              324

<210> 45
<211> 117
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 3D9, VH

<400> 45

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1              5              10              15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
        20              25              30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35              40              45

Ser Ala Ile Gly Val Ser Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
        50              55              60

```

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 46
 <211> 351
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 3D9, VH

<400> 46
 gaggtgcaat tgttgagtc tgggggagc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcta tgagctgggt ccgccagact 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attggtgta gtactggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggttgg 300
 ctgggtcctt ttgactactg gggccaagga accctgggtca cgtctcagag t 351

<210> 47
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 3D9(TA); VH

<400> 47

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Gly Val Ser Thr Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 48
 <211> 351
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 3D9(TA); VH

<400> 48
 gaggtgcaat tgttgagtc tgggggagc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcta tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attggtgta gtactggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggttgg 300
 ctgggtcctt ttgactactg gggccaagga accctgggtca cgtctcagag t 351

<210> 49

```

<211> 108
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 4G8; VL

<400> 49

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Ile Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 50
<211> 324
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 4G8; VL

<400> 50
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcaacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcttgca gggccagtc gagtgtagc cgcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
ctgggccagg ctcccaggt cctcctcatt ggggcctcca ccaggggcac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtg atccgggacg gacttcaact tcacatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgt ttactgtcag cagggtcagg ttattccccc tacgttcggc 300
cagggggacca aagtggaaat caaaa 324

<210> 51
<211> 117
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 4G8; VH

<400> 51

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 52
<211> 351
<212> ДНК

```

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 4G8; VH

<400> 52

gaggtgcaat tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccggatt caccctttagc agttatgcc ttagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggcctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaaggcccg gttcaccatc tcagagaca attccaagaa cagctgttat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtg 300

ctgggtaatt ttgactactg gggccaagga accctggta cgtctcag t 351

<210> 53

<211> 108

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 4B3; VL

<400> 53

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Tyr Ile Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro

85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 54

<211> 324

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 4B3; VL

<400> 54

gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccaac 60

ctctcttgca gggccagtca gagtggttagc agcaattact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggcgcctaca tcagggccac tggcatccca 180

gacagggtta gtggcagtg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgt ttaactgtcag cagggtcagg ttattccccc tacgttcggc 300

cagggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 55

<211> 117

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 4B3; VH

<400> 55

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

034251

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 56
<211> 351
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 4B3; VH

<400> 56
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcc a tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgttat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtg 300
ctgggtaatt ttgactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgag t 351

<210> 57
<211> 108
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 4D6; VL

<400> 57

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Gln Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 58
<211> 324
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 4D6; VL

<400> 58
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcaactact tagcctggt a ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatccag ggcgcctcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgt a ttactgtcag cagggtcagg ttattccccc taegtctggc 300
caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 59
<211> 117
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 4D6; VH

 <400> 59

 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

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

 Val Thr Val Ser Ser
 115

 <210> 60
 <211> 351
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> 4D6; VH

 <400> 60
 gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtgggtgtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagcgtgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtg 300
 ctgggtaatt ttgactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgag t 351

 <210> 61
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> 2C6; VL

 <400> 61

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

 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Gln Ile Pro
 85 90 95

 Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

 <210> 62
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> 2C6; VL

034251

<400> 62
 gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtc gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag caggctggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagggtcagc agattccccc tacgttcggc 300
 cagggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 63
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 2C6; VH

<400> 63

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Ala Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 64
 <211> 351
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 2C6; VH

<400> 64
 gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatc caccttttagc agttatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggetggagtg ggtctcagct attagtggga gtgctggtta tacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggttgg 300
 ttggggaatt ttgactactg gggccaagga accctgtgtca cgtctctag t 351

<210> 65
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 5H5; VL

<400> 65

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

034251

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Gln Ile Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 66
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 5H5; VL

<400> 66
 gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggaacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccaagta gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccaagg ctcccaaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtggt atccgggaca gacttcaact tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagggttaato agattcccc tacgttcggt 300
 caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 67
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 5H5; VH

<400> 67

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Thr Met Ser Trp Val Arg Arg Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

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

Lys Gly Trp Phe Thr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 68
 <211> 348
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 5H5; VH

<400> 68
 gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt caccctttagc agttatacca tgagctgggt ccgcccgtct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtgggt gtggtaggac atactacgca 180
 gactccgtga agggccgggt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 240
 cagatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gccgtatatt actgtgcgaa aggttggttt 300
 acgccttttg actactgggg ccaaggaacc ctggtcaccg tctcgagt 348

<210> 69
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

034251

```

<220>
<223> 2C4; VL

<400> 69

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
          20          25          30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
          35          40          45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ile Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
          50          55          60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65          70          75          80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Gln Ile Pro
          85          90          95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105

<210> 70
<211> 324
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2C4; VL

<400> 70
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agtaactact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcctcca ttagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagggttaac agattccccc tacgttcggt 300
caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 71
<211> 117
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2C4; VH

<400> 71

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Lys Gly Trp Phe Thr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
          100          105          110

Val Thr Val Ser Ser
          115

<210> 72
<211> 351
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2C4; VH

```

034251

```

<400> 72
gaggtgcaat tgttgagtc tgggggaggc ttgtacagc ctggggggtc cctgagactc      60

tctgtgacg cctccggatt cacttttagc agttatgcc tgagctgggt ccgccaggct      120

ccagggaagg ggcctggagt ggtctcagct attagcggta gtggtggtag cacatactac      180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cgcgtgtat      240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggttgg      300

tttacgcctt ttgactactg gggccaagga accttggtca ccgtctcgag t              351

<210> 73
<211> 108
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2D9; VL

<400> 73

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
          20          25          30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
          35          40          45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
          50          55          60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65          70          75          80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Gln Ile Pro
          85          90          95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105
<210> 74
<211> 324
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2D9; VL

<400> 74
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60

ctctcttgca gggccagtcg gagtggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa      120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca      180

gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag      240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagggtaatc agattcccc tacgttcggt      300

caggggacca aagtggaaat caaa              324

<210> 75
<211> 117
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2D9; VH

<400> 75

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

```

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

Ala Lys Gly Trp Phe Thr Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 76
<211> 351
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2D9; VH

<400> 76
gaggtgcaat tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggtggagtg ggtctcagct attagcggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgttat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagggttg 300
tttacgcctt ttgactactg gggccaagga accctgggtca cgtctcag t 351

<210> 77
<211> 108
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 4B8; VL

<400> 77

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 78
<211> 324
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 4B8; VL

<400> 78
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcttgca gggccagtcg gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcacto tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagggtcagg ttattccccc tacgttcggc 300
cagggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 79
<211> 117
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 4B8; VH

<400> 79

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 80
<211> 351
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 4B8; VH

<400> 80
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagggtag 300
ctgggtaatt ttgactactg gggccaagga accctgggta ccgtctcgag t 351

<210> 81
<211> 108
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 7A1; VL

<400> 81

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Gln Ile Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 82
<211> 324
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 7A1; VL

<400> 82
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagggtcagc agattccccc tacgttcggc 300
 cagggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 83
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 7A1; VH

<400> 83

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

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

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 84
 <211> 351
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 7A1; VH

<400> 84

gaggtgcaat tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtgtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tcagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagggttg 300
 ttgggaatt ttgactactg gggccaagga accctggta ccgctctcag t 351

<210> 85
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 13C2; VL

<400> 85

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Leu Ile Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 86
<211> 324
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 13C2; VL

<400> 86
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcttgca gggccagtc gagtgtagc agcagctact tagcctgta ccagcagaaa 120
cttgccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgt ttactgtcag cagggtcagc ttattccccc tacgttcggc 300
caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 87
<211> 117
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 13C2; VH

<400> 87

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 88
<211> 351
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 13C2; VH

<400> 88
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagaactc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccctttagc agttatgcc aagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtgggtgtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggttgg 300
ctgggtcctt ttgactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcag t 351

<210> 89
<211> 108
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 13E8; VL

<400> 89

034251

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Leu Asn Ile Pro
85 90 95

Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 90
<211> 324
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 13E8; VL

<400> 90
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctocagggga aagagccacc 60
ctctcttgca gggccagtc gagtgtagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacagggtca gtggcagtggt atccgggaca gacttcaact tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtta ttactgtcag caggggtctga atattccctc gacgttcggc 300
cagggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 91
<211> 117
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 13E8; VH

<400> 91

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 92
<211> 351
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 13E8; VH

<400> 92
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60

```

tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtgggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggttgg      300
ttgggtccgt ttgactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgag t              351

```

<210> 93
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 14C10; VL

<400> 93

```

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

```

```

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
                20              25              30

```

```

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35              40              45

```

```

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50              55              60

```

```

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65              70              75              80

```

```

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly His Ile Ile Pro
85              90              95

```

```

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100              105

```

<210> 94
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 14C10; VL

```

<400> 94
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctctttgca gggccagtcg gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa      120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcaggggcac tggcatccca      180
gacaggttca gtggcagtggt atccgggaca gacttcacto tcaccatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagggtcata ttattccccc gacgttcggc      300
caggggacca aagtggaaat caaa                                              324

```

<210> 95
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 14C10; VH

<400> 95

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5              10              15

```

```

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20              25              30

```

```

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35              40              45

```

```

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50              55              60

```

```

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

```

```

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

```


Ala Lys Ala Trp Met Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 96
<211> 351
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 14C10; VH

<400> 96
gagggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccctttagc agttatgccg tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggcctggagt ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagcttgg 300
atggggccctt ttgactactg gggccaagga accctggta ccgtctcag t 351

<210> 97
<211> 108
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 17A11; VL

<400> 97

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Leu Asn Ile Pro
85 90 95

Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 98
<211> 324
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 17A11; VL

<400> 98
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca 180
gacagggtca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagggtctga atattccctc gacgttcggc 300
cagggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 99
<211> 117
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 17A11; VH

<400> 99

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

```

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
      20              25              30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35              40              45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
      50              55              60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
      65              70              75              80

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

Ala Lys Gly Trp Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
      100             105             110

Val Thr Val Ser Ser
      115

<210> 100
<211> 351
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 17A11; VH

<400> 100
gaggtgcaat tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgccca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggtta gtggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagcgtgtat      240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggttgg      300
ttgggtccgt ttgactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcag t      351

<210> 101
<211> 108
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 19G1; VL

<400> 101

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
      20              25              30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
      35              40              45

Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
      50              55              60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
      65              70              75              80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
      85              90              95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100             105

<210> 102
<211> 324
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 19G1; VL

<400> 102
gaaatcggtg taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcttgca gggccagtc gagtggtacc agtagctact tagcctggta ccagcagaaa      120
cctggccagg ctccaggct cctcatcaat gtgggtcccc gtagggccac tggcatccca      180

```

gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcacatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag caggggtatta tgcttcccc gacgttcggc 300
 caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 103
 <211> 117
 <212> FRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 19G1; VH

<400> 103

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ile Ser Ser Gly Gly Leu Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 104
 <211> 351
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 19G1; VH

<400> 104

gaggtgcaat tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacccttagc agttatgcga tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagcg attattagta gtggtggtct cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtg 300
 ttggtggtt ttaactactg gggccaagga accctggtca ccgtctcgtc c 351

<210> 105
 <211> 108
 <212> FRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 20G8; VL

<400> 105

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 106
<211> 324
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 20G8; VL

<400> 106
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtcttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcttgca gggccagtca gagtgttacc agtagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatcaat gtgggctccc gtagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgtcag cagggtatta tgettcccc gacgttcggc 300
cagggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 107
<211> 117
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 20G8; VH

<400> 107

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 108
<211> 351
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 20G8; VH

<400> 108
gaggtgcaat tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcaa tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attattggga gtggtagtcg tacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagggtgg 300
tttggtgggtt ttaactactg gggccaagga accctggtca ccgtctcgtc c 351

<210> 109
<211> 108
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 4B9; VL

<400> 109

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 110
<211> 324
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 4B9; VL

<400> 110
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccaggggga aagagccacc 60
ctctcttgca gggccagtc gagtgtaacc agtagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatcaat gtgggctccc gtagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtggt atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag caggggtatta tgcttcccc gacgttcggc 300
caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 111
<211> 117
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> 4B9; VH

<400> 111

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 112
<211> 351
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 4B9; VH

<400> 112
gagggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgcta tgagctgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attattggta gtgtgtctag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtg 300
tttgggtggt ttaactactg gggccaagga accctggta ccgctcgtc c 351

<210> 113
<211> 108
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 5B8; VL

<400> 113

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 114
<211> 324
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 5B8; VL

<400> 114
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcttgca gggccagta gagtggtacc agtagctact tagcctggtt ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatcaat gtgggcctccc gtagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgt ttaactgtcag cagggtatta tgcttcccc gacgttcggc 300
caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 115
<211> 117
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 5B8; VH

<400> 115

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Trp Gly Gly Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 116
<211> 351
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 5B8; VH

<400> 116
gaggtgcaat tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacttttagc agttatgcta tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct atttggggtg gtggtcgtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgttat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtg 300
tttggtggtt ttaactactg gggccaagga accctgtgca cgcctcgtc c 351

<210> 117
<211> 108
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 5F1; VL

<400> 117

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

<210> 118
<211> 324
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 5F1; VL

<400> 118
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcttgca gggccagtca gagtgttacc agtagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatcaat gtgggctccc gtagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagggtatta tgcttcccc gacgttcggc 300
caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 119
<211> 117
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 5F1; VH

<400> 119

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ile Ser Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 120
<211> 351
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 5F1; VH

<400> 120
gaggtgcaat tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tctgtgcag cctccgatt cacctttagc agttatgcta tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attattagta gtggggctag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gtccaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagggtag 300
ttgggtggtt ttaactactg gggccaagga accctggtca ccgtctcgtc c 351

<210> 121
<211> 108
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> 14B3; VL

<400> 121

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 122
<211> 324
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 14B3; VL

<400> 122
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcttgca gggccagtca gagtgttacc agtagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatcaat gtgggctccc gtagggccac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgtcag cagggtatta tgcttcccc gacgttcggc 300

caggggacca aagtggaat caaa 324

<210> 123
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 14B3; VH

<400> 123

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Leu Ala Ser Gly Ala Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 124
 <211> 351
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 14B3; VH
 <400> 124

gaggtgcaat tgttgagtc tgggggagc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctccgatt cacttttagc agttatgcta tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggcctggagt ggtctcagct attttggcta gtggtcgcgt cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat 240

ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagggtgg 300

tttggtggtt ttaactactg gggccaagga accctgggtc ccgctctgtc c 351

<210> 125
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 16F1; VL

<400> 125

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 126
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> 16F1; VL

 <400> 126
 gaaatcgtgt taaccgagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtc gagtggtacc agtagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatcaat gtgggctccc gtagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgt ttactgtcag caggggtatta tgcttcccc gacgttcggc 300
 caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 127
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> 16F1; VH

 <400> 127

 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 Ser Gly Ile Ile Gly Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

 Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 128
 <211> 351
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> 16F1; VH

 <400> 128
 gaggtgcaat tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcr tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaaag ggctggagtg ggtctcaggt attattgta gtggtggtat cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactg-cgc gaaaggggtg 300
 ttgtgtggtt ttaactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgtc c 351

<210> 129
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> 16F8; VL

 <400> 129

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

 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
 20 25 30

```

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
  35              40              45

Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
  50              55              60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
  65              70              75              80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
      85              90              95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100             105

<210> 130
<211> 324
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 16F8; VL

<400> 130
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcttgca gggccagtcg agtggttacc agtagctact tagcctggta ccagcagaaa      120
cctggccagg ctcccaggct cctcatcaat gtgggctccc gtagggccac tggcatccca      180
gacaggttca gtggcagtggt atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagggtatta tgcttcccc gacgttcggc      300
caggggacca aagtggaaat caaa                                     324

<210> 131
<211> 117
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 16F8; VH

<400> 131
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1              5              10              15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
      20              25              30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35              40              45

Ser Ala Ile Leu Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
      50              55              60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
      65              70              75              80

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
      100             105             110

Val Thr Val Ser Ser
      115

<210> 132
<211> 351
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 16F8; VH

<400> 132
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctccgatt cacccttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attcttggtg gtggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat      240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagggtgg      300

```

tttgggtgggtt ttaactactg gggccaagga accctgggtca ccgtctcgtc c 351

<210> 133
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> O3C9; VL

<400> 133

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 134
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> O3C9; VL

<400> 134

gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtc gagtgttacc agtagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cttggccagg ctcccaggct cctcatcaat gtgggcctccc gtagggccac tggcacccca 180

gacaggttca gtggcagtg atccgggaca gacttcacto tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgt ttactgtcag cagggtatta tgcttcccc gacgttcggc 300

cagggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 135
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> O3C9; VH

<400> 135

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 136
 <211> 351
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> O3C9; VH

 <400> 136
 gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttttgcc tgagctgggt ccgtcagttc 120
 ccagggaagg ggtcggagtg ggtctcagct attattggta gtggtagtaa cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgttat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtg 300
 ttgtgtggtt ttaactactg gggccaagga accctggta ccgtctcgtc c 351

<210> 137
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> O2D7; VL

 <400> 137

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

 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
 20 25 30

 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

 Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Thr Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80
 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Ile Met Leu Pro
 85 90 95

 Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 138
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> O2D7; VL

 <400> 138
 gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtc gagtgttacc agtagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatcaat gtgggctccc gtagggccac tggcaccoca 180
 gacaggttca gtggcagtg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgtcag caggetatta tgcttctccc gacgttcggc 300
 caggggacca aagtggaaat caaa 324

<210> 139
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> O2D7; VH

 <400> 139

 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 140
 <211> 351
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> O2D7; VH

<400> 140
 gaggtgcaat tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgcc aagactgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggcaggagt ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaaggcccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat 240
 ctgcagatga acagccctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtg 300
 ttgggtggtt ttaactactg gggccaagga accctggta cegtcctgc c 351

<210> 141
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 28H1; VL

<400> 141
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Ile Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro
 85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 142
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 28H1; VL

<400> 142
 gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccaggga aagagccacc 60
 ctctcttgca gggccagtc aagtggttagc cgcagctact tagcctggt aagcagagaa 120
 cctggccagg ctccaggct cctcatcatt ggggectcca ccagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtga ttactgtcag cagggtcagg ttattcccc tacgttcggc 300
 caggggacca aagtggaat caaa 324

<210> 143

```

<211> 116
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 28H1; VH

<400> 143

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
20          25          30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

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

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65          70          75          80

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

Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100         105         110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 144
<211> 348
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 28H1; VH

<400> 144
gaggtgcaat tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctccggatt cacccttagc agtcatgcta tgagctgggt ccgccaggct      120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct atttgggcta gtggggagca atactacgca      180

gactccgtga agggccggtt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg      240

cagatgaaca gcctgagagc caggacacg gccgtatatt actgtgcgaa aggggtggctg      300

ggtaatattg actactgggg ccaaggaacc ctggtcaccg tctcgaqt      348

<210> 145
<211> 108
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 22A3; VL

<400> 145

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
20          25          30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35          40          45

Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50          55          60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65          70          75          80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
85          90          95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100         105

<210> 146
<211> 324
<212> ДНК

```

```

<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 22A3; VL

<400> 146
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctctttgca gggccagtcg gagtggtacc agtagtact tagcctggta ccagcagaaa      120
cctggccagg ctcccaggct cctcatcaat gtgggctccc gtagggccac tggcatccca      180
gacaggttca gtggcagtg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag caggggatta tgcttcccc gacgttcggc      300
cagggggacca aagtggaaat caaa                                           324

<210> 147
<211> 117
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 22A3; VH

<400> 147

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20          25          30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ser Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100         105         110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 148
<211> 351
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 22A3; VH

<400> 148
gagggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctccgatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attattggtg gtgtagtat cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgtgtat      240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagggtag      300
tttggtgggt ttaactactg gggccaagga accctgggtc ccgtctcgag t              351

<210> 149
<211> 108
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 29B11; VL

<400> 149

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
20          25          30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35          40          45

```



```

Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50                      55                      60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65                      70                      75                      80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
                      85                      90                      95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100                      105

<210> 150
<211> 324
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 29B11; VL

<400> 150
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcaacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcttgca gggccagtcg gagtgttacc agtagctact tagcctggta ccagcagaaa      120
cctggccaagg ctcccaggct cctcatcaat gtgggctccc gtagggccac tggcatccca      180
gacaggttca gtggcagtg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag caggggtatta tgcttcccc gacgttcggc      300
caggggacca aagtggaaat caaa                                     324

<210> 151
<211> 117
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 29B11; VH

<400> 151

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45

Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
          100          105          110

Val Thr Val Ser Ser
          115

<210> 152
<211> 351
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 29B11; VH

<400> 152
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgcta tgagctgggt ccgccaggct      120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attattggtg gtggtggtat cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagggtgg      300
tttggtggtt ttaactactg gggccaagga accctggtca ccgtctcgag t          351

<210> 153

```

```

<211> 108
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 23C10; VL

<400> 153

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser
          20          25          30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
          35          40          45

Ile Ile Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
          50          55          60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65          70          75          80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro
          85          90          95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105

<210> 154
<211> 324
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 23C10; VL

<400> 154
gaaatcgtgt taaagcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcttgca gggccagtca gagtgttagc cgcagctact tagcctggta ccagcagaaa      120
cctggccagg ctcccaggct cctcatcatt ggggcctcca ccagggccac tggcatccca      180
gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagggtcagg ttattccccc tacgttcggc      300
caggggacca aagtggaaat caaa                                     324

<210> 155
<211> 117
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 23C10; VH

<400> 155

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ser
          20          25          30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45

Ser Ala Ile Ser Thr Asn Gly Asn Tyr Thr Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

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

Val Thr Val Ser Ser
          115

<210> 156
<211> 351
<212> ДНК

```

```

<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 23C10; VH

<400> 156
gaggtgcaat tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagagctc      60
tcctgtgcag cctccggatt caccctllagc agttctgcca tgagctgggt ccgcccaggtc      120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtacta atggtaatta tacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagggtag      300
ctgggtaatt ttgactactg gggccaagga accctgggtca cgtctcagc t      351

<210> 157
<211> 107
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2B10_C3B6; VL

<400> 157

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1             5             10             15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
                20             25             30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35             40             45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65             70             75             80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Pro Ala
85             90             95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100            105

<210> 158
<211> 321
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2B10_C3B6; VL

<400> 158
gatatccaga tgaccacagtc tccatccctcc ctgtctgcat ctgtcgagaga ccgggtcacc      60
atcacctgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggtaacca gcagaagcca      120
gggaaagccc ctaagcgccct gatctatgct gcatccagtt tgcagagtgg cgtcccatca      180
aggttcagcg gcagtggatc cgggacagag ttcactctca ccatcagcag cttgcagcct      240
gaagattttg ccacctatta ctgcttgtag aatggctctgc agcccgcgac gtttggccag      300
ggcaccaaag tcgagatcaa g      321

<210> 159
<211> 121
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2B10_C3B6; VH

<400> 159

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20             25             30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35             40             45

Gly Ala Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50             55             60

```

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Tyr Gly Tyr Ala Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 160
<211> 363
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2B10_C3B6; VH

<400> 160
caggtgcaat tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcttgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggagct atcatcccga tccttggtat cgcaaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagactgtac 300
ggttacgctt actacggtgc ttttgactac tggggccaag ggaccaccgt gaccgtctcc 360
tca 363

<210> 161
<211> 107
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2B10_6A12; VL

<400> 161

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Pro Ala
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 162
<211> 321
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2B10_6A12; VL

<400> 162
gatatccaga tgaaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga ccgggtcacc 60
atcacctgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggtacca gcagaagcca 120
gggaaagccc ctaagcgccct gatctatgct gcattccagtt tgcagagtgg cgtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc cgggacagag ttcactctca ccatcagcag cttgcagcct 240
gaagattttg ccaacctatta ctgcttgagc aatggtctgc agcccgcgac gtttgccag 300
ggcaccaaaag tcgagatcaa g 321

<210> 163
<211> 121
<212> PRT

```

<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2B10_6A12; VH

<400> 163

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
          20           25           30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
          35           40           45

Gly Val Ile Ile Pro Ile Leu Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
          50           55           60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85           90           95

Ala Arg Leu Tyr Gly Tyr Ala Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
          100          105          110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115          120

<210> 164
<211> 363
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2B10_6A12; VH

<400> 164
caggtgcaat tgggtcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc      60
tcttgcaagg cctccggagg cacattcagc agctatgcta taagctgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggcctcgagt gatgggagtg atcatcccta tccttggtac cgcaaaactac      180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac      240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagactgtac      300
ggttacgctt actacgggtc ttttgactac tggggccaag ggaccaccgt gacctctcc      360
tca                                             363

<210> 165
<211> 107
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2B10_C3A6; VL

<400> 165

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Val
          20           25           30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
          35           40           45

Tyr Asp Ser Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

Gly Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Pro Ala
          85           90           95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105

<210> 166
<211> 321
<212> ДНК

```

```

<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2B10_C3A6; VL

<400> 166
gacatccaga tgacccagtc tccttcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga ccgggtcacc      60
atcacctgcc gggcaagtca gggcattcgt aatgttttag gctgggtacca gcagaagcca      120
gggaaagccc ctaagcgccct gatctatgat tcgtccagtt tgcagagtgg cgtcccatca      180
aggttcagcg gcggtggatc cgggacagag ttcaactctca ccatcagcag cttgcagcct      240
gaagattttg ccacctatta ctgcttgtag aatggtctgc agcccgcgac gtttggccag      300
ggcaccaaag tcgagatcaa g                                          321

<210> 167
<211> 121
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2B10_C3A6; VH

<400> 167

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20          25          30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35          40          45

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95
Ala Arg Leu Tyr Gly Tyr Ala Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
100         105         110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115         120

<210> 168
<211> 363
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2B10_C3A6; VH

<400> 168
caggtgcaat tggtcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc      60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtag agcaaaactac      180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatcoacgag cacagcctac      240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagactgtac      300
ggttacgctt actacggtgc ttttgactac tggggccaag ggaccaccgt gaccgtctcc      360
tca                                          363

<210> 169
<211> 107
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2B10_D1A2_wt; VL

<400> 169

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1          5          10          15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Val
20          25          30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile

```

034251

```

35          40          45

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

Gly Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65          70          75          80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Pro Ala
85          90          95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100         105

<210> 170
<211> 321
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2B10_D1A2_wt; VL

<400> 170
gatatccaga tgaccacagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga ccgggtcacc 60
atcacctgcc gggcaagtca ggggattcgt aatgttttag gctggtacca gcagaagcca 120
gggaaagccc ctaagcgctt gatctatgat gcttacagct tgcagagtgg cgtcccatca 180
aggttcagcg gcggtggatc cgggacagag ttactctca ccatcagagag ctgacagcct 240
gaagattttg ccacctatta ctgcttgacg aatggtctgc agcccgcgac gtttgccag 300
ggcaccaaa gtcgagatcaa g 321

<210> 171
<211> 121
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2B10_D1A2_wt; VH

<400> 171

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20         25         30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35         40         45

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65         70         75         80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85         90         95

Ala Arg Leu Tyr Gly Tyr Ala Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
100        105        110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115        120

<210> 172
<211> 363
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2B10_D1A2_wt; VH

<400> 172
caggtgcaat tggcgagtc tgggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tctgcaagg cctccggagg cacattcage agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggagg atcatcccta tctttggtac agcaaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagactgtac 300
ggttacgctt actacggtgc ttttgactac tggggccaag ggaccaccgt gaccgtctcc 360

```

tca 363

<210> 173
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 2B10_D1A2_VD; VL

<400> 173

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
 20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45

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

Gly Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Pro Ala
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 174
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 2B10_D1A2_VD; VL

<400> 174

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga ccgggtcacc 60
 atcacctgcc gggcaagtca ggggattcgt aatgatttag gctggtacca gcagaagcca 120

gggaaagccc ctaagcgct gatctatgat gottacagct tgcagagtgg cgtcccatca 180

aggttcagcg gcggtggatc cgggacagag ttcactctca ccatacagcag cttgcagcct 240

gaagattttg ccacctatta ctgcttgacg aatggtctgc agcccgcgac gtttggccag 300

ggcaccaaag tcgagatcaa g 321

<210> 175
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 2B10_D1A2_VD; VH

<400> 175

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Tyr Gly Tyr Ala Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 176
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 2B10_D1A2_VD; VH

<400> 176
 caggtgcaat tgggtcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaaactac 180
 gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagactgtac 300
 ggttacgctt actacgggtc ttttgactac tggggccaag ggaccaccgt gaccgtctcc 360
 tca 363

<210> 177
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 2B10_O7D8; VL

<400> 177

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Arg Asn Val
 20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Val Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Gly Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Pro Ala
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 178
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 2B10_O7D8; VL

<400> 178
 gatattccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga ccgggtcacc 60
 atcacctgcc gggcaagtca gagcattcgt aatgttttag gctggtacca gcagaagcca 120
 gggaaaagccc ctaagcgctt gatctatgat gtgtccagtt tgcagagcgg cgtcccatca 180
 aggttcagcg gcggtggatc cgggacagag ttactctca ccatcagcag cttgcagcct 240
 gaagattttg ccacctatta ctgcttgagc aatggtctgc agcccgcgac gtttggccag 300
 ggcaccaaag tcgagatcaa g 321

<210> 179
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 2B10_O7D8; VH

<400> 179

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

```

35              40              45

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65              70              75              80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85              90              95

Ala Arg Leu Tyr Gly Tyr Ala Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
100             105             110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115             120

<210> 180
<211> 363
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2B10_O7D8; VH

<400> 180
caggtgcaat tgggtcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtctctc ggtgaaggtc      60
tctgtcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaaactac      180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac      240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagactgtac      300
ggttacgctt actacgggtgc ttttgactac tggggccaag ggaccaccgt gaccgtctcc      360
tca                                             363

<210> 181
<211> 107
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность
<220>
<223> 2B10_O1F7; VL

<400> 181

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1              5              10              15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Val
20             25             30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35             40             45

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

Gly Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65             70             75             80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Pro Ala
85             90             95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100            105

<210> 182
<211> 321
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2B10_O1F7; VL

<400> 182
gatatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtcggaga cggggtcacc      60
atoacctgcc gggcaagtca gggcattcgt aatgttttag gctgtgtacca gcagaagcca      120
gggaaagccc ctaagcgctt gatctatgat gcgtccagtt tgcagagtgg cgtcccatca      180
aggttcagcg gcggtggatc cgggacagag ttcaactctca ccatcagcag cttgcagcct      240
gaagattttg ccacctatta ctgcctgcag aatggctctgc agcccgcgac gtttggccag      300

```

ggcaccaaaag tcgagatcaa g 321

<210> 183
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 2B10_O1F7; VH

<400> 183

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Tyr Gly Tyr Ala Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 184
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 2B10_O1F7; VH
 <400> 184

cagggtgcaat tggtcgagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60

tcctgcgaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggctcgagt gatgggagg atcatcccta tctttggtac agcaaaactac 180

gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagactgtac 300

ggttacgctt actacgggtgc ttttgactac tggggccaag ggaccaccgt gaccgtctcc 360

tca 363

<210> 185
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 2B10_6H10; VL

<400> 185

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Val
 20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45

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

Gly Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Pro Ala
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 186
 <211> 321
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 2B10_6H10; VL

<400> 186
 gacatccaga tgacccagtc tccatccctc ctgtctgcat ctgtcggaga ccgggtcacc 60
 atcacctgcc gggcaagtca gggcattcgt aatgttttag gctggtaacca gcagaagcca 120
 gggaaaagccc ctaagcgcct gatccaggct gctaccagtt tgcagagtgg cgtcccatca 180
 aggttcagcg gcggtggatc cgggacagag ttcaactctca ccatcagcag ctgtcagcct 240
 gaagattttg ccacctatta ctgcttgtag aatggtctgc agcccgcgac gtttggccag 300
 ggcacccaaag tcgagatcaa g 321

<210> 187
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 2B10_6H10; VH

<400> 187

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Leu Tyr Gly Tyr Ala Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 188
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 2B10_6H10; VH

<400> 188
 caggtgcaat tgggtcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggctcgagtg gatgggagg atcatcccta tctttggtac agcaaaactac 180
 gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccaagag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagactgtac 300
 ggttacgctt actacgggtgc ttttgactac tggggccaag ggaccaccgt gaccgtctcc 360
 tca 363

<210> 189
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CH1A1A; VL

<400> 189

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 190
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CH1A1A; VL

<400> 190
 gatattccaga tgaccacagtc tccatcctccc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc 60
 atcacttgca aggccagtcg ggctgtgggt acgtatgttg cgtggtatca gcagaaacca 120
 gggaagcac ctaagctcct gatctattcg gcatcctacc gcaaaagggg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggtgc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt caggtttggc 300
 cagggcacca agctcgagat caag 324

<210> 191
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> CH1A1A; VH

<400> 191

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

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

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

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

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 192
 <211> 363
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CH1A1A; VH

<400> 192
 caggtgcagc tgggtcagtc tggcgccgaa gtgaagaac ctggagctag tgtgaagtg 60
 tcttgcaagg ccagcggcta cacttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120
 ccaggccagg gcctcgaatg gatgggtg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180

```

gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accacggaca ccagcaccag caccgcctac      240
atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac      300
ttcgccctatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct      360
agc                                                                    363

<210> 193
<211> 446
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 28H1 Fab HC-Fc «впадина» (LALA P329G)

<400> 193

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
20          25          30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

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

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65          70          75          80

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

Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100         105         110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130         135         140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145         150         155         160

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

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

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195         200         205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210         215         220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
225         230         235         240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245         250         255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260         265         270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275         280         285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290         295         300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305         310         315         320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325         330         335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro

```

	340		345		350
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val					
355		360		365	
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly					
370		375		380	
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp					
385		390		395	400
Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp					
	405		410		415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His					
	420		425		430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys					
	435		440		445
<210> 194					
<211> 1338					
<212> ДНК					
<213> Искусственная последовательность					
<220>					
<223> 28H1 Fab HC-Fc «впадина» (LALA P329G)					
<400> 194					
gaagtgacgc tgcgggaatc cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg					60
tctctgcgcc cctccggctt cactttctcc tcccacgcc tgtctctgggt ccgacaggct					120
cctggcaaat gcctggaatg ggtgtccgcc atctgggcct ccggcgaqca gtactacgcc					180
gactctgtga agggccgggt caocatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg					240
cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccaa gggctggctg					300
ggcaacttcg actactgggg acagggcacc ctggtcaccg tgtccagcgc tagcaccaag					360
ggccccctcg tgttccccct ggcccccagc agcaagagca ccagcggcgg cacagccgct					420
ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gagcccgta ccgtgtcctg gaacagcgga					480
gcctgacct ccggcgtgca cacttcccc gccgtgctgc agagttctgg cctgtatagc					540
ctgagcagcg tggtcaccgt gccttctagc agcctgggca cccagaccta catctgcaac					600
gtgaaccaca agccccagca caccaaggtg gacaagaagg tggagcccaa gagctgcgac					660
aaaactcaca catgccacc gtgcccagca cctgaagctg cagggggacc gtcagtcttc					720
ctctctctcc caaaaaccaa ggacaccctc atgatctccc ggaaccctga ggtcacatgc					780
gtgggtggtg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc					840
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacacag cactgacctg					900
gtggtcagcg tcttcacctg cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc					960
aaggtctcca acaaaaccct cggcgcccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg					1020
cagccccgag aaccacaggt gtgcaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac					1080
caggtcagcc tctcgtgcgc agtcaaaagg ttctatccca ggcacatcgc cgtggagtg					1140
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac					1200
ggctccttct tctcgtgag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac					1260
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagccctc					1320
tccctgtctc cgggtaaa					1338
<210> 195					
<211> 592					
<212> PRT					
<213> Искусственная последовательность					
<220>					
<223> 28H1 Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)-IL-2 qm					
<400> 195					
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly					
1		5		10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His					
	20		25		30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val					
	35		40		45

034251

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

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

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

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

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly
435 440 445

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Pro Ala Ser Ser
450 455 460

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu
465 470 475 480

Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr
485 490 495

Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu
500 505 510

Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val
515 520 525

Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu
530 535 540

Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr
545 550 555 560

Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe
565 570 575

Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
580 585 590

<210> 196
<211> 1776
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 28H1 Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)-IL-2 qm

<400> 196
gaagtgcagc tgctggaatc cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60
tcttgccgcg cctccggcct caccctctcc tcccacgcca tgtcctgggt ccgacaggct 120
cctggcaaag gcctggaatg ggtgtccgcc atctgggcct ccggcgagca gtactacgcc 180
gactctgtga agggccgggt caccatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg 240
cagatgaact cctgcggggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccaa gggctggctg 300
ggcaacttcg actactgggg acagggcacc ctggtcaccg tgtccagcgc tagcaccaag 360
ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 420
ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccggatg cgggtgcgtg gaactcaggc 480
gccctgacca gcggcgtgca caccctcccg gctgtcttac agtcctcagg actctactcc 540
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagacctc catctgcaac 600
gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggt gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac 660
aaaaactaca catgccacc gtgcccagca cctgaagctg cagggggacc gtcagtcttc 720
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 780
gtgggtgtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 840
gtggaggtgc ataattgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 900
gtggtcagcg tcttcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 960
aaggcttcca acaaaagcct cggcgccccc atcgagaaaa ccattctcaa agccaaaggg 1020
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatgcc gggatgagct gaccaagaac 1080
caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatgc cgtggagtgg 1140
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac 1200
ggctccttct tctctacag caagctcacc gtggacaaga gcagggtggc gcagggggaac 1260
gtcttctcat gctcgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1320
tcctgtctc cgggtggcgg cggaggetcc ggaggcggag gttctggcgg aggtggcgct 1380
cctgectcct ccagcaccaa gaaaaccag ctccagctgg aacatctct gctggatctg 1440
cagatgatcc tgaacggcat caacaactac aagaacccca agctgaccgg gatgctgacc 1500
gccaaagtgc ccatgcccaa gaaggccacc gagctgaac atctgcagtg cctggaagag 1560
gaactgaagc ctctggaaga ggtgctgaac ggcgcccgat ccaagaactt ccacctgagg 1620
cctcgggacc tgatctccaa catcaacgtg atcgtgctgg aactgaaggc ctccgagaca 1680
accttcattg gcgagtacgc cgacgagaca gctaccatcg tggaatttct gaaccgggtg 1740
atcaccttcg ccaggtccat catctccacc ctgacc 1776

<210> 197

034251

<211> 592
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> 28H1 Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)-IL-2 wt

 <400> 197

 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
 20 25 30

 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

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

 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

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

 Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

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

 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190

 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220

 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270

 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

 Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
 355 360 365

 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly
435 440 445

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Pro Thr Ser Ser
450 455 460

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu
465 470 475 480

Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr
485 490 495

Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu
500 505 510

Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val
515 520 525

Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu
530 535 540

Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr
545 550 555 560

Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe
565 570 575

Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
580 585 590

<210> 198
<211> 1776
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 28H1 Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)-IL-2 wt

<400> 198
gaagtgcagc tgctggaatc cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60
tcttgcgccg cctccggett caecttctcc tcccaagcca tgtcctgggt ccgacaggct 120
cctggcaaa gacctggaatg ggtgtccgcc atctgggcct ccggcgagca gtactacgcc 180
gactctgtga agggccggtt caccatctcc cgggacaact ccaagaaac cctgtacctg 240
cagatgaact cctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccaa gggctggctg 300
ggcaacttcg actactgggg acagggcacc ctggtcaccg tgtccagcgc tagcaccaag 360
ggcccatcgg tcttccctcc ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 420
ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgtgtg gaactcaggc 480
gccctgacca gcggcgtgca cacttcccc gctgtcctac agtcttcagg actctactcc 540
ctcagcagcg tggtgacctg gccctccagc agcttgggca cccagacctc catctgcaac 600
gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggt gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac 660
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaagctg cagggggacc gtcagtcttc 720
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 780
gtggtgtgtg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 840
gtggaggtgc ataattgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cactgtacct 900
gtggtcagcg tcttcacctg cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 960
aaggtctcca acaaaagcct cggcgcccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1020
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatgcc gggatgagct gaccaagaac 1080
caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaaagg ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1140
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac 1200
ggctccttct tctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1260

```

gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1320
tcctctgtctc cgggtggcgg cggaggctcc ggaggcggag gtcttgccgg aggtggcgct 1380
cctacatcct ccagcaccaa gaaaaccag ctccagctgg aacatctcct gctggatctg 1440
cagatgatcc tgaacggcat caacaactac aagaaccca agctgacccg gatgctgacc 1500
ttcaagttct acatgccccaa gaaggccacc gagctgaaac atctgcagtg cctggaagag 1560
gaactgaagc ctctggaaga ggtgctgaac ctggcccagt ccaagaactt ccacctgagg 1620
cctcgggacc tgatctccaa catcaacgtg atcgtgctgg aactgaaggg ctccgagaca 1680
accttcattg gcgagtacgc cgacgagaca gctaccatcg tggaatttct gaaccggtgg 1740
atcaccttcg ccagtcctat catctccacc ctgacc 1776

```

```

<210> 199
<211> 574
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 28H1 Fab HC-Fc «выступ» (LALA F329G)-IL-15 (E53A N79A)

<400> 199

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
20          25          30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

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

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65          70          75          80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85          90          95
Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100         105         110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130         135         140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145         150         155         160

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

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

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195         200         205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210         215         220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
225         230         235         240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245         250         255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260         265         270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275         280         285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290         295         300

```

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ser Gly Gly
 435 440 445
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Asn Trp Val Asn
 450 455 460
 Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile Gln Ser Met His
 465 470 475 480
 Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His Pro Ser Cys Lys
 485 490 495
 Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln Val Ile Ser Leu
 500 505 510
 Ala Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu Asn Leu Ile Ile
 515 520 525
 Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Ala Val Thr Glu Ser Gly
 530 535 540
 Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile Lys Glu Phe Leu
 545 550 555 560
 Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn Thr Ser
 565 570

<210> 200

<211> 1722

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 28H1 Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)-IL-15 (E53A N79A)

<400> 200

gaagtgcagc tcttggaatc cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60
 tcctgcgcgc cctccggcct cactctctcc tcccacgcca tgtcctgggt ccgacaggct 120
 cctggcgaag gcctggaatg ggtgtccgcc atctgggcct ccggcgagca gtactacgcc 180
 gactctgtga agggccgggt caccatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg 240
 cagatgaact cctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccaa gggctggctg 300
 ggcaacttcg actactggg acagggcacc ctggtcaccg tgtccagcgc tagcaccaag 360
 ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacacgggcc 420
 ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctgt gaactcaggc 480
 gccctgacca gcggcgtgca caocttcccg gctgtcttac agtctcagg actctactcc 540
 ctcagcagcg tggtagccgt gccctccagc agcttgggca ccagacctta catctgcaac 600
 gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac 660
 aaaactcaca catgccacc gtgccagca cctgaagctg cagggggacc gtcagtcttc 720
 ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 780

```

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggtg cgtggacggc      840
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaaggag agtacaacag cacgtaccgt      900
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc      960
aaggtctcca acaaaagccct cggcgccccc atcgagaaaa ccactctcaa agccaaaggg     1020
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatggcc gggatgagct gaccaagaac     1080
caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggaagtgg     1140
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac     1200
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac     1260
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc     1320
tcctgtcttc cgggttcagg cggcggaggc tccggaggcg gaggttctgg cggaggtggc     1380
aactgggtga atgtaataag tgatttgaaa aaaattgaag atcttattca atctatgcat     1440
attgatgcta ctttatatac ggaagtgtat gttcacccca gttgcaaatg aacagcaatg     1500
aagtgctttc tcttgagttt acaagtattt tcaactgcgt ccggagatgc aagtattcat     1560
gatacagtag aaaatctgat catcctagca aacaacagtt tgtcttctaa tggggctgta     1620
acagaatctg gatgcaaaga atgtgaggaa ctggaggaaa aaaatattaa agaatttttg     1680
cagagttttg tacatattgt ccaaatgttc atcaacactt ct                          1722

```

<210> 201
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 4G8 Fab HC-Fc «впадина» (LALA F329G)

<400> 201

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1              5              10              15

```

```

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
                20              25              30

```

```

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35              40              45

```

```

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50              55              60

```

```

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65              70              75              80

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130             135             140

```

```

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145             150             155             160

```

```

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

```

```

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

```

```

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195             200             205

```

```

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210             215             220

```

```

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225             230             235             240

```

```

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

```

245	250	255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu		
260	265	270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
275	280	285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
290	295	300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
305	310	315
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile		
325	330	335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro		
340	345	350
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala		
355	360	365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
370	375	380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
385	390	395
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
405	410	415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
420	425	430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	445
<210> 202		
<211> 1341		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> 4G8 Fab HC-Fc «впадина» (LALA P329G)		
<400> 202		
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc	60	
tcctgtgcag cctccggatt cacotttagc agttatgcc aagagctgggt ccgccaggct	120	
ccagggaagg ggcctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac	180	
gcagactccg tgaaggcccg gttaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat	240	
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagggtgg	300	
ctgggtaatt ttgactactg gggccaagga accctggcca cgcctcagag tgctagcacc	360	
aagggccctc cctgtgtccc cctggccccc agcagcaaga gcaccagcg cggcacagcc	420	
gctctgggct gcttggtcaa ggactacttc cccgagcccg tgaccgtgtc ctggaacagc	480	
ggagccctga cctccggcgt gcacaccttc cccgcccgtg tcagaggttc tggcctgtat	540	
agcctgagca gcgtgggtcac cgtgccttct agcagcctgg gcaccagagc ctacatctgc	600	
aacgtgaacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aggtggagcc caagagctgc	660	
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc	720	
ttctctcttc cccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca	780	
tgcggtgttg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac	840	
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac	900	
cgtgtggtea gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	960	
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa	1020	
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtgcacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag	1080	
aaccaggcca gcctctcgtg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctgggag	1140	
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctccgtg gctggaactcc	1200	
gacggctcct tcttctcgtg gagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg	1260	
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc	1320	

ctctccctgt ctccgggtaa a 1341

<210> 203
 <211> 593
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 4G8 Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)-IL-2 qm

<400> 203

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

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

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

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175

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

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350

Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
 355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly
435 440 445

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Pro Ala Ser
450 455 460

Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp
465 470 475 480

Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu
485 490 495

Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu
500 505 510

Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu
515 520 525

Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp
530 535 540

Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu
545 550 555 560

Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu
565 570 575
Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu
580 585 590

Thr

<210> 204
<211> 1779
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 4G8 Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)-IL-2 qm

<400> 204
gagggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttraccatc tcagagagaca attccaagaa cacgtgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtg 300
ctgggtaatt ttgactactg gggccaagga accctgtgtca ccgtctcgag tgctagcacc 360
aagggcccat cggttctccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420
gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc ccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 480
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggtgttcc tacagtcttc aggactctac 540
tcctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc 600
aacgtgaate acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 660
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 720
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780
tgctgtgttg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac 840
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900
cgtgtgtgtc gcgtctctac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtcacaa 960
tgcaaggtct ccaacaaaag cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020

```

gggcagcccc gagaaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat gccgggatga gctgaccaag      1080
aaccaggta gctgtggtg cctggtcaaa ggctttctatc ccagcgacat cgccgtggag      1140
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccggt gctggactcc      1200
gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg      1260
aacgtttctt catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactatac gcagaagagc      1320
ctctccctgt ctccgggttg cggcggagcg tccggaggcg gaggttcttg cggaggtggc      1380
gctcctgcct cctccagcac caagaaaaacc cagctccagc tggaacatct cctgctggat      1440
ctgcagatga tcttgaacgg catcaacaac tacaagaacc ccaagctgac ccggatgctg      1500
accgccaaagt tcgccatgcc caagaaggcc accgagctga aacatctgca gtgccctggaa      1560
gaggaactga agcctctgga agaggtgctg aacggcgccc agtccaagaa ctccacctg      1620
aggcctcggg acctgatctc caacatcaac gtgatctgac tggaactgaa gggctccgag      1680
acaacattca tgtgcgagta cggccgagag acagctacca tcgtggaatt tctgaaccgg      1740
tggatcacct tcgccagtc catcatctcc acctgacc                                1779

```

<210> 205
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 4G8 Fab LC

<400> 205

```

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser
          20          25          30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
          35          40          45

Ile Ile Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
          50          55          60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65          70          75          80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro
          85          90          95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
          100         105         110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
          115         120         125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
          130         135         140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
          145         150         155         160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
          165         170         175

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

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
          195         200         205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210         215

```

<210> 206
 <211> 645
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 4G8 Fab LC

<400> 206

```

gagatcgtgc tgacccagtc ccccggcacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc      60

```

```

ctgtcctgca gagcctccca gtccgtgtcc cggctcctacc tcgcctggta tcagcagaag      120
cccgccacagg cccctcggtt gctgatcatc ggcgcctcta ccagagccac cggcatccct      180
gaccggttctt cgggctctgg ctccggcacc gacttcaccc tgaccatctc ccggctggaa      240
cccgaggactc tcgccgtgta ctactgccag cagggccagg tcattccctcc cacttttggc      300
cagggcacca agttggaat caagcgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg      360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc      420
tatcccgag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc      480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccccg      540
acgctgagca aagcagacta cgagaaaacac aaagtctacg cctgcgaaat caccatcag      600
ggcctgagct cgcctgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt                        645

```

```

<210> 207
<211> 447
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

```

```

<220>
<223> 4B9 Fab HC-Fc «впадина» (LALA P329G)

```

```

<400> 207

```

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45

Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
          100          105          110

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

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
          130          135          140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145          150          155          160

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

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

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
          195          200          205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
          210          215          220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225          230          235          240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
          245          250          255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
          260          265          270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
          275          280          285

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

```

```

290          295          300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305          310          315          320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
          325          330          335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro
          340          345          350

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
          355          360          365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
          370          375          380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385          390          395          400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
          405          410          415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
          420          425          430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          435          440          445

<210> 208
<211> 1341
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 4B9 Fab HC-Fc «впадина» (LALA P329G)

<400> 208
gaggtgcagc tgctcgaagc cggcgaggga ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg      60

tcttgcgccg ccagcggcctt caccttcaag agctacgccca tgagctgggt ccgccaggcc      120
cctggcaagg gactggaatg ggtgtccgcc atcatcggct ctggcgccaag cactactac      180

gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccggggaca acagcaagaa caccctgtac      240

ctgcagatga acagcctgcg gcccgaggac accgccgtgt actactgcgc caagggatgg      300

ttcggcggtc tcaactactg gggacagggc accctgtgtc cagtgtccag cgctagcacc      360

aagggccccc cegtgtccc cctggccccc agcagcaaga gcaaccagcg cggcacagcc      420

gctctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgagcccg tgaccgtgtc ctggaacagc      480

ggagccctga cctccggcgt gcacaccttc cccgccgtgc tgcagagttc tggcctgtat      540

agcctgagca gcgtggtcac cgtgccttct agcagcctgg gcaccaagac ctacatctgc      600

aacgtgaacc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aggtggagcc caagagctgc      660

gacaaaaact acacatgccc accgtgccca gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc      720

ttctctttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccgacccc tgaggtcaca      780

tgctgtggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac      840

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcggggagg agcagtacaa cagcacgtac      900

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaa      960

tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa      1020

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtgcacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag      1080

aaccaggtca gcctctcgtg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctgggag      1140

tgggagagca atggggaagg ggagaacaae taacaagaca cgcctccgtg gctggactcc      1200

gacggctcct tcttctcgt gagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg      1260

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc      1320

ctctccctgt ctccgggtaa a      1341

<210> 209
<211> 593
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 4B9 Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)-IL-2 qm

<400> 209

```

034251

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

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

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160

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

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

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350

Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly
435 440 445

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ala Pro Ala Ser
450 455 460

Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp
465 470 475 480

Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu
485 490 495

Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu
500 505 510

Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu
515 520 525

Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp
530 535 540

Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu
545 550 555 560

Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu
565 570 575

Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu
580 585 590

Thr

<210> 210

<211> 1779

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 4B9 Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)-IL-2 qm

<400> 210

gaggtgcagc tgctcgaaag cggcggagga ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg	60
tcttgcgccg ccagcggcctt cacccttcagc agctacgcca tgagctgggt ccgccaggcc	120
cctggcaagg gactggaatg ggtgtccgcc atcatcggct ctggcgccag caccctactac	180
gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac	240
ctgcagatga acagcctgcg ggccgaaggac accgcctgtt actactgcgc caagggatgg	300
ttcggcggtc tcaactactg gggacagggc accctgtgtc cagtgtccag cgttagcacc	360
aagggcccat cggtcttccc cctggcaccc tctccaaga gcacctctgg gggcacagcg	420
gccttgggct gcctggtcaa ggaactcttc ccgaacccgg tgacggtgtc gtggaactca	480
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcttc aggactctac	540
tccttcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc	600
aacgtgaatc acaagcccgag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt	660
gacaaaaatc acacatgccc accgtgccca gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc	720
ttctcttctc ccccaaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgagggtcaca	780
tgctgtggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac	840
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac	900
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	960
tgcaaggctc ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa	1020
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat gccgggatga gctgaccaag	1080
aaccaggtca gccgtgtgtg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag	1140
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc	1200
gacggctcct tcttctctta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg	1260
aacgtctctc catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc	1320
ctctccctgt ctccgggtgg cggcggaggc tccggaggcg gaggttctgg cggaggtggc	1380

```

gctctgcct cctccagcac caagaaaacc cagctccagc tggaacatct cctgctggat 1440

ctgcaagatga tcttgaacgg catcaacaac tacaagaacc ccaagctgac ccggatgctg 1500

accgccaaagt tcgccaatgcc caagaaggcc accgagctga aacatctgca gtgcctggaa 1560

gaggaactga agcctctgga agaggtgctg aacggcgccc agtccaagaa cttccacctg 1620

agggctctggg acctgatctt caacatcaac glgatcglgc tggaaatgaa gggctctggag 1680

acaaccttca tgtgcgagta cgccgacgag acagctacca tegtggatt tctgaaccgg 1740

tggtacacct tcgccagtc catcatctcc acctgacc 1779

<210> 211
<211> 215
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 3F2 Fab LC

<400> 211

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

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

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 212
<211> 645
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 3F2 Fab LC

<400> 212

gagatcgtgc tgaccagtc ccccgacc ctgtctctga gccctggcga gagagccacc 60

ctgtcctgca gagctccca gtccgtgacc tctctctacc tcgcttgta tcagcagaag 120

ccggccagg cccctcggct gctgatcaac gtgggcagtc ggagagccac cggcatccct 180

gaccggttct ccgctctggt ctcgggcacc gacttcaccc tgaccatctc ccgcttgaa 240

cccgaggact tcgccgtgta ctactgccag cagggcacat tgcigcccc cacctttggc 300

cagggcacca agtggaat caagcgtacg gtggccgctc cctccgtgtt catcttccca 360

ccctccgacg agcagctgaa gtccggcacc gcctccgtcg tgtgcctgct gaacaacttc 420

```

```

taccctccgcg aggcccaaggt gcagtggaag gtggacaacg cctgcagtc cggcaactcc      480
caggaatccg tcaccgagca ggactccaag gacagcacct actccctgtc ctccacctg      540
accctgtcca aggccgacta cgagaagcac aaggtgtacg cctgcgaagt gacccaccag      600
ggcctgtcca gcccctgac caagtccttc aaccggggcg agtgc                        645

<210> 213
<211> 446
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> L19 Fab HC-Fc «впадина» (LALA P329G)

<400> 213

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20          25          30

Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100         105         110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130         135         140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145         150         155         160

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

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

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195         200         205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210         215         220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
225         230         235         240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245         250         255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260         265         270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275         280         285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290         295         300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305         310         315         320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325         330         335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro

```


340 345 350

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 214
<211> 1338
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> L19 Fab HC-Fc «впадина» (LALA P329G)

<400> 214
gagggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc agtttttcga tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagc ggctggaagt ggtctcatct atttccggtg gttcgggtac cacatactac 180
gcagactccg tgaaggcccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgttat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaccgttt 300
ccgtattttg actactgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcagtgtc tagcaccaag 360
ggccctcccg tgttcccoct ggcccccagc agcaagagca ccagcggcgg cacagccgct 420
ctgggtgcc ttggtcaagga ctacttcccc gagcccgtag cgtgttcttg gaacagcgga 480
gccctgacct cggcgctgca cacttcccc gccgtgctgc agagtcttg cctgtatagc 540
ctgagcagcg tggtcaccgt gccttctagc agcctgggca cccagacctc catctgcaac 600
gtgaaccaca agcccagcaa caccaagggt gacaagaagg tggagcccaa gagctgcgac 660
aaaactcaca catgccacc gtgccagca cctgaagctg cagggggacc gtcagtcttc 720
ctcttcccc caaaacccaa ggacacctc atgatctccc ggacctga ggtcacatgc 780
gtggtgtggt acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggtg cgtggcggc 840
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggagagag agtacaacag cactaccgt 900
gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 960
aaggtctcca acaagccct cggcgccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1020
cagccccgag aaccacaggt gtgcacctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac 1080
caggtcagcc tctcgtgcgc agtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggaagtg 1140
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac 1200
ggctccttct tcctcgtgag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1260
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggot ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1320
tcctgtctc cgggtaaa 1338

<210> 215
<211> 592
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> L19 Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)-IL-2 qm

<400> 215
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

```

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Ser Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50                      55                      60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                      70                      75                      80

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

Ala Lys Pro Phe Pro Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
          100                      105                      110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
          130                      135                      140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145                      150                      155                      160

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

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

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
          195                      200                      205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
          210                      215                      220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
225                      230                      235                      240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
          245                      250                      255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
          260                      265                      270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
          275                      280                      285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
          290                      295                      300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305                      310                      315                      320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
          325                      330                      335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
          340                      345                      350

Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
          355                      360                      365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
          370                      375                      380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385                      390                      395                      400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
          405                      410                      415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
          420                      425                      430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly
          435                      440                      445

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Pro Ala Ser Ser
          450                      455                      460

```

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu
465 470 475 480

Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr
485 490 495

Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu
500 505 510

Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val
515 520 525

Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu
530 535 540

Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr
545 550 555 560

Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe
565 570 575

Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
580 585 590

<210> 216
<211> 1776
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> L19 Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)-IL-2 qm

<400> 216
gagggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccctttagc agtttttcga tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcatct atttccgcta gttcgggtac cacatactac 180
gcagactccg tgaaggcccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaccgttt 300
ccgtattttg actactgggg ccagggaacc ctggtcaccg tctcgagtgc tagcaccag 360
ggccccatcg tcttccccct ggcaacctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 420
ctgggtctgc tggtaagga ctacttccc gaaccggtag cggtgtctgt gaactcaggc 480
gcctgacca gcggcgtgca caocttccg gctgtctac agtctcagg actetactcc 540
ctcagcagcg tggtagccgt gcccctcagc agcttgggca cccagaccta catctgnaac 600
gtgaatcaca agccccgcaa caccaagggt gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtac 660
aaaaactaca catgccacc gtgccagca cctgaagctg cagggggacc gtcagtcttc 720
cttctcccc caaaaaccaa ggacacctc atgatctccc ggacctctga ggtcacatgc 780
gtggtggtg acgtgagcca cgaagacctt gaggtaagt tcaactggt cgtggacggc 840
gtggaggtgc ataagccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaaag cagttaccgt 900
gtggtcagcg tcttcacgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 960
aagggtctcca acaaagccct cggcgcccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1020
cagccccgag aaccacaggt gtacacctg cccccatgcc gggatgagct gaccaagaac 1080
caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaagge ttctatccca gcgacatcg cgtggagtgg 1140
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac 1200
ggctccttct tctctacag caagctcacc gtggacaaga gcagggtgca gcaggggaac 1260
gttcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1320
tcccgtctc cgggtggcgg cggaggctcc ggaggcggag gttctggcgg aggtggcgct 1380
cctgcctcct ccagcaccaa gaaaaccag ctccagctgg aacatctcct gctggatctg 1440
cagatgatcc tgaacggcat caacaactac aagaacccca agctgacctg gatgctgacc 1500
gccaagttag ccatgcccaa gaaggccacc gagctgaac atctgcagtg cctggaagag 1560
gaactgaage ctctggaaga ggtgctgaac ggcgccaggt ccaagaactt ccacctgagg 1620
cctcgggacc tgatctccaa catcaactgt atcgtgctgg aactgaagg ctccgagaca 1680
accttcattg gcgagtacgc cgcagagaca gctaccatcg tggaatttct gaaccgggtg 1740
atcaccttcg cccagtcct catctccacc ctgacc 1776

<210> 217

034251

```

<211> 215
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> L19 Fab LC

<400> 217

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
          20          25          30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
          35          40          45

Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
          50          55          60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65          70          75          80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Gly Arg Ile Pro
          85          90          95

Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
          100          105          110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
          115          120          125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130          135          140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145          150          155          160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
          165          170          175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
          180          185          190

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
          195          200          205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210          215

<210> 218
<211> 645
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> L19 Fab LC

<400> 218
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gggccagtcg gagtggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat tatgcatcca gcaggggcac tggcatccca 180
gacaggttca gtggcagtggt gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cacaggggtc gtattctctc gagttcggc 300
caagggacca aggtggaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttccc 360
ccatctgatg agcagttgaa atctggaaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 420
tatccacagag aggccaaagt acagtgggaag gtggataacg cctccaatc gggtaaactc 480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccccg 540
acgctgaagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt 645

<210> 219
<211> 445
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> DP47 GS Fab HC-Fc «впадина» (LALA P329G)

```

034251

<400> 219

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20          25          30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100         105         110

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130         135         140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145         150         155         160

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

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

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195         200         205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210         215         220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225         230         235         240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245         250         255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260         265         270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275         280         285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290         295         300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305         310         315         320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325         330         335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser
340         345         350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys
355         360         365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370         375         380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385         390         395         400

Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

```

405	410	415
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
420	425	430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	445
<210> 220		
<211> 1335		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> DP47 GS Fab HC-Fc «впадина» (LALA P329G)		
<400> 220		
gaggtgcaat tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc	60	
tcctgtgcag cctccggatt cacttttagc agttatgccg tgagctgggt ccgccaggct	120	
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac	180	
gcagactccg tgaaggcccg gtccaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgttat	240	
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc	300	
ggatttgact actggggcca aggaacctcg gtcacgtctc cgagtgttag caccaagggc	360	
ccctccgtgt tccccctggc cccagcagc aagagcacca gcggcgac agccctctg	420	
ggctgcctgg tcaaggacta ctcccccgag cccgtgaccg tgtcctggaa cagcggagcc	480	
ctgacctccg gcgtgcacac ctccccgcc gtgctgcaga gttctggcct gtatagcctg	540	
agcagcgtgg tcaccgtgcc ttctagcagc ctgggcaccc agacctacat ctgcaactg	600	
aaccacaagc ccagcaaac caaggtggac aagaaggtgg agcccaagag ctgcgacaaa	660	
actcacat gccaccctg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgac agtcttctc	720	
ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg	780	
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacct ggacggcgtg	840	
gaggtgcata atgccaagac aaagcccgcg gaggagcagt acaacagcac gtacctgtg	900	
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcag	960	
gtctccaaca aagccctcgg cgcctccatc gagaaaacca tctccaagc caaaggcgag	1020	
ccccgagaac cacaggtgtg caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag	1080	
gtcagcctct cgtgcgcagt caaaggcttc tatccacgc acatgcctgt ggagtgggag	1140	
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc	1200	
tccttcttcc tcttgagaca gctcaccgtg gacaagagca ggtggagca ggggagctc	1260	
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc	1320	
ctgtctccgg gtaaa	1335	
<210> 221		
<211> 591		
<212> PRT		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> DP47 GS Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)-IL-2 qm		
<400> 221		
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1 5 10 15		
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr		
20 25 30		
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35 40 45		
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50 55 60		
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65 70 75 80		
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85 90 95		
Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr		
100 105 110		

```

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
    130                135                140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
    145                150                155                160

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

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

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
    195                200                205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
    210                215                220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
    225                230                235                240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
    245                250                255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
    260                265                270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
    275                280                285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
    290                295                300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
    305                310                315                320
Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
    325                330                335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys
    340                345                350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys
    355                360                365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
    370                375                380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
    385                390                395                400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
    405                410                415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
    420                425                430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly
    435                440                445

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Pro Ala Ser Ser Ser
    450                455                460

Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln
    465                470                475                480

Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg
    485                490                495

Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys
    500                505                510

His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu
    515                520                525

```

```

Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile
530                               535                               540

Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr
545                               550                               555                               560

Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu
565                               570                               575

Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
580                               585                               590

<210> 222
<211> 1773
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> DP47 GS Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)-IL-2 qm

<400> 222
gaggtgcaat tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctccggatt cacctttagc agttatgcc a tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggcctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccate tccagagaca attccaagaa cagcctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300
ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgtag caccaagggc 360
ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg 420
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa cgggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggt gtctctacagt cctcaggact ctactcctc 540
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600
aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaatc ttgtgacaaa 660
actcacat gcccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcttc 720
ttcccccaa aacccaagga caccctaatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagtcca actggtacgt ggaaggcgtg 840
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtccaag 960
gtctccaaca aagccctcgg cgcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1020
ccccgagaac cccaggtgta caccctgccc ccatgcgggg atgagctgae caagaaccag 1080
gtcagcctgt ggtgcctggt caaaggcttc tatccacgag acatgcacct ggaagtggag 1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
tcctttcttc tctacagcaa gctcacctg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctc 1320
ctgtctccgg gtggcggcgg aggtctccgga ggcggagggt ctggcggagg tggcgctcct 1380
gcctcctcca gcaccaagaa aaccagctc cagctggaac atctcctgct ggaatctgag 1440
atgatctga acggcatcaa caactacaag aaccccaagc tgaccggat gctgaccgcc 1500
aagttcgcca tgcccaagaa ggccaccgag ctgaaacatc tgcagtgcct ggaagaggaa 1560
ctgaagcctc tggaagaggt gctgaacggc gccagtccta agaacttcca cctgaggcct 1620
cggaacctga tctccaacat caacgtgac gtgctggaac tgaaggcctc cgagacaacc 1680
ttcatgtgcg agtacgccga cgagacagct accatcgtgg aatttctgaa ccggtggatc 1740
accttcgccc agtccatcat ctccaccctg acc 1773

<210> 223
<211> 591
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> DP47GL Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)- IL-2 wt

<400> 223
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

```


034251

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

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

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

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys
340 345 350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly
435 440 445

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Pro Thr Ser Ser Ser
 450 455 460

Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln
 465 470 475 480

Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg
 485 490 495

Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys
 500 505 510

His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu
 515 520 525

Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile
 530 535 540

Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr
 545 550 555 560

Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu
 565 570 575

Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 580 585 590

<210> 224
 <211> 1773
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> DP47GS Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)- IL-2 wt

<400> 224
 gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgcc tgaactgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtgtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat 240
 ctgcagatga acagcctgag agccaggagc acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc 300
 ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgcag caccaagggc 360
 ccacgtgtct tccccctggc accctctctc aagagcact ctgggggac agcggccctg 420
 ggctgcctgg tcaaggacta ctccccgaa ccggtgacgg tgtcgtgaa ctacggcgcc 480
 ctgaccagcg gcgtgcacac ctccccgct gtccacagct cctcaggact ctactccctc 540
 agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 600
 aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaagtgt agcccaaatc ttgtgacaaa 660
 actcacacat gccaccctg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc 720
 tccccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg 780
 gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 840
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 900
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcagg 960
 gtctccaaca aagccctcgg cgccccatc gagaaaacca tctccaagc caaagggcag 1020
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatgccggg atgagctgac caagaaccag 1080
 gtcagcctgt ggtgcctggt caaaggcttc tatccagcg acatgccgtt ggagtgggag 1140
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1200
 tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1260
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggtcttg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1320
 ctgtctccgg gtggcgccgg aggtcccgga ggcggagggt ctggcgaggg tggcgctcct 1380
 acatctccca gcaccaagaa aaccagctc cagctggaac atctcctgct ggatctgcag 1440
 atgatctga acggcatcaa caactacaag aaccccaagc tgaccgggat gctgaecttc 1500
 aagttctaca tgccaagaa gccaccagag ctgaaacatc tgcagtgcct ggaagaggaa 1560
 ctgaagcctc tggaagaggt gctgaacctg gccagttcca agaacttcca cctgaggcct 1620
 cgggacctga tctccaacat caacgtgac gtgctggaac tgaagggtc cgagacaacc 1680
 ttcattgtcg agtacccga cgagacagct accatcgtgg aatttctgaa ccggtggatc 1740

```

accttcgcc agtccatcat ctccaccctg acc                                     1773

<210> 225
<211> 215
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> DP47GS Fab LC

<400> 225

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20          25          30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35          40          45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50          55          60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65          70          75          80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85          90          95

Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100         105         110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115         120         125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130         135         140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145         150         155         160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165         170         175

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

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195         200         205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210         215

<210> 226
<211> 645
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> DP47GS Fab LC

<400> 226
gaatcgtgtt taacgcagtc tccagggcacc ctgtcttltgt ctccagggga aagagccacc      60

ctctcttgca gggccagtca gagtggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa      120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca      180

gacagggtta gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag      240

cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcaccgct gacgttcggc      300

cagggggacca aagtggaaat caaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg      360

ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc      420

tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc      480

caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg      540

acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag      600

ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgtt      645

<210> 227
<211> 451
<212> PRT

```

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CHI1A1A Fab HC-Fc «впадина» (wt)

<400> 227

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

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

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

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

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

385	390	395	400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val			
405	410	415	
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met			
420	425	430	
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser			
435	440	445	
Pro Gly Lys			
450			
<210> 228			
<211> 1353			
<212> ДНК			
<213> Искусственная последовательность			
<220>			
<223> CH1A1A Fab HC-Fc «впадина» (wt)			
<400> 228			
caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaaggtg	60		
tctgtcaagg ccagcggtca caecttcaacc gagttaggca tgaactgggt ccgacaggct	120		
ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac	180		
gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accacggaca ccagcaccag caccgcctac	240		
atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgcctgtg actactgcgc cagatggggac	300		
ttcgcttatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct	360		
agcgctaagca ccaagggccc aagcgtgttc cctctggccc ccagcagcaa gacgacaagc	420		
ggcggaaacag ccgcctctgg ctgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgacagtg	480		
tcctggaaca gcggaagccct gaccagcggc gtgcacacct ttccagccgt gctgcagagc	540		
agcggcctgt acagcctgag cagcgtggtc acagtgccca gcagcagcct gggcaccacg	600		
acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag	660		
ccaagagct gcgacaagac ccacacctgt cccccttgtc ctgcccctga gctgctgggc	720		
ggaccagcgt tgttctctgtt ccccccaag cccaaggaca ccctgatgat cagccggacc	780		
ccgaagtga cctgcgtggt ggtggacgtg tcccacgagg acctgaagt gaagttcaat	840		
tggtactgtg acggcgtgga ggtgcacaat gccaaagaca agccccggga ggaacagtac	900		
aacagcacct accgggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc	960		
aaagagtaca agtgcaaggt ctccaacaag gccctgcctg ccccatcgga gaaaaccatc	1020		
agcaaggcca agggccaagc cagagaaccc caggtgtgca ccctgcccc cagcagagat	1080		
gagctgacca agaaccaggt gtccctgagc tgtgccgtca agggcttcta ccccagcgt	1140		
atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cctgagaaca actacaagac caccctccct	1200		
gtgctggaca gcgacggcag ctctctctgt gtgtccaaac tgaccgtgga caagagccgg	1260		
tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcagc agggccctgca caaccactac	1320		
accagaagtc cccctgagcct gagccccggc aay	1353		
<210> 229			
<211> 599			
<212> PRT			
<213> Искусственная последовательность			
<220>			
<223> CH1A1A Fab HC-Fc «выступ» (wt)-IL-2 qm			
<400> 229			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1 5 10 15			
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Phe			
20 25 30			
Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
35 40 45			
Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe			
50 55 60			
Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr			
65 70 75 80			

034251

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

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

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
450 455 460

Gly Gly Ala Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu
465 470 475 480

Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn
485 490 495

Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met
500 505 510

Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu
515 520 525

Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe
530 535 540

His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu
545 550 555 560

Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu
565 570 575

Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln
580 585 590

Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
595

<210> 230
<211> 1797
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CH1A1A Fab HC-Fc «выступ» (wt)-IL-2 qm

<400> 230
caaggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaagggt 60
tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120
ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180
gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240
atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatggggac 300
ttcgectatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct 360
agcgctagca ccaagggccc aagcgtgttc cctctggccc ccagcagcaa gagcacaagc 420
ggcggaaacag cgcacctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgacagtg 480
tcctggaaca gcggagccct gaccagcggc gtgcaaacct ttccagccgt gctgcagagc 540
agcggcctgt acagcctgag cagcgtggtc acagtgccta gcagcagcct gggcaccacg 600
acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660
cccaagagct gcgacaagac ccacacctgt ccccttgttc ctgcacctga gctgtggggc 720
ggaccacgcy tgttcctgtt cccccaaaag cccaaggaca ccctgatgat cagccggacc 780
cccgaagtga cctgcgtggt ggtggacgtg tcccacgagg accctgaagt gaagttcaat 840
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcacaat gccaaagaca agccccggga ggaacagtac 900
aacagcacct accgggtggt gtccgtgctg accgtgctgc accaggactg gctgaacggc 960
aaagagtaca agtgcaaggt ctccaacaag gccctgcctg ccccatcga gaaaaccatc 1020
agcaaggcca agggccagcc cagagaaccc caggtgtaca ccctgcccc ctgcagagat 1080
gagctgacca agaaccaggt gtccctgtgg tgtctgtgtca agggcttcta cccagcgtat 1140
atgcctgtgg agtgggagag caacggccag cctgagaaca actacaagac caccctccct 1200
gtgctggaca gcgaacggcag ctcttctctg tactccaac tgaccgtgga caagagccgg 1260
tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggccttgca caaccctac 1320
acccaagaat ccctgagcct gagccccggc aagtccggag gcggaggctc cggcggcgga 1380
ggttctggcg gaggtggcgc tcctgcctcc tcacgcacca agaaaaacca gctccagctg 1440
gaacatctcc tgctggatct gcagatgatc ctgaacggca tcaacaacta caagaacccc 1500
aagctgaccc ggaatgctgac gcccaagttc gccatgccca agaaggccac cgagctgaaa 1560
catctgcagt gcctggaaga ggaactgaag cctctggaag aggtgctgaa cggcgcccag 1620
tccaagaact tcacctgag gcctcgggac ctgatctcca acatcaacgt gatcgtgctg 1680
gaactgaagg gctccgagac aaccttcatg tgcgagtacg ccgacgagac agctaccatc 1740
gtggaatttc tgaaccggtg gatcaccttc gccagtcaca tcattctcac cctgacc 1797

<210> 231
<211> 215
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

034251

```
<220>
<223> 2F1 Fab LC

<400> 231

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35           40           45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
        50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
        85           90           95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
        100           105           110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
        115           120           125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
        130           135           140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145           150           155           160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
        165           170           175

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180           185           190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
        195           200           205

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
        210           215

<210> 232
<211> 645
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2F1 Fab LC

<400> 232
gatatccaga tgaccacagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc        60
atcacttgca aggcacagtc gcctgtgggt acgtatgttg cgtggtacca gcagaaacca        120
gggaaagcac ctaagctcct gatctattcg gcactcctacc gcaaaagggg agtcccatca        180
aggttcagtg gcagtggtatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct        240
gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc        300
cagggcacca agctcgagat caagcgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg        360
coatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc        420
tatccagag aggcctaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatec gggtaactcc        480
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacccctg        540
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaaagt caccatcatg        600
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgt                    645

<210> 233
<211> 451
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2B10 Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)

<400> 233

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
```


034251

```
1             5             10             15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
      20             25             30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
      35             40             45

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
      65             70             75             80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85             90             95

Ala Arg Leu Tyr Gly Tyr Ala Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
      100            105            110

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

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

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

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
      165            170            175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
      180            185            190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
      195            200            205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
      210            215            220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
      225            230            235            240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
      245            250            255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
      260            265            270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
      275            280            285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
      290            295            300

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

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
      325            330            335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
      340            345            350

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
      355            360            365

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
      370            375            380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
      385            390            395            400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
      405            410            415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
```

420	425	430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
435	440	445
Pro Gly Lys		
450		
<210> 234		
<211> 1353		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> 2B10 Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)		
<400> 234		
cagggtgcaat tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc	60	
tcttgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc	120	
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaaactac	180	
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccaczag cacagcctac	240	
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagactgtac	300	
ggttacgctt actacggtgc ttttgactac tggggccaag ggaccacagt gaccgtctcc	360	
tcagctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct	420	
gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg	480	
tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggtgt cctacagtcc	540	
tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag	600	
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag	660	
cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg	720	
ggaccgtcag tcttctcttt cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccgacc	780	
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac	840	
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagcaa agcccgggga ggagcagtac	900	
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcttc accgtctcgc accaggactg gctgaatggc	960	
aaggagtaca agtgcaaggt ctcaacaaa gccctcggcg ccccoactga gaaaaccatc	1020	
tcacaaacca aagggcagcc ccgagaacca cagggtgaca cctcgcccc atgcgggat	1080	
gagctgacca agaaccaggt cagcctgtgg tgctgtgtca aaggttcta tcccagcgac	1140	
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc	1200	
gtgctggact ccgacggctc ottctctctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg	1260	
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggcctctga caaccactac	1320	
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa	1353	
<210> 235		
<211> 805		
<212> PRT		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> 2B10 Fab HC-Fc «впадина» (LALA P329G)-scIL-10		
<400> 235		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser		
1 5 10 15		
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr		
20 25 30		
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
35 40 45		
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe		
50 55 60		
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
65 70 75 80		
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85 90 95		
Ala Arg Leu Tyr Gly Tyr Ala Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly		
100 105 110		

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 450 455 460
 Ser Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe
 465 470 475 480
 Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser
 485 490 495
 Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu
 500 505 510
 Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln
 515 520 525

Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln
530 535 540

Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly
545 550 555 560

Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe
565 570 575

Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn Ala
580 585 590

Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe
595 600 605

Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg
610 615 620

Asn Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
625 630 635 640

Gly Gly Gly Gly Ser Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser
645 650 655

Cys Thr His Phe Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg
660 665 670

Asp Ala Phe Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu
675 680 685

Asp Asn Leu Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr
690 695 700

Leu Gly Cys Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu
705 710 715 720

Val Met Pro Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val
725 730 735
Asn Ser Leu Gly Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg
740 745 750

Cys His Arg Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln
755 760 765

Val Lys Asn Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala
770 775 780

Met Ser Glu Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr
785 790 795 800

Met Lys Ile Arg Asn
805

<210> 236

<211> 2415

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 2B10 Fab HC-Fc «впадина» (LALA P329G)-scIL-10

<400> 236

caggtgcaat tgggtcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtccctc ggtgaaggtc 60

tcttgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaaactac 180

gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagactgtac 300

ggttacgctt actacggctc ttttgactac tggggccaag ggaccaccgt gaccgtctcc 360

tcagctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420

gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggtgtg cctacagtcc 540

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccacg 600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660

```

cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg      720
ggaccgtcag tcttctcttt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc      780
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac      840
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagacaa agccgcggga ggagcagtac      900
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcttc accgtcttgc accaggactg gctgaatggc      960
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg ccccatcgga gaaaaccatc     1020
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca ccctgcccc atcccgggat     1080
gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tcccagcgac     1140
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctctcc     1200
gtgctggact ccgacggctc ctcttctctc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg     1260
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgtctc gtgatgcatg aggcctctga caacctacac     1320
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt ggcggcggag gctccggagg cggaggatct     1380
gggggaggcg gaagtagccc gggccagggc acccagagcg agaacagctg caccacttcc     1440
cccggaacc tgcccaacat gctgcgggac ctgagggacg ccttcagcag agtgaaaacc     1500
ttcttcaga tgaaggacca gctggacaac ctgctgctga aagagagcct gctggaagat     1560
ttcaagggct acctgggctg tcaggccctg agcgagatga tccagttcta cctggaagaa     1620
gtgatcccc aggccgagaa ccaggacccc gacatcaagg cccacgtgaa cagcctgggc     1680
gagaacctga aaacctgctg gctgagactg cggcggtgcc acagatttct gccctgcgag     1740
aacaagagca aggccgtgga acaggtgaag aacgccttca acaagctgca ggaaaagggc     1800
atctacaagg ccatgtccga gttcgacatc ttcataact acatcgaagc ttacatgacc     1860
atgaagatca gaaacggcgg aggcgcatct ggcggcgggt gaagtggagg cggaggatct     1920
gggggaggcg gaagtagccc gggccagggc acccagagcg agaacagctg caccacttcc     1980
cccggaacc tgcccaacat gctgcgggac ctgagggacg ccttcagcag agtgaaaacc     2040
ttcttcaga tgaaggacca gctggacaac ctgctgctga aagagagcct gctggaagat     2100
ttcaagggct acctgggctg tcaggccctg agcgagatga tccagttcta cctggaagaa     2160
gtgatcccc aggccgagaa ccaggacccc gacatcaagg cccacgtgaa cagcctgggc     2220
gagaacctga aaacctgctg gctgagactg cgcgggtgcc acagatttct gccctgcgag     2280
aacaagagca aggccgtgga acaggtgaag aacgccttca acaagctgca ggaaaagggc     2340
atctacaagg ccatgtccga gttcgacatc ttcataact acatcgaagc ctacatgaca     2400
atgaaaatcc gcaat                                     2415

```

<210> 237
 <211> 631
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 2B10 Fab HC-Fc «впадина» (LALA P329G)-IL-10M1

<400> 237

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Tyr Gly Tyr Ala Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala

034251

```

130          135          140

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

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
          165          170          175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
          180          185          190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
          195          200          205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
          210          215          220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225          230          235          240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
          245          250          255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
          260          265          270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
          275          280          285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
          290          295          300

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

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
          325          330          335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
          340          345          350

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
          355          360          365

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
          370          375          380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385          390          395          400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
          405          410          415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
          420          425          430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
          435          440          445

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
          450          455          460

Ser Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe
465          470          475          480

Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser
          485          490          495

Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu
          500          505          510

Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln
          515          520          525

Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln
          530          535          540

Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly

```

```

545              550              555              560

Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe
      565              570              575

Leu Pro Cys Glu Asn Gly Gly Gly Ser Gly Gly Lys Ser Lys Ala Val
      580              585              590

Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr
      595              600              605

Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr
      610              615              620

Met Thr Met Lys Ile Arg Asn
625              630

<210> 238
<211> 1893
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2B10 Fab HC-Fc «владаина» (LALA P329G)-IL-10M1

<400> 238
caggtgcaat tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc      60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc      120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtag agcaaaactac      180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac      240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagactgtac      300
ggttacgctt actacggtgc ttttgactac tggggccaag ggaccaccgt gaccgtctcc      360
tcagctagca ccaagggccc atcgggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct      420
ggggggcacag cggccctggg ctgccctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg      480
tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggtgtt cctacagtcc      540
tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacccag      600
acctaatctt gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag      660
cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaaccgtgc cagcacctga agctgcaggg      720
ggaccgtcag tcttctcttt cccccaaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccggacc      780
cctgaaggta catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac      840
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccggggga ggagcagtac      900
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtctctc accaggactg gctgaatggc      960
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg ccccatcgga gaaaaccatc     1020
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca cctgcccccc atcccgggat     1080
gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tcccagcgac     1140
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctcccc     1200
gtgctggact ccgacggctc cttcttcttc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg     1260
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac     1320
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt ggcggcggag gctccggagg cggaggaagt     1380
ggcggcggtg gcagctctcc aggccagggc acccagagcg agaacagctg caccacctic     1440
cccggaacc tgccaacat gctgcgggac ctgagggagc ccttcagcag agtgaaaacc     1500
ttcttcaga tgaaggacca gctggacaac ctgctgctga aagagagcct gctggaagat     1560
ttcaagggct acctgggctg tcaggccctg agcgagatga tccagttcta cctggaagaa     1620
gtgatgeccc aggcggagaa ccaggacccc gacateaaag cccacgtgaa cagcctgggc     1680
gagaacctga aaaccctgcg gctgagactg cggcgggtgcc acagatttct gcctgcgag     1740
aacggcgag gctctggcgg aaagtccaag gccgtggaac aggtgaagaa cgccttcaac     1800
aagctgcagg aaaaggcat ctacaaggcc atgagcgagt tcgacatctt catcaactac     1860
atcgaagctt acatgacaat gaagatacga aac                                     1893

<210> 239
<211> 214
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2B10 Fab LC

```

<400> 239

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asn Gly Leu Gln Pro Ala
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 240

<211> 642

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 2B10 Fab LC

<400> 240

gataaccaga tgaccacagtc tccatccctcc ctgtctgcat ctgtcggaga ccgggtcacc 60

atcacctgcc gggcaagtca gggcattaga aatgatttag gctggtaacca gcagaagcca 120

gggaaagccc ctaagcgccct gatctatgct gcatccagtt tgcagagtgg cgtcccatca 180

aggttcagcg gcggtggatc cgggacagag ttactctca ccatcagcag ctgcagcct 240

gaagattttg ccacctatta ctgcttgtag aatggtctgc agcccgcgac gtttggccag 300

ggcaccaaaag tcgagatcaa gcgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat ctcccgcca 360

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420

cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactccag 480

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 540

ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 600

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 642

<210> 241

<211> 447

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 4G8 Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)

<400> 241

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15


```

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
      20              25              30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35              40              45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
      50              55              60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
      65              70              75              80

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

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

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

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
      130             135             140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
      145             150             155             160

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

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

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
      195             200             205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
      210             215             220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
      225             230             235             240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
      245             250             255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
      260             265             270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
      275             280             285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
      290             295             300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
      305             310             315             320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
      325             330             335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
      340             345             350

Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
      355             360             365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
      370             375             380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
      385             390             395             400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
      405             410             415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
      420             425             430

```

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 242
 <211> 1341
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 4G8 Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)

<400> 242
 gaggtgcaat tgttgagtc tgggggagc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tctctgtcag cctccggatt caccttttag agttatgcc tgagctgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggcctggagt ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcagatga acagccctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggggtg 300
 ctgggtaatt ttgactactg gggccaagga accctggtca cgcctcag tgctagcacc 360
 aagggcccat cggctctccc cctggcacc cctccaaga gaacctctgg gggcacacg 420
 gccctgggct gcttggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 480
 ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcttc aggaactctac 540
 tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc 600
 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 660
 gacaaaactc acacatgccc accgtgcccc gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 720
 ttctcttccc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 840
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900
 cgtgtgtgta cgttcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960
 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat gccgggatga gctgaccaag 1080
 aaccaggtca gctgtggtg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctgggag 1140
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc 1200
 gacggtctct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcagggt gcagcagggg 1260
 aacgtcttct catgctccgt gatgcattgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320
 ctctccctgt ctccgggtaa a 1341

<210> 243
 <211> 801
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 4G8 Fab HC-Fc «впадина» (LALA P329G)-scIL-10

<400> 243

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

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

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

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

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys

034251

```

130          135          140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145          150          155          160

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

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

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
          195          200          205

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
          210          215          220

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225          230          235          240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
          245          250          255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
          260          265          270

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
          275          280          285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
          290          295          300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305          310          315          320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
          325          330          335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro
          340          345          350

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
          355          360          365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
          370          375          380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385          390          395          400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
          405          410          415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
          420          425          430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly
          435          440          445

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser Pro Gly
          450          455          460

Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro Gly Asn Leu
465          470          475          480

Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg Val Lys Thr
          485          490          495

Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Lys Glu Ser
          500          505          510

Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala Leu Ser Glu
          515          520          525

Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala Glu Asn Gln
          530          535          540

Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu Asn Leu Lys

```

034251

445											550											555											560												
Thr	Leu	Arg	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Cys	His	Arg	Phe	Leu	Pro	Cys	Glu																														
				565												570												575																	
Asn	Lys	Ser	Lys	Ala	Val	Glu	Gln	Val	Lys	Asn	Ala	Phe	Asn	Lys	Leu																														
				580												585												590																	
Gln	Glu	Lys	Gly	Ile	Tyr	Lys	Ala	Met	Ser	Glu	Phe	Asp	Ile	Phe	Ile																														
				595												600												605																	
Asn	Tyr	Ile	Glu	Ala	Tyr	Met	Thr	Met	Lys	Ile	Arg	Asn	Gly	Gly	Gly																														
				610												615												620																	
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly																														
				625												630												635																	
Ser	Ser	Pro	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Ser	Glu	Asn	Ser	Cys	Thr	His	Phe																														
				645												650												655																	
Pro	Gly	Asn	Leu	Pro	Asn	Met	Leu	Arg	Asp	Leu	Arg	Asp	Ala	Phe	Ser																														
				660												665												670																	
Arg	Val	Lys	Thr	Phe	Phe	Gln	Met	Lys	Asp	Gln	Leu	Asp	Asn	Leu	Leu																														
				675												680												685																	
Leu	Lys	Glu	Ser	Leu	Leu	Glu	Asp	Phe	Lys	Gly	Tyr	Leu	Gly	Cys	Gln																														
				690												695												700																	
Ala	Leu	Ser	Glu	Met	Ile	Gln	Phe	Tyr	Leu	Glu	Glu	Val	Met	Pro	Gln																														
				705												710												715																	
Ala	Glu	Asn	Gln	Asp	Pro	Asp	Ile	Lys	Ala	His	Val	Asn	Ser	Leu	Gly																														
				725												730												735																	
Glu	Asn	Leu	Lys	Thr	Leu	Arg	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Cys	His	Arg	Phe																														
				740												745												750																	
Leu	Pro	Cys	Glu	Asn	Lys	Ser	Lys	Ala	Val	Glu	Gln	Val	Lys	Asn	Ala																														
				755												760												765																	
Phe	Asn	Lys	Leu	Gln	Glu	Lys	Gly	Ile	Tyr	Lys	Ala	Met	Ser	Glu	Phe																														
				770												775												780																	
Asp	Ile	Phe	Ile	Asn	Tyr	Ile	Glu	Ala	Tyr	Met	Thr	Met	Lys	Ile	Arg																														
				785												790												795																	

```

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac      900
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag      960
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa     1020
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtgcacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag     1080
aacccaggtca gcctctcgtg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcogtggag     1140
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctccgtg gctggactcc     1200
gacggctcct tcttcctcgt gagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg     1260
aacgtcttct catgtccgtg gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc     1320
ctctccctgt ctccgggtgg cggcggaggc tccggaggcg gaggatctgg gggaggcgga     1380
agtagcccg gccaagggcac ccagagcgag aacagctgca cccacttccc cggcaacctg     1440
cccaacatgc tgcgggacct gagggacgcc ttcagcagag tgaaaacctt cttccagatg     1500
aaggaccagc tggacaacct gctgctgaaa gagagcctgc tggaaagatt caagggctac     1560
ctgggctgtc aggccctgag cgagatgac cagttctacc tggaaagaat gatgccccag     1620
gccgagaacc aggaccccga catcaaggcc cactgaaca gcctgggcga gaacctgaaa     1680
accctgcggc tgagactgcg gcggtgccac agatttctgc cctgcgagaa caagagcaag     1740
gccgtggaac aggtgaagaa cgccttcaac aagctgcagg aaaagggcat ctacaaggcc     1800
atgtccgagt tcgacatctt catcaactac atcgaagcct acatgacct gaagatcaga     1860
aacggcgag gcgcatctgg cggcggtgga agtgaggcg gaggatcgg gggaggcgga     1920
agtagcccg gccaagggcac ccagagcgag aacagctgca cccacttccc cggcaacctg     1980
cccaacatgc tgcgggacct gagggacgcc ttcagcagag tgaaaacctt cttccagatg     2040
aaggaccagc tggacaacct gctgctgaaa gagagcctgc tggaaagatt caagggctac     2100
ctgggctgtc aggccctgag cgagatgac cagttctacc tggaaagaat gatgccccag     2160
gccgagaacc aggaccccga catcaaggcc cactgaaca gcctgggcga gaacctgaaa     2220
accctgcggc tgagactgcg gcggtgccac agatttctgc cctgcgagaa caagagcaag     2280
gccgtggaac aggtgaagaa cgccttcaac aagctgcagg aaaagggcat ctacaaggcc     2340
atgtccgagt tcgacatctt catcaactac atcgaagcct acatgacaat gaaaatccgc     2400
aat                                     2403

<210> 245
<211> 627
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 4G8 Fab HC-Fc «впадина» (LALA F329G)-IL-10M1

<400> 245

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20         25         30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35         40         45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50         55         60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65         70         75         80

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

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

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

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130        135        140

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145        150        155        160

```

Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly
 435 440 445
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Pro Gly
 450 455 460
 Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe Pro Gly Asn Leu
 465 470 475 480
 Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe Ser Arg Val Lys Thr
 485 490 495
 Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu Leu Leu Lys Glu Ser
 500 505 510
 Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys Gln Ala Leu Ser Glu
 515 520 525
 Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro Gln Ala Glu Asn Gln
 530 535 540
 Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu Gly Glu Asn Leu Lys
 545 550 555 560
 Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu Pro Cys Glu
 565 570 575

Asn Gly Gly Gly Ser Gly Gly Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys
580 585 590

Asn Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser
595 600 605

Glu Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys
610 615 620

Ile Arg Asn
625

<210> 246
<211> 1881
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 4G8 Fab HC-Fc «впадина» (LALA P329G)-IL-10M1

<400> 246
gagggtgcaat tggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
tctgtgcag cctccggatt caccttttagc agttatgccg tgagctgggt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagggtgg 300
ctgggtaatt ttgactactg gggccaagga accctgtgca cgtctcag tgctagcacc 360
aaggggccat cgtctctccc cctggcaccc tctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420
gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc ccggaaccgg tgacggtgtc ttggaaactca 480
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcttc aggactctac 540
tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 600
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 660
gacaaaaatc acacatgccc accgtgqcca gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 720
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct ccgggacccc tgaggtcaca 780
tgctgtgttg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggta agtcaactg gtacgtggac 840
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960
tgcaaggctc ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa 1020
gggcagcccc gaaacacaca ggtgtgaccc ctgccccat cccgggalya gctgacaaag 1080
aaccaagtcg gcctctcgtg cgcagtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctgggag 1140
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccg gctggactcc 1200
gacggctcct tctcctcgt gagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1260
aacgtcttct catgctccgt gatgcattgag gctctgcaca accactaac gcagaagagc 1320
ctctccctgt ctccgggtgg cggcgagggc tccgaggcg gaggaagtcg cggcggtggc 1380
agctctccag gccagggcac ccagagcgag aacagctgca cccacttccc cggcaacctg 1440
cccaacatgc tgcgggacct gagggacgac ttcagcagag tgaacacct ctccagatg 1500
aaggaccagc tggacaacct gctgctgaaa gagagcctgc tggaaagatt caagggtac 1560
ctgggtgtgc aggccctgag cgagatgac cagttctacc tggaaagat gatgccccag 1620
gccgagaacc aggaacccga catcaaggcc cactggaaca gcctgggcga gaacctgaaa 1680
accctgcggc tgaagactgc gcggtgccac agatttctgc cctgcgagaa cggcgagggc 1740
tctggcgaaa agtccaaggc cgtggaacag gtgaagaacg ccttcaacaa gctgcaggaa 1800
aagggcattc acaaggccat gagcgagttc gacattctca tcaactacat cgaagcttac 1860
atgacaatga agatacgaaa c 1881

<210> 247
<211> 366
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> IL-2 qm-Fc «выступ» (LALA P329G) (IL-2 на N-конце)

<400> 247

Ala Pro Ala Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15

```

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
    20                      25                      30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys
    35                      40                      45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
    50                      55                      60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
    65                      70                      75                      80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
    85                      90                      95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
   100                      105                      110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
   115                      120                      125

Ile Ser Thr Leu Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr
   130                      135                      140

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
   145                      150                      155                      160

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
   165                      170                      175

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
   180                      185                      190

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
   195                      200                      205

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
   210                      215                      220
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
   225                      230                      235                      240

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
   245                      250                      255

Lys Ala Lys Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
   260                      265                      270

Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
   275                      280                      285

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
   290                      295                      300

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
   305                      310                      315                      320

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
   325                      330                      335

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
   340                      345                      350

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
   355                      360                      365

<210> 248
<211> 1098
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> IL-2 qm-Fc «выступ» (LALA P329G) (IL-2 на N-конце)

<400> 248
gtctctgcct cctccagcac caagaaaacc cagctccagc tggaacatct cctgctggat      60
ctgcagatga tcctgaacgg catcaacaac tacaagaacc ccaagctgac ccggatgctg      120
accgccaagt tcgccatgcc caagaaggcc accgagctga aacatctgca gtgcctggaa      180

```



```

gaggaactga agcctctgga agaggtgctg aacggcgccc agtccaagaa cttccacctg      240
aggcctcggg acctgatctc caacatcaac gtgatcgtgc tggaactgaa gggctccgag      300
acaaccttca tgtgcgagta cgccgacgag acagctacca tcgtggaatt tctgaaccgg      360
tggataacct tcgccagtc catcatctcc accctgacct ccggtggtgg cggatccgac      420
aaaaactaca catgccacc gtgccagca cctgaagctg cagggggacc gtcagtcttc      480
ctcttcccc caaaacccaa ggacacctc atgatctccc ggacctcta ggtcacatgc      540
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc      600
gtggaggtgc ataagccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt      660
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc      720
aaggtctcca acaaagccct cggcgccccc atcgagaaaa ccattctcaa agccaaaggg      780
cagcccccag aaccacaggt gtacaccctg ccccatgcc gggatgagct gaccaagaac      840
caggtcagcc tgtggtgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatgc cgtggaagtg      900
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac      960
ggctcttctt tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtgaca gcaggggaac     1020
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc     1080
tcctgtcttc cgggtaaa

```

```

<210> 249
<211> 384
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> IL-7-Fc «выступ» (LALA P329G) (IL-7 на N-конце)

<400> 249

```

```

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
1           5           10           15

Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
20          25          30

Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp
35          40          45

Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
50          55          60

Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu
65          70          75          80

Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Val
85          90          95

Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser
100         105         110

Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu
115         120         125

Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys
130         135         140

Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr
145         150         155         160

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
165         170         175

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

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
195         200         205

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
210         215         220

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

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

```

034251

[illegible]

034251

```

35          40          45

Gln Lys Ala Glu Thr Ile Pro Val Leu His Glu Met Ile Gln Gln Ile
50          55          60

Phe Asn Leu Phe Ser Thr Lys Asp Ser Ser Ala Ala Trp Asp Glu Thr
65          70          75          80

Leu Leu Asp Lys Phe Tyr Thr Glu Leu Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu
85          90          95

Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met
100         105         110

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

Leu Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val
130         135         140

Arg Ala Glu Ile Met Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu
145         150         155         160

Ser Leu Arg Ser Lys Glu Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr
165         170         175

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
180         185         190

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
195         200         205

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
210         215         220

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
225         230         235         240

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
245         250         255

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
260         265         270

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
275         280         285

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
290         295         300

Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
305         310         315         320

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
325         330         335

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
340         345         350

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
355         360         365

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
370         375         380

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
385         390         395

<210> 252
<211> 1194
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> IFN-а-Fc «выступ» (LALA P329G) (IFN-а на N-конце)

<400> 252
agctgtgacc tgcctcagac acacagcctg ggcagccggc ggaccctgat gctgctggcc 60
cagatgcgga agatcagcct gttcagctgc ctgaaggacc ggcacgactt cggcttcctt 120
```

```

caggaagagt tcggcaacca gttccagaag gccgagacaa tccccgtgct gcacgagatg      180
atccagcaga ttttcaacct gttcagcacc aaggacagca gcgccgcctg ggacgagaca      240
ctgctggaca agttctacac cgagctgtac cagcagctga acgacctgga agcctgcgtg      300
atccaggcg tgggcgtgac cgagacaccc ctgatgaagg aagatagcat cctggccgtg      360
cggaagtatt tccagcggat caccctgtac ctgaaaagaa agaagtacag cccctccgcc      420
tgggaggtcg tgcgggccga gatcatgcgg agcttcaagg tgagcaccaa cctgcaggaa      480
agcctgcgga gcaaagaggg tggtagcgga tccgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc      540
ccagcacctg aagctgcagg gggaccgtca gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac      600
accctcatga tctccgggac cctgaggtc acatgcgttg tggtagcgt gagccagaa      660
gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgttg aggtgcataa tgccaagaca      720
aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg      780
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctcggc      840
gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac      900
accctgcccc catgccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgtg gtgcctggtc      960
aaaggcttct atcccagcga catgcgcgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac     1020
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ctttcttct ctacagcaag     1080
ctcaccgtg acaagagcag gtgacgagc gggaaactct tctcatgtc cgtgatgcat     1140
gaggetctgc acaaccacta cagcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa         1194

```

```

<210> 253
<211> 593
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

```

```

<220>
<223> 28H1 Fab HC-Fc (LALA P329G)-IL-2 qm

```

```

<400> 253

```

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
20          25          30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

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

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65          70          75          80

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

Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100         105         110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130         135         140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145         150         155         160

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

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

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195         200         205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210         215         220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe

```

034251

225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly
435 440 445

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala Ser
450 455 460

Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp
465 470 475 480

Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu
 485 490 495

Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu
500 505 510

Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu
515 520 525

Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp
530 535 540

Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu
545 550 555 560

Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu
 565 570 575

Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu
580 585 590

Thr

<210> 254
<211> 1779
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 28H1 Fab HC-Fc (LALA P329G)-IL-2 qm

<400> 254

```

gaagtgcagc tgctggaatc cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg      60
tcctgcgcgc cctccggcct caccctctcc tcccacgcca tgtcctgggt cgcacaggct      120
cctggcaaa gcttggaatg ggtgtccgcc atctgggcct ccggcgajca gtactacgcc      180
gactctgtga agggccggtt caccatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg      240
cagatgaact ccttcggggc caggacacc gccgtgtact actgtgcca gggctggctg      300
ggcaacttgg actactgggg acagggcacc ctggtcaccg tgtccagcgc tagcaccaag      360
ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcgggc      420
ctgggctgcc tggtaagga ctacttccc gaaccggtga cgggtgcgtg gaactcaggc      480
gccttgacca gcggcgtgca caccctcccg gctgtctac agtctcagg actctactcc      540
ctcagcagcg tggtagcgtt gccctccagc agcttgggca ccagacctc catctgcaac      600
gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggt gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac      660
aaaactcaca catgccacc gtgccagca cctgaagctg cagggggacc gtcagtcttc      720
ctcttcccc caaaacccaa ggacacctc atgatctcc ggacctga ggtcacatgc      780
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacctt gaggtcaagt tcaactgta cgtggaacgc      840
gtggaggtgc ataagccaa gacaaagcgc cgggaggagc agtacaacag cactaccgt      900
gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc      960
aaggcttcca acaaagcct cggcgcccc atcgagaaa ccatctcaa agccaaaggg      1020
cagccccgag aaccacaggt gtacacctg cccccatcc gggatgagct gaccaagaac      1080
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaagc ttctatccca gcgacatgc cgtggagtgg      1140
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac      1200
ggctccttct tctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac      1260
gtcttctcal gctccylgal gcalgaggt ctgcacaacc actacacgca gaagagcttc      1320
tccctgtctc cgggtggcgg cggaggctcc ggaggcggag gttctggcgg aggtggctcc      1380
gcacctgcct caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctgat      1440
ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaactcac caggatgctc      1500
acagccaagt ttgccatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa      1560
gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatggcgctc aaagcaaaaa ctttcaacta      1620
agaccaggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa      1680
acaacattca tgttgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga      1740
tggattacct ttgccaaag catcatctca acactgact      1779

```

```

<210> 255
<211> 473
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Слитый белок мышиный IL-2R-бета-Fc («впадина»)
<400> 255

```

```

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp
1          5          10          15

Phe Pro Leu Leu Leu Trp Phe Pro Gly Ala Arg Cys Ala Val Lys
20          25          30

Asn Cys Ser His Leu Glu Cys Phe Tyr Asn Ser Arg Ala Asn Val Ser
35          40          45

Cys Met Trp Ser His Glu Glu Ala Leu Asn Val Thr Thr Cys His Val
50          55          60

His Ala Lys Ser Asn Leu Arg His Trp Asn Lys Thr Cys Glu Leu Thr
65          70          75          80

Leu Val Arg Gln Ala Ser Trp Ala Cys Asn Leu Ile Leu Gly Ser Phe
85          90          95

Pro Glu Ser Gln Ser Leu Thr Ser Val Asp Leu Leu Asp Ile Asn Val
100         105         110

Val Cys Trp Glu Glu Lys Gly Trp Arg Arg Val Lys Thr Cys Asp Phe
115         120         125

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

```

Leu His Ile Asp Thr Gln Arg Cys Asn Ile Ser Trp Lys Val Ser Gln
 145 150 155 160

 Val Ser His Tyr Ile Glu Pro Tyr Leu Glu Phe Glu Ala Arg Arg Arg
 165 170 175

 Leu Leu Gly His Ser Trp Glu Asp Ala Ser Val Leu Ser Leu Lys Gln
 180 185 190

 Arg Gln Gln Trp Leu Phe Leu Glu Met Leu Ile Pro Ser Thr Ser Tyr
 195 200 205

 Glu Val Gln Val Arg Val Lys Ala Gln Arg Asn Asn Thr Gly Thr Trp
 210 215 220

 Ser Pro Trp Ser Gln Pro Leu Thr Phe Arg Thr Arg Pro Ala Asp Pro
 225 230 235 240

 Met Lys Glu Gly Ala Gln Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 245 250 255

 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 260 265 270

 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 275 280 285

 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 290 295 300

 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 305 310 315 320

 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 325 330 335

 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 340 345 350
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 355 360 365

 Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 370 375 380

 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 385 390 395 400

 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 405 410 415

 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 420 425 430

 Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 435 440 445

 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 450 455 460

 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

 <210> 256
 <211> 1422
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Слитый белок мышиный IL-2R-бета-Fc («впадина»)
 <400> 256
 atggacatga ggggtcccgccg tcagctcctg ggcctcctgc tgctctgggt cccctcctg 60

 ctgctctggt tcccagggtgc cagggtgtgca gtgaaaaact gttcccatct tgaatgcttc 120

 tacaactcaa gagccaatgt ctcttgcattg ttgagccatg aagaggctct gaatgtcaca 180

 acctgccacg tccatgccaa gtgcgaacctg cgcactctga acaaaaacctg tgaactaaat 240

 cttgtgaggg aggcatacctg ggcctgcaac ctgatacctg ggctcgttccc agagtccccc 300

tcaactgacct ccgtggacct ccttgacata aatgtggtgt gctgggaaga gaagggttgg 360
 cgtagggttaa agacctgcga cttccatccc ttgacaacc ttgccttggg ggcccccat 420
 tcctccaag ttctgcacat tgataccag agatgtaaca taagctgaa ggtctccag 480
 gtctctcact acattgaacc atacttgaa ttgaggccc gtagacgtct tctgggccac 540
 agctgggagg atgcattccgt attaacctc aagcagagac agcagtggct cttcttggag 600
 atgtgatcc ctagtacctc atagtgggc caggtgaggg tcaaagctca acgaaacaat 660
 accgggacct ggagtcctg gagccagccc ctgaccttc ggacaaggcc agcagatccc 720
 atgaaggagg gagtcaagga caaaactcac acatgcccac cgtgccacg acctgaactc 780
 ctggggggac cgtcagtcct cctcttcccc ccaaaaccca aggacacct catgatctcc 840
 cggacccttg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacct tgaggccaag 900
 ttcaactggt acgtggaagg cgtggagggt cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 960
 cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtctccaccg tcttgacca ggactggctg 1020
 aatggcaagg agtacaagt caaggtctcc aacaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1080
 accatctcca aagccaaagg gcagcccga gaaccacagg tgtcacctt gccccctcc 1140
 cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctctcgtcg cagtcaaagg cttctatccc 1200
 agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccagc 1260
 cctcccgtgc tggactccga cggctccttc ttctcgtga gcaagctcac cgtggacaag 1320
 agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcatgagge tctgcacaa 1380
 cactacacgc agaagagcct ctcctgtct ccgggtaaat ga 1422

<210> 257
 <211> 500
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Слитый белок мышиный IL-2R-гамма-Fc («выступ»)
 <400> 257

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Phe Pro Leu Leu Leu Trp Phe Pro Gly Ala Arg Cys Trp Ser Ser
 20 25 30

Lys Val Leu Met Ser Ser Ala Asn Glu Asp Ile Lys Ala Asp Leu Ile
 35 40 45

Leu Thr Ser Thr Ala Pro Glu His Leu Ser Ala Pro Thr Leu Pro Leu
 50 55 60

Pro Glu Val Gln Cys Phe Val Phe Asn Ile Glu Tyr Met Asn Cys Thr
 65 70 75 80

Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro Gln Ala Thr Asn Leu Thr Leu His Tyr
 85 90 95

Arg Tyr Lys Val Ser Asp Asn Asn Thr Phe Gln Glu Cys Ser His Tyr
 100 105 110

Leu Phe Ser Lys Glu Ile Thr Ser Gly Cys Gln Ile Gln Lys Glu Asp
 115 120 125

Ile Gln Leu Tyr Gln Thr Phe Val Val Gln Leu Gln Asp Pro Gln Lys
 130 135 140

Pro Gln Arg Arg Ala Val Gln Lys Leu Asn Leu Gln Asn Leu Val Ile
 145 150 155 160

Pro Arg Ala Pro Glu Asn Leu Thr Leu Ser Asn Leu Ser Glu Ser Gln
 165 170 175

Leu Glu Leu Arg Trp Lys Ser Arg His Ile Lys Glu Arg Cys Leu Gln
 180 185 190

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

Ile Val Asn His Glu Pro Arg Phe Ser Leu Pro Ser Val Asp Glu Leu
 210 215 220

Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg Ser Arg Tyr Asn Pro Ile Cys Gly
 225 230 235 240

 Ser Ser Gln Gln Trp Ser Lys Trp Ser Gln Pro Val His Trp Gly Ser
 245 250 255

 His Thr Val Glu Glu Asn Pro Ser Leu Phe Ala Leu Glu Ala Gly Ala
 260 265 270

 Gln Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 275 280 285

 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 290 295 300

 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 305 310 315 320

 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 325 330 335

 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 340 345 350

 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 355 360 365

 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 370 375 380

 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 385 390 395 400

 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 405 410 415

 Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 420 425 430
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 435 440 445

 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 450 455 460

 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 465 470 475 480

 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 485 490 495

 Ser Pro Gly Lys
 500

<210> 258

<211> 1503

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слитый белок машинный IL-2R-гамма-Fc («выступ»)

<400> 258

atggacatga gggccccgc tcagctctgc ggcctctgc tgctctggtt cccctcctg 60
 ctgctctggt tccccaggtgc caggtgttgg agttccaagg tctctatgtc cagtgcgaat 120
 gaagacatca aagctgattt gatcctgact tctacagccc ctgaacacct cagtgtctct 180
 actctgcccc ttccagaggt tcagtgcttt gtgttcaaca tagagtacat gaattgcact 240
 tggaaatgca gttctgagcc tcaggcaacc aacctcagc tgcactatag gtacaaggta 300
 tctgataata atacattcca ggagtcagtc cactatttgt tctccaaaga gattacttct 360
 ggctgtcaga taaaaaaga agatatecag ctctaccaga catttggtgt ccagctccag 420
 gacccccaga aacccccagag gcgagctgta cagaagctaa acotacajaa tottgtagtc 480
 ccacgggctc cagaaaatct aacctcagc aatctgagtg aatccagct agagctgaga 540
 tggaaaagca gacatattaa agaacgctgt ttacaatact tgggtgcagta ccggagcaac 600
 agagatcgaa gctggacgga actaatagtg aatcatgaac ctgattcttc cctgcctagt 660
 gtggatgagc tgaaacggtg cacatttcgg gtteggagcc gctataaccc aatctgtgga 720

```

agttctcaac agtggagtaa atggagccag cctgtccact gggggagtca tactgtagag      780
gagaatcett ccttgtttgc actggaagct ggagctcagg acaaaactca cacatgccca      840
ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tctcttccc cccaaaaccc      900
aaggacaccc tcattgatct ccggaccocct gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc      960
cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc     1020
aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc     1080
gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc     1140
ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccc agaaccacag     1200
gtgtacaccc tgcccccatt ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgtgtgtc     1260
ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccc     1320
gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac     1380
agcaagctca cctgggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgtccctgt     1440
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa     1500
tga                                                                    1503

```

```

<210> 259
<211> 213
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

```

```

<220>
<223> Альфа-субъединица мышиного IL-2R + Avi-метка + His-метка
<400> 259

```

```

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1          5          10          15

Val His Ser Glu Leu Cys Leu Tyr Asp Pro Pro Glu Val Pro Asn Ala
20          25          30

```

```

Thr Phe Lys Ala Leu Ser Tyr Lys Asn Gly Thr Ile Leu Asn Cys Glu
35          40          45

```

```

Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Leu Lys Glu Leu Val Tyr Met Arg Cys
50          55          60
Leu Gly Asn Ser Trp Ser Ser Asn Cys Gln Cys Thr Ser Asn Ser His
65          70          75          80

```

```

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

```

```

Gln Gln Thr Thr Thr Asp Met Gln Lys Pro Thr Gln Ser Met His Gln
100          105          110

```

```

Glu Asn Leu Thr Gly His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp Lys His Glu
115          120          125

```

```

Asp Ser Lys Arg Ile Tyr His Phe Val Glu Gly Gln Ser Val His Tyr
130          135          140

```

```

Glu Cys Ile Pro Gly Tyr Lys Ala Leu Gln Arg Gly Pro Ala Ile Ser
145          150          155          160

```

```

Ile Cys Lys Met Lys Cys Gly Lys Thr Gly Trp Thr Gln Pro Gln Leu
165          170          175

```

```

Thr Cys Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly Ser Gly Leu Asn
180          185          190

```

```

Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu Ala Arg Ala His
195          200          205

```

```

His His His His
210

```

```

<210> 260
<211> 642
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

```

```

<220>
<223> Альфа-субъединица мышиного IL-2R + Avi-метка + His-метка

```

```

<400> 260
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcattccgaa      60

```

```

ctgtgtctgt atgacccacc cgaggtcccc aatgccacat tcaaagccct ctcctacaag      120
aacggcacca tcctaaactg tgaatgcaag agaggtttcc gaagactaaa ggaattggtc      180
tatatgcgtt gcttaggaaa ctcctggagc agcaactgcc agtgcaccag caactcccat      240
gacaaatcga gaaagcaagt tacagctcaa cttgaacacc agaaagagca acaaaaccaca      300
acagacatgc agaagccaac acagtctatg caccaagaga accttacagg tcactgcagg      360
gagccacctc cttggaaca tgaagattcc aagagaatct atcatttcgt ggaaggacag      420
agtgttcact acgagtgtat tccgggatac aaggctctac agagaggccc tgetattagc      480
atctgcaaga tgaagtgtgg gaaaacgggg tggactcagc cccagctcac atgtgtcgac      540
gaacagttat atttcaggg cggtcagggc ctgaacgaca tcttcgaggc ccagaagatc      600
gagtggcacg aggtctgagc tcaccacat caccatcact ga                        642

<210> 261
<211> 480
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Слитый белок обезьяний (циномолгус) IL-2R-бета-Fc(«выступ») + Avi-метка

<400> 261

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1          5          10          15

Val His Ser Ala Val Asn Gly Thr Ser Arg Phe Thr Cys Phe Tyr Asn
20          25          30

Ser Arg Ala Asn Ile Ser Cys Val Trp Ser Gln Asp Gly Ala Leu Gln
35          40          45

Asp Thr Ser Cys Gln Val His Ala Trp Pro Asp Arg Arg Arg Trp Asn
50          55          60

Gln Thr Cys Glu Leu Leu Pro Val Ser Gln Ala Ser Trp Ala Cys Asn
65          70          75          80
Leu Ile Leu Gly Thr Pro Asp Ser Gln Lys Leu Thr Ala Val Asp Ile
85          90          95

Val Thr Leu Arg Val Met Cys Arg Glu Gly Val Arg Trp Arg Met Met
100         105         110

Ala Ile Gln Asp Phe Lys Pro Phe Glu Asn Leu Arg Leu Met Ala Pro
115         120         125

Ile Ser Leu Gln Val Val His Val Glu Thr His Arg Cys Asn Ile Ser
130         135         140

Trp Lys Ile Ser Gln Ala Ser His Tyr Phe Glu Arg His Leu Glu Phe
145         150         155         160

Glu Ala Arg Thr Leu Ser Pro Gly His Thr Trp Glu Glu Ala Pro Leu
165         170         175

Met Thr Leu Lys Gln Lys Gln Glu Trp Ile Cys Leu Glu Thr Leu Thr
180         185         190

Pro Asp Thr Gln Tyr Glu Phe Gln Val Arg Val Lys Pro Leu Gln Gly
195         200         205

Glu Phe Thr Thr Trp Ser Pro Trp Ser Gln Pro Leu Ala Phe Arg Thr
210         215         220

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

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
245         250         255

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
260         265         270

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
275         280         285

```

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 290 295 300

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 305 310 315 320

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 325 330 335

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 340 345 350

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 355 360 365

Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
 370 375 380

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 385 390 395 400

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 405 410 415

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 420 425 430

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 435 440 445

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Ser
 450 455 460

Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
 465 470 475 480

<210> 262
 <211> 1443
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Слитый белок обезьяний (циномолпус) IL-2R-бета-Fc(«выступ») + Avi-метка

<400> 262
 atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccggtgt gcattccgcg 60
 gtcaacggca cttcccggtt cacatgcttc tacaactcga gagccaacat ctcctgtgtc 120
 tggagccaag atggggctct gcaggacact tcttgccaag tccacgcctg gccggacaga 180
 cggcggtgga accaaacctg tgagctgctc cctgtgagtc aagcatcctg ggcctgcaac 240
 ctgatcctcg gaaccccaga ttctcagaaa ctgacgcag tggatatcgt caccctgagg 300
 gtgatgtgcc gtgaaggggt gcgatggagg atgatggcca tccaggactt caaacccctt 360
 gagaaccttc gcctgatggc ccccatctcc ctccaagtcg tccacgtgga gaccacaga 420
 tgcaacataa cctggaaaaat ctccaagcc tccactact ttgaaagaca cctggagttt 480
 gagggccgga cgtgttcccc aggccacacc tgggaggagg ccccoctgat gacctcaag 540
 cagaagcagg aatggatctg cctggagacg ctaccccag acaccagta tgagtttcag 600
 gtgcgggtca agcctctgca aggcgagttc acgacctgga gccctggag ccagccccctg 660
 gccctcagga caaagcctgc agcccttggg aaggacaccg gagctcagga caaaactcac 720
 acatgcccac cgtgccacgc acctgaactc ctggggggac cgtcagtcct cctcttcccc 780
 ccaaaaccca aggacacct catgatctcc cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg 840
 gacgtgagcc acgaagaccc tgaggccaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg 900
 cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgttgctcagc 960
 gtctcaccg tcctgcacca ggaactggctg aatggcaagg agtacaagt caaggtctcc 1020
 aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga 1080
 gaaccacagg tgtacacct gccccatgc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc 1140
 ctgtggtgcc tggtaaaagg cttctatccc agcgacatcg ccgtggagtg ggaagacaa 1200
 gggcagccgg agaacaacta caagaccacg cctcccgtgc tggactccga cggctccttc 1260
 ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca 1320
 tgctcgtgta tgcattgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctcctgtct 1380

```

ccgggtaaat ccggaggcct gaacgacatc ttcgaggccc agaagattga atggcacgag      1440

tga                                                                    1443

<210> 263
<211> 489
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Слитый белок обезьяний (шиномолгус) IL-2R-гамма-Fc(«впадина»)

<400> 263

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1          5          10          15

Val His Ser Leu Asn Thr Thr Ile Leu Thr Pro Asn Gly Asn Glu Asp
          20          25          30

Ala Thr Thr Asp Phe Phe Leu Thr Ser Met Pro Thr Asp Ser Leu Ser
35          40          45

Val Ser Thr Leu Pro Leu Pro Glu Val Gln Cys Phe Val Phe Asn Val
50          55          60

Glu Tyr Met Asn Cys Thr Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro Gln Pro Thr
65          70          75          80

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

Gln Lys Cys Ser His Tyr Leu Phe Ser Glu Glu Ile Thr Ser Gly Cys
100         105         110

Gln Leu Gln Lys Lys Glu Ile His Leu Tyr Gln Thr Phe Val Val Gln
115         120         125

Leu Gln Asp Pro Arg Glu Pro Arg Arg Gln Ala Thr Gln Met Leu Lys
130         135         140

Leu Gln Asn Leu Val Ile Pro Trp Ala Pro Glu Asn Leu Thr Leu Arg
145         150         155         160

Lys Leu Ser Glu Ser Gln Leu Glu Leu Asn Trp Asn Asn Arg Phe Leu
165         170         175

Asn His Cys Leu Glu His Leu Val Gln Tyr Arg Thr Asp Trp Asp His
180         185         190

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

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

Asn Pro Leu Cys Gly Ser Ala Gln His Trp Ser Glu Trp Ser His Pro
225         230         235         240

Ile His Trp Gly Ser Asn Ser Ser Lys Glu Asn Pro Phe Leu Phe Ala
245         250         255

Leu Glu Ala Gly Ala Gln Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
260         265         270

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
275         280         285

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
290         295         300

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
305         310         315         320

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
325         330         335

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
340         345         350

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

```

```

355          360          365

Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
370          375          380

Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
385          390          395          400

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
405          410          415

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
420          425          430

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
435          440          445

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
450          455          460

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
465          470          475          480

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485

<210> 264
<211> 1470
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Слитый белок обезьяний (циномолтус) IL-2R-рамча-Fc («впадина»)

<400> 264
atgggatgga gctgtatcat cctctctcttg gtagcaacag ctaccgggtgt gcattccctg      60
aacacgacaa ttctgacgcc caatgggaat gaagacgcca caactgattt ctctctgacc      120
tctatgccca ctgactccct cagtgtttcc actctgcccc tccagaggtt tcagtgtttt      180
gtgttcaatg tcgagtacat gaattgcact tggaacagca gctctgagcc ccagccctacc      240
aacctcactc tgcattattg gtacaagaat tcggataatg ataaagtcca gaagtgcagc      300
cactatctat tctctgaaga aatcacttct ggctgtcagt tgcaaaaaaa ggagatccac      360
ctctacaaaa cgtttgttgt tcagctccag gacccacggg aaccacaggag acagccacaca      420
cagatgctaa aactgcagaa tctgtgtatc ccttgggctc cggagaaact aacacttcgc      480
aaactgagtg aatcccgctt ayaactgaac tggaaacaca gattcttgea ccactgtttg      540
gagcacttgg tgcagtaccg gactgacttg gaccacagct ggactgaaca atcagtggat      600
tatagacata agttctcctt gcctagtgtg gatgggcaga aacgctacac gtttcgtgtc      660
cggagccgct ttaacccact ctgtggaagt gctcagcatt ggagtgaatg gagccaccca      720
atccactggg ggagcaatag ttcaaaagag aatcctttcc tgtttgcatt ggaagccgga      780
gctcaggaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg      840
tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacacctca tgatctcccg gacctctgag      900
gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac      960
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc     1020
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacgcgc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag     1080
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ggcgccccca tcgagaaaac catctccaaa     1140
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tgcacctgc cccatccccg ggatgagctg     1200
accaagaacc aggtcagcct ctcgtagcgc gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc     1260
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg     1320
gactccgacg gctccttctt cctcgtgagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag     1380
cagggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag     1440
aagagcctct cctgtcttcc gggtaaatga                                     1470

<210> 265
<211> 217
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Альфа-субъединица обезьяньего (циномолтус) IL-2R + Avi-метка + His-метка

```

<400> 265

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Lys Ile Thr His Ala Thr Phe Lys
20 25 30

Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu Cys Lys Arg
35 40 45

Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Pro Tyr Met Leu Cys Thr Gly
50 55 60

Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys Thr Ser Ser
65 70 75 80

Ala Ala Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro Glu Glu Gln
85 90 95

Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Gln Met Gln Leu Ala Asp
100 105 110

Gln Val Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp Glu Asn
115 120 125

Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val Gly Gln Thr Val Tyr
130 135 140

Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly Pro Ala Glu
145 150 155 160

Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg Trp Thr Gln Pro Gln
165 170 175

Leu Ile Cys Thr Gly Glu Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly
180 185 190

Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
195 200 205
Ala Arg Ala His His His His His His
210 215

<210> 266

<211> 654

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Альфа-субъединица обезьяньего (циномолгус) IL-2R + Avi-метка + His-метка

<400> 266

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctaccgggtga gctctgtgac 60

gatgacccgc caaaaatcac acatgccaca ttcaaagcca tggcctacaa ggaaggaacc 120

atgttgaaact gtgaatgcaa gagaggtttc cgcagaataa aaagcgggtc accctatatg 180

ctctgtacag gaaactctag ccaactcgtec tgggacaacc aatgtcaatg cacaagctct 240

gctgctcgga acacaacaaa acaagtgaca cctcaacctg aagaacagaa agaaagaaaa 300

accacagaaa tgcaaaagtca aatgcagctg gcggaccaag tgagccttcc aggtcactgc 360

agggaacctc caccgtggga aaatgaagcc acagaaagaa ttatcattt cgtggtgggg 420

cagacgggtt actaccagtg cgtccaggga tacagggtc tacacagagg tctgtctgag 480

agcgtctgca aaatgaccca cgggaagaca agatggaccc agccccagct catatgcaca 540

ggtagagtcg acgaacagtt atattttcag ggcggtctag gcotgaacga catcttcgag 600

gccagaaga tgcagtgga cagggtctga gctcaccacc atcaccatca ctga 654

<210> 267

<211> 474

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слияние человеческий IL-10R1-Fc + Avi-метка

<400> 267

His Gly Thr Glu Leu Pro Ser Pro Pro Ser Val Trp Phe Glu Ala Glu
1 5 10 15

034251

Phe Phe His His Ile Leu His Trp Thr Pro Ile Pro Asn Gln Ser Glu
20 25 30

Ser Thr Cys Tyr Glu Val Ala Leu Leu Arg Tyr Gly Ile Glu Ser Trp
35 40 45

Asn Ser Ile Ser Asn Cys Ser Gln Thr Leu Ser Tyr Asp Leu Thr Ala
50 55 60

Val Thr Leu Asp Leu Tyr His Ser Asn Gly Tyr Arg Ala Arg Val Arg
65 70 75 80

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

Phe Ser Val Asp Glu Val Thr Leu Thr Val Gly Ser Val Asn Leu Glu
100 105 110

Ile His Asn Gly Phe Ile Leu Gly Lys Ile Gln Leu Pro Arg Pro Lys
115 120 125

Met Ala Pro Ala Asn Asp Thr Tyr Glu Ser Ile Phe Ser His Phe Arg
130 135 140

Glu Tyr Glu Ile Ala Ile Arg Lys Val Pro Gly Asn Phe Thr Phe Thr
145 150 155 160

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

Val Gly Glu Phe Cys Val Gln Val Lys Pro Ser Val Ala Ser Arg Ser
180 185 190

Asn Lys Gly Met Trp Ser Lys Glu Glu Cys Ile Ser Leu Thr Arg Gln
195 200 205

Tyr Phe Thr Val Thr Asn Val Asp Glu Gln Leu Tyr Phe Gln Gly Gly
210 215 220
Ser Pro Lys Ser Ala Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
225 230 235 240

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
260 265 270

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
275 280 285

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
290 295 300

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
305 310 315 320

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
325 330 335

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
340 345 350

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
355 360 365

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
370 375 380

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
405 410 415

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
420 425 430

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
435 440 445

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Leu Asn Asp Ile
450 455 460

Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
465 470

<210> 268

<211> 1422

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Слияние человеческий IL-10R1-Fc + Avi-метка

<400> 268

```
catgggacag agctgcccag cctccgtct gtgtggttg aagcagaatt tttccaccac      60
atcctccact ggaccccat cccaaatcag tctgaaagta cctgctatga agtggcactc      120
ctgaggtatg gaatagagtc ctggaactcc atctccaact gtagccagac cctgtcctat      180
gaccttaccg cagtgcactt ggacctgtac cacagcaatg gctaccgggc cagagtgcgg      240
gctgtggacg gcagccggca ctccaactgg accgtcacca acacccgctt ctctgtggat      300
gaagtgactc tgacagttgg cagtgtgaac ctagagatcc acaatggctt catcctcggg      360
aagattcagc taccagggcc caagatggcc cccgcaaatg acacatatga aagcatcttc      420
agtcacttcc gagagtatga gattgccatt cgcaaggtgc cgggaaactt cacttcaca      480
cacaagaaag taaaacatga aaacttcagc ctctaacct ctggagaagt gggagagttc      540
tgtgtccagg tgaaacatc tgtcgttcc cgaagtaaca aggggatgtg gtctaaagag      600
gagtgcactc cctcaccag gcagtatttc accgtgacca acgtcgacga acagttatat      660
tttcagggcy gctcacccaa atctgcagac aaaactcaca catgccacc gtgccagca      720
cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc      780
atgatctccc ggacccctga ggtcacatgc gtggtgttg acgtgagcca cgaagacct      840
gaggtaagt tcaactggta cgtggacggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccg      900
cgggaggagc agtacaacag cactaccgt gtggtcagcg tcctaccgt cctgaccag      960
gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaagccct cccagcccc      1020
atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg      1080
cccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc      1140
ttctatccca gcgacatgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaaactac      1200
aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tctctacag caagctcacc      1260
gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctcctgat gcatgaggct      1320
ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc cgggtggcgg gtcoggaggc      1380
ctgaacgaca tcttcgaggc cgaagattt gaatggcacg ag      1422
```

<210> 269

<211> 593

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> 28H1 Fab HC-Fc «выступ» (LALA FJ29G)-IL-2 qm (2)

<400> 269

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly^{*}Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly
 435 440 445
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala Ser
 450 455 460
 Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp
 465 470 475 480
 Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu
 485 490 495
 Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu
 500 505 510

Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu
515 520 525

Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp
530 535 540

Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu
545 550 555 560

Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu
565 570 575

Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu
580 585 590

Thr

<210> 270
<211> 1779
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 28H1 Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)-IL-2 qm (2)

<400> 270
gaagtgcagc tgctggaatc cggcggaggc ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60
tcttgccgcg cctcgggctt caccctctcc tcccacgcca tgcctgggt ccgacaggct 120
cctggcaaa gcttggaatg ggtgtccgcc atctgggcct ccggcgagca gtactacgcc 180
gactctgtga agggccgggt caccatctcc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctg 240
cagatgaact cctcggggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgcca gggctggctg 300
ggcaacttcg actactgggg acagggcacc ctggtcaccg tgtccagcg tagcaccaag 360
ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 420
ctgggctgcc tggtaagga ctacttccc gaaccggtga cgtgtctgtg gaactcaggc 480
gccctgacca gcggcgtgca caccctcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 540
ctcagcagcg tggtagccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 600
gtgaatcaca agcccagcaa caccaggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac 660
aaaaactcaca catgccacc gtgccagca cctgaagctg cagggggacc gtcagtcttc 720
cttctcccc caaaaaccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 780
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactgata cgtggacggc 840
gtggagggtc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cactaacgt 900
gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 960
aaggcttcca acaaagccct cggcgcccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1020
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatgcc gggatgagct gaccaagaac 1080
caggtcagcc tgtgtgctt ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1140
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac 1200
ggctccttct tctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaaac 1260
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1320
tccctgtctc cgggtggcgg cggaggctcc ggaggcggag gttctggcgg aggtggctcc 1380
gcacctgcct caagtctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcatctt actgctggat 1440
ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaaactac caggatgctc 1500
acagccaagt ttgcatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 1560
gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatggcgctc aaagcaaaaa ctttcaetta 1620
agaccaggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaaactaaa gggatctgaa 1680
acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 1740
tggattacct ttgccaaaag catcatctca acactgact 1779

<210> 271
<211> 594
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 4B9 Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)-IL-2 qm (2)

<400> 271

034251

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
 145 150 155 160
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
 165 170 175
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 180 185 190
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
 195 200 205
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 210 215 220
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 260 265 270
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly
 435 440 445
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala
 450 455 460
 Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu
 465 470 475 480
 Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys
 485 490 495
 Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys Lys Ala Thr
 500 505 510
 Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu
 515 520 525
 Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg
 530 535 540
 Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser
 545 550 555 560
 Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val
 565 570 575
 Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr
 580 585 590
 Leu Thr

<210> 272
 <211> 1782
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> 4B9 Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)-IL-2 qm (2)

<400> 272
 gaggtgcagc tgctcgaaag cggcggagga ctggtgcagc ctggcggcag cctgaagactg 60
 tcttgcgccg ccagcggcctt cacttcagc agctacgcca tgaagctgggt ccgcacaggcc 120
 cctggcaagg gactggaatg ggtgtccgcc atcatcggtc ctggcgccag cacctactac 180
 gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaajaa cacctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg ggccgaggac accgcctgtt actactgcgc caagggatgg 300
 ttccgcggtc tcaactactg gggacagggc accctggta cagtgtccag cgctagcacc 360
 aagggcccat cgtctctccc cctggcaccc tcttcaaaga gcacctctgg gggcacagcg 420
 gccctggggt gcctggtaaa ggactacttc ccgaaccgg tgaaggtytc gtggaaactca 480
 ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 540
 tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccaac ctacatctgc 600
 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 660
 gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 720
 ttctcttccc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct ccgggacccc tgagggtcaca 780
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 840
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 900
 cgtgtggta cgcctctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960
 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caagccaaa 1020
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat gccgggatga gctgaccaag 1080
 aaccaggta gccctgtgtg cctggtaaaa ggcctctatc ccagcagat cgcctgtgag 1140
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctccgt gctggactcc 1200
 gagcgctcct tcttctctca cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1260
 aacgtctctt catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactaac gcagaagagc 1320
 ctctccctgt ctccgggtgg cggcggaggc tccggaggcg gaggttctgg cggaggtggc 1380

```

tccgcacctg cctcaagttc tacaagaaga acacagctac aactggagca ttactgctg      1440
gatttacaga tgattttgaa tggaattaat aattacaaga atcccaaaact caccaggatg      1500
ctcacagcca agtttgccat gcccaagaag gccacagaac tgaacatct tcagtgtota      1560
gaagaagaac tcaaacctct ggaggaagtg ctaaattggcg ctcaaagcaa aaactttcac      1620
ttaagaccca gggacttaat cagcaatata acgtaataag ttctggaact aaagggatct      1680
gaaacaacat tcatgtgtga atatgtctgat gagacagcaa ccattgtaga atttctgaac      1740
agatggatta cctttgccca aagcatcatc tcaacactga ct                          1782

```

```

<210> 273
<211> 594
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

```

```

<220>
<223> 4B9 Fab HC-Fc «высрын» (LALA P329G)-IL-2 wt

```

```

<400> 273

```

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

```

```

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20          25          30

```

```

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

```

```

Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60

```

```

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

```

```

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

```

```

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100          105          110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115          120          125

```

```

Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130          135          140

```

```

Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145          150          155          160

```

```

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

```

```

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

```

```

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195          200          205

```

```

Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210          215          220

```

```

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225          230          235          240

```

```

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245          250          255

```

```

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260          265          270

```

```

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275          280          285

```

```

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290          295          300

```

```

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305          310          315          320

```

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350
 Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
 355 360 365
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 395 400
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly
 435 440 445
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr
 450 455 460
 Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu
 465 470 475 480
 Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys
 485 490 495
 Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr
 500 505 510
 Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu
 515 520 525
 Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg
 530 535 540
 Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser
 545 550 555 560
 Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val
 565 570 575
 Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr
 580 585 590
 Leu Thr

<210> 274
 <211> 1782
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 4B9 Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)-IL-2 wt

<400> 274
 gaggtgcagc tgctcgaaag cggcggagga ctggtgcagc ctggcggcag cctgagactg 60
 tcttgccgcg ccagcggtt cacccttcage agctacgcca tgagctgggt ccgccaggcc 120
 cctggcaagg gactggaatg ggtgtccgcc atcatcggct ctggcgccag cacctactac 180
 gccgacagcg tgaagggccg gttcaccatc agccgggaca acagcaagaa caccctgtac 240
 ctgcagatga acagcctgcg gcccgaggac accgccgtgt actactgcgc caagggatgg 300
 ttccggcggt tcaactactg gggacagggc accctggtca cagtgtccag cgctagcacc 360
 aagggcccat cgggtcttccc cctggcaccc tctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 420
 gccctgggct gcttggtcaa ggactacttc ccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 480
 ggcgcctga ccagcggtt gcacaccttc ccggtgtcc tacagtctc aggactctac 540
 tccctcagca gcgtggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 600
 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 660

gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaag ctgcaggggg accgtcagtc 720
 ttctcttccc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 780
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggcca agttcaactg gtacgtggac 840
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtaaaa cagcacgtac 900
 cgtgtgttca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 960
 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcggcgcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1020
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat gccgggatga gctgaccaag 1080
 aaccaggtca gcctgtggtg cctgggtcaaa ggctttctat ccagcgacat cgcctgggag 1140
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctccgtg gctggactcc 1200
 gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1260
 aacgtctctt catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1320
 ctctccctgt ctccgggtgg cggcggaggc tccggaggcg gaggttcagg aggcggaggc 1380
 tccgcacctc cttcaagttc tacaagaaa acacagctac aactggagca tttactgctg 1440
 gatttacaga tgattttgaa tggaattaat aattacaaga atcccaactc caccaggatg 1500
 ctccacattt agttttacat gcccaagaag gccacagaac tgaacacatc tcagtgctta 1560
 gaagaagaac tcaaacctct ggaggaagtg ctaaatttag ctcaaagcaa aaactttcac 1620
 ttaagaccca gggacttaat cagcaatata aacgtaatat ttctggaact aaagggatct 1680
 gaaacaacat tcattgtgtg atatgctgat gagacagcaa ccattgtaga atttctgaac 1740
 agatggatta cctttgcccc aagcatcctc tcaacactga ct 1782

<210> 275

<211> 599

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> CH1A1A 98/99 2F1 Fab HC-Fc «выступ» (LALA F329G)-IL-2 qm

<400> 275

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

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

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

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

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

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

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

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 225 230 235 240

 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

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

 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 325 330 335

 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

 Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

 Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

 Pro Gly Lys Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 450 455 460

 Gly Gly Ala Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Cln Leu Cln Leu
 465 470 475 480

 Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn
 485 490 495

 Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met
 500 505 510

 Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu
 515 520 525

 Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe
 530 535 540

 His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu
 545 550 555 560

 Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu
 565 570 575

 Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln
 580 585 590

 Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 595

 <210> 276
 <211> 1797
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> CH1A1A 98/99 2F1 Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)-IL-2 qm

<400> 276
cagggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaagggt 60
tcctgcaagg ccagcggcta caccctcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120
ccaggccagg gctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggcacacctac 180
gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accacggaca ccagcacag caccgcctac 240
atggaactgc ggaacctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgccc cagatgggac 300
ttcgccattt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccacct gacctgtct 360
agcgctagca ccaagggccc aagcgtgttc cctctgccc ccagcagcaa gagcacaagc 420
ggcggaacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgagcc cgtgacagt 480
tcctggaaca gcggagccct gaccagcggc gtgcacacct ttccagccgt gctgcagagc 540
agcggccctgt acagcctgag cagcgtggtc acagtgccta gcagcagcct gggcaccag 600
acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660
cccaagagct gcgacaagac ccacacctgt ccccttgctc ctgcccctga gctgctgggc 720
ggaccacagc tgttccctgtt cccccaaaag cccaaggaca cctgatgat cagccggacc 780
ccggaagtga cctgcgtggt ggtggacgtg tcccacgagg accctgaagt gaagttcaat 840
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcacaat gccaaacca agccccggga ggaacagtac 900
aacagcacct accgggtggt gtccgtgctg accgtgtgc accaggactg gctgaacggc 960
aaagagtaca agtgcaaggt ctccaacaag gccctgcctg ccccatcga gaaaaccatc 1020
agcaaggcca agggccagcc cagagaaccc caggtgtaca cctgccccc ctgcagagat 1080
gagctgacca agaaccaggt gtccctgtgg tgtctgttca agggcttcta cccacagcat 1140
atcgccgtgg agtgggagag caacggccag cctgagaaca actacaagac cccccccct 1200
gtgctggaca gcgacggcag ctcttctctg tactccaaac tgaccgtgga caagagccgg 1260
tggcagcagg gcaacgtgtt cagctgcagc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac 1320
accagaagt cctgagcct gagccccggc aagtcggag gcggaggctc cggcgccgga 1380
ggttctggcg gaggtggcgc tctgcctcc tccagacca agaaaaccca gctccagctg 1440
gaacatctcc tgctggatct gcagatgac ctgaacggca tcaacaacta caagaacccc 1500
aagctgaccc gtagctgac cgccaagttc gccatgccc agaaggccac cgagctgaaa 1560
catctgcagt gctggaaga ggaactgaag cctctggaag aggtgctgaa cggcgccccg 1620
tccaagaact tccacctgag gcctcgggac ctgacttcca acatcaacgt gatcgtgctg 1680
gaactgaagg gctccgagac aaccttcattg tgcgagtacg ccgacgagac agctaccatc 1740
gtggaatttc tgaaccgggtg gatcaccttc gcccaagtcca tcatctccac cctgacc 1797

<210> 277
<211> 598
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CH1A1A 98/99 2F1 Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)-IL-2 qm (2)

<400> 277

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

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

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300

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

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 450 455 460

Ser Ala Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
 465 470 475 480

His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
 485 490 495

Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro
 500 505 510

Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
 515 520 525

Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
 530 535 540

Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
 545 550 555 560

Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
 565 570 575

Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
 580 585 590

Ile Ile Ser Thr Leu Thr
 595

<210> 278
 <211> 1794
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CH1A1A 98/99 2F1 Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)-IL-2 qm (2)

<400> 278
 cagggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaaggcg 60
 tcttgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120
 ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180
 gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240
 atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgcctgt actactgcgc cagatgggac 300
 ttgcctatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gccaccogt gaccgtgtct 360
 agcgctagca ccaagggccc atcgtctctc cccctggcac cctctccaa gagcacctct 420
 gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tcccgaacc ggtgacggtg 480
 tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tccggctgt cctacagtc 540
 tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcacccag 600
 acctacatct gcaactgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660
 cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccggtcc cagcacctga agctgcaggg 720
 ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat etcccggaac 780
 cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccaagaag accctgaggt caagttcaac 840
 tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac 900
 aacagcacgt accgtgtggt cagcgtctct accgtctgc accaggactg gctgaatggc 960
 aaggagtaca agtgcgaagg ctccaacaaa gccctcggcg ccccatcga gaaaaccatc 1020
 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca cagggtgaca cctgcccsc atgccgggat 1080
 gagctgacca agaaccaggt cagcctgtgg tgctgtgtca aaggcttcta tccagcgac 1140
 atgcctgtg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1200
 gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggcctcga caaccactac 1320
 acgcagaaga gccctccct gtctccgggt ggcggcggag gctccggaag cggaggttct 1380
 ggccgagggt gctccgcacc tgccctcaagt tctacaaaga aaacacagct acaactggag 1440
 catttactgc tggatttaca gatgatttg aatggaatta ataattacaa gaatcccaa 1500
 ctcaccagga tgctcacagc caagtttgcc atgcccaaga aggccacaga actgaaacat 1560
 cttcagtgtc tagaagaaga actcaaacct ctggaggaag tgctaatagg cgctcaaagc 1620
 aaaaactttc acttaagacc cagggactta atcagcaata tcaacgtaat agttctggaa 1680
 ctaaaaggat ctgaaacaac attcatgtgt gaatatgctg atgagacagc aaccattgta 1740
 gaatttctga acagatggat tacctttgcc caaagcatca tctcaacact gact 1794

<210> 279
 <211> 598
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CH1A1A 98/99 2F1 Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)-IL-2 wt

<400> 279

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

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

034251

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

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

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

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

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195 200 205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225 230 235 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

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

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340 345 350

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
450 455 460

Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
465 470 475 480

His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
485 490 495

Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro
500 505 510

Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Leu
515 520 525

Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
530 535 540

Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
545 550 555 560

Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
565 570 575

Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
580 585 590

Ile Ile Ser Thr Leu Thr
595

<210> 280
<211> 1794
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CH1A1A 98/99 2F1 Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)-IL-2 wt

<400> 280
cagggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaagggt 60
tcctgcaagg ccagcggcta cacttcaacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct 120
ccaggccagg gctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga gggcacctac 180
gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accacggaca ccagcaccag caccgectac 240
atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgсgc cagatgggac 300
ttcgcttatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccacgt gaccgtgtct 360
agcgctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctcзаа gagcacctct 420
gggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480
tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggtgt cctacagtcc 540
tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcaccag 600
acctacatct gcaactgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttag 660
cccaaatctt gtgacaaac tcacacatgc ccacgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720
ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccggacc 780
cctgaggtca catgctggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agcccgaggа ggagcagtac 900
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcttc accgtctctc accaggactg gctgaatggc 960
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctggcg ccccatcga gaaaaccatc 1020
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca cagggtgtaca cctgcccc atgccgggat 1080
gagctgacca agaaccaggt cagcctgtgg tgctgtgtca aaggcttcta tccagcgac 1140
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac caccctccc 1200
gtgctggact ccgacggctc ctcttctctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtctctga caaccactac 1320
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt ggcgcgagg gctccggagg cggaggttct 1380
ggaggcgagg gctccgcacc tacttcaagt tctacaaga aaacacagct acaactggag 1440
catttactgc tggatttaca gatgatttg aatgaatta ataattacaa gaatcccaa 1500
ctcaccagga tgctcacatt taagttttac atgccaaga aggccacaga actgaacat 1560
cttcagtgtc tagaagaaga actcaaacct ctggaggaag tgctaaattt agctcaaaac 1620

```

aaaaactttc acttaagacc cagggactta atcagcaata tcaacgtaat agttctggaa      1680
ctaaagggat ctgaacaac attcatgtgt gaatatgctg atgagacagc aaccttgta      1740
gaattttctga acagatggat tacctttgcc caaagcatca tctcaacsct gact      1794

<210> 281
<211> 451
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CH1A1A 98/99 2F1 Fab HC-Fc «впадина» (LALA P329G)

<400> 281

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

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

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35          40          45

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

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95

Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100         105         110

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

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130         135         140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
145         150         155         160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165         170         175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180         185         190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195         200         205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210         215         220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225         230         235         240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245         250         255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260         265         270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275         280         285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290         295         300

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

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
325         330         335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340         345         350

```

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355 360 365

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445

Pro Gly Lys
450

<210> 282
<211> 1353
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CH1A1A 98/99 2F1 Fab HC-Fc «впадина» (LALA P329G)

<400> 282
caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaac ctggagctag tgtgaaggtg 60
tcttgcaagg ccagcggtc cacttcacc gagtcggca tgaactgggt ccgacaggtc 120
ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac 180
gtggaagagt tcaagggcag agtgacctc accacggaca ccagcaccag caccgcctac 240
atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac 300
ttcgctatt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccacgt gacgtgtct 360
agcgctagca ccaagggccc ctccgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420
ggcggcacag ccgctctggg ctgcctggtc aaggactact tcccgaagcc cgtgaccgtg 480
tcctggaaac gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tcccgcctgt gctgcagagt 540
tctggcctgt atagcctgag cagcgtggtc accgtgcctt ctagcagcct gggcaccag 600
acctacatct gcaacgtgaa ccaacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660
cccaagagct gcgacaaaaa tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720
ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccgacc 780
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840
tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac 900
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcttc accgtctctc accaggactg gctgaatggc 960
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg ccccatcga gaaaccato 1020
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca cctgcccc atccgggat 1080
gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tccagcgac 1140
atgcctgtgg agtgggagag caatgggag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1200
gtgctggact ccgacggctc ctctctctc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatcatg aggcctctgca caaccactac 1320
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 283
<211> 215
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> CH1A1A 98/99 2F1 Fab LC

<400> 283

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

	35		40		45	
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	50		55		60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	65		70		75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu	85		90		95	
Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala	100		105		110	
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser	115		120		125	
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu	130		135		140	
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser	145		150		155	160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu	165		170		175	
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val	180		185		190	
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys	195		200		205	
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	210		215			
<210> 284						
<211> 645						
<212> ДНК						
<213> Искусственная последовательность						
<220>						
<223> CH1A1A 98/99 2F1 Fab LC						
<400> 284						
gatatccaga tgaccacagtc tccatccctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagagtcacc					60	
atcacttgca aggccagtgcc ggctgtgggt acgtatgttg cgtgggtatca gcagaaacca					120	
gggaaagcac ctaagctcct gatctattcg gcatccctacc gcaaaagggg agtcccatca					180	
aggttcagtg gcagtggtac tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag tctgcaacct					240	
gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cactgtttggc					300	
cagggcacca agctcgagat caagcgtaag gtggctgcac catctgttt catcttcccg					360	
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc					420	
tatccagag aggccaaaagt acagtggaag gtggataacg cctccaatc gggtaactcc					480	
caggagagtg tcacagagca ggcagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacccctg					540	
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag					600	
ggcctgagct cgcccgctac aaagagcttc aacaggggag agtgt					645	
<210> 285						
<211> 598						
<212> PRT						
<213> Искусственная последовательность						
<220>						
<223> 2B10 Fab HC-Fc «выступ» (LALA F329G)-IL-2 qm						
<400> 285						
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser	1	5	10	15		
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr	20		25	30		
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met	35		40	45		
Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe	50		55	60		

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Tyr Gly Tyr Ala Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 130 135 140
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 145 150 155 160
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 165 170 175
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 180 185 190
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 195 200 205
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215 220
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 225 230 235 240
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 260 265 270
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 275 280 285
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 290 295 300
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 305 310 315 320
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
 325 330 335
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 340 345 350
 Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 355 360 365
 Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 370 375 380
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445
 Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 450 455 460
 Ser Ala Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu
 465 470 475 480

His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr
485 490 495

Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro
500 505 510

Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
515 520 525

Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
530 535 540

Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
545 550 555 560

Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
565 570 575

Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser
580 585 590

Ile Ile Ser Thr Leu Thr
595

<210> 286
<211> 1794
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2B10 Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)-IL-2 qm

<400> 286
caggtgcaat tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggaggg atcatcccta tctttggtac agcaaaactac 180
gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgccgtgt attactgtgc gagactgtac 300
ggttacgctt actacgggtgc ttltgactac tggggccaag ggaccaccgt gaccgtctcc 360
tcagctagca ccaagggccc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct 420
ggggggcacag cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 480
tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 540
tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcaccacg 600
acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag 660
cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720
ggaccgtcag tcttctcttt cccccaaaa cccaaggaca cctcctatgat ctcccggacc 780
cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac 900
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcttc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 960
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg cccccatcga gaaaaccatc 1020
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca cctgcccccc atgccgggat 1080
gagctgacca agaaccaggt cagcctgtgg tgcttggtca aaggcttcta tcccagcgac 1140
atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagccctccc 1200
gtgctggact ccgacggctc etttctcttc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260
tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtctctga caaccactac 1320
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt ggcggcggag gctccggagg cggaggttct 1380
ggcggagggt gctccgcacc tgcccaagt tctacaaga aaacacagct acaactggag 1440
catttactgc tggatttaca gatgattttg aatggaatta ataattacaa gaatcccaa 1500
ctcaccagga tgctcacagc caagtttgcc atgcccaaga aggccacaga actgaaacat 1560
cttcagtgtc tagaagaaga actcaaacct ctggaggaag tgctaaatgg cgctcaaaagc 1620
aaaaactttc acttaagacc cagggaactta atcagcaata tcaacgtaat agttcttgaa 1680
ctaaagggat ctgaacaac attcatgtgt gaatatgctg atgagacagc aaccattgta 1740
gaattttctga acagatggat tacctttgcc caaagcatca tctcaacact gact 1794

<210> 287

034251

```
<211> 451
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> 2B10 Fab HC-Fc «владина» (LALA F329G)

<400> 287

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20          25          30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35          40          45

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85          90          95

Ala Arg Leu Tyr Gly Tyr Ala Tyr Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
100         105         110

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

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

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

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
165         170         175
Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
180         185         190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
195         200         205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
210         215         220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly
225         230         235         240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245         250         255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
260         265         270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
275         280         285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290         295         300

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

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
325         330         335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
340         345         350

Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
355         360         365

Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
370         375         380
```

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val
 405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 435 440 445

Pro Gly Lys
 450

<210> 288
 <211> 1353
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> 2B10 Fab HC-Fc «впадина» (LALA P329G)

<400> 288
 caggtgcaat tgggtcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cctccggagg cacattcagc agctacgcta taagctgggt gcgacaggcc 120
 cctggacaag ggctcgaagt gatgggaggg atcatcccta tctttggcac agcaaaactac 180
 gcacagaagt tccagggcag ggtcaccatt actgcagaca aatccacgag cacagcctac 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac accgcctgtt attactgtgc gagactgtac 300
 ggttacgctt actacgggtc ttttgactac tggggccaag ggaccacgt gaccgtctcc 360
 tcagctagca ccaagggccc ctccgtgttc cccctggccc ccagcagcaa gagcaccagc 420
 ggcggcacag ccgctctggg ctgcctggtc aaggactact tcccagagcc cgtgaccgtg 480
 tcctggaaca gcggagccct gacctccggc gtgcacacct tcccgcctgt gctgcagagt 540
 tctggcctgt atagcctgag cagcgtggtc accgtgcctt ctacagcctt gggcaccag 600
 acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaggtggag 660
 cccaagagct gcgacaaaa tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga agctgcaggg 720
 ggaccgctcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccggacc 780
 cctgaggtca catgcctggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 840
 tggtagctg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtac 900
 aacagacagt accgtgtggt cagcgtcttc accgtctctc accaggactg gctgaatggc 960
 aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcggcg ccccatcga gaaaaccatc 1020
 tccaagacca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtgca cctgcctccc atcccgggat 1080
 gagctgacca agaaccaggt cagcctctcg tgcgcagtca aaggcttcta tcccagcgac 1140
 atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1200
 gtgctggact ccgacggctc ctctctctc gtgagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1260
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggcctctga caaccactac 1320
 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 1353

<210> 289
 <211> 592
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> DP47GS Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)-IL-2 qm

<400> 289

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

034251

```

65             70             75             80

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

Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
      100            105            110

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
      130            135            140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
      145            150            155            160

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

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

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
      195            200            205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
      210            215            220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
      225            230            235            240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
      245            250            255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
      260            265            270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
      275            280            285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
      290            295            300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
      305            310            315            320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
      325            330            335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys
      340            345            350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys
      355            360            365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
      370            375            380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
      385            390            395            400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
      405            410            415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
      420            425            430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly
      435            440            445

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala Ser Ser
      450            455            460

Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu
      465            470            475            480

Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr
```

	485		490		495
Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu					
	500		505		510
Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val					
	515		520		525
Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu					
	530		535		540
Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr					
545		550		555	560
Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe					
	565		570		575
Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr					
	580		585		590
<210>	290				
<211>	1776				
<212>	ДНК				
<213>	Искусственная последовательность				
<220>					
<223>	DP47GS Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)-IL-2 qm				
<400>	290				
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc					60
tcctgtgcag cctccggatt cacccttagc agttatgccg tgagctgggt ccgccaggct					120
ccaggggaagg ggtcgaagtg ggtctcagct attagtggta gtgtgtgtag cacatactac					180
gcagactccg tgaaggggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat					240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc					300
ggatttgact actggggcca aggaacctgt gtcaccgtct cgagtgtctag caccaagggc					360
ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg					420
ggctgccttg tcaaggacta cttccccgaa cgggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc					480
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccgct gtcctacagt cctcaggact ctactccctc					540
agcagcgttg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg					600
aatcacaaag ccagcaaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaatc ttgtgacaaa					660
actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcttc					720
ttccccccaa aaccgaagga caccctcatg atctccggga cccctgaggt cacatgcgtg					780
gtggtggacg tgagccaagc agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg					840
gaggtgcata atgccaaagc aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg					900
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcag					960
gtctccaaca aagccctcgg gcgccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaaggcgag					1020
ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatgccggg atgagctgac caagaaccag					1080
gtcagcctgt ggtgcctggt caaaggcttc tatccacgag acatcgccgt ggagtgggag					1140
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgtctga ctccgacggc					1200
tccttcttcc tctacagcaa gctcacctg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc					1260
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagctcttcc					1320
ctgtctccgg gtggcgcgcg aggtccggga ggcggaggtt ctggcggagg tggctccgca					1380
cctgcctcaa gttctacaaa gaaaacacag ctacaactgg agcatttact gctggattta					1440
cagatgattt tgaatggaat taataattac aagaatccca aactcaccag gatgtcaca					1500
gccaaagtttg ccatgcccaa gaaggccaca gaactgaaac atcttcagtg tctagaagaa					1560
gaactcaaac ctctggagga agtgctaaat ggcgtcaaa gcaaaaaact tcacttaaga					1620
cccagggact taatcagcaa tatcaacgta atagttctgg aactaaaggg atctgaaaca					1680
acattcatgt gtgaatatgc tgatgagaca gcaaccattg tagaatttct gaacagatgg					1740
attacctttg cccaaagcat catctcaaca ctgact					1776
<210>	291				
<211>	592				
<212>	PRT				
<213>	Искусственная последовательность				
<220>					
<223>	DP47GS Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)-IL-2 wt (2)				

034251

<400> 291

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

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

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

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys
340 345 350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln

034251

405	410	415
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn		
420	425	430
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly		
435	440	445
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr Ser Ser		
450	455	460
Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu		
465	470	475
480		
Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr		
485	490	495
Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu		
500	505	510
Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val		
515	520	525
Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu		
530	535	540
Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr		
545	550	555
560		
Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe		
565	570	575
Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr		
580	585	590
<210> 292		
<211> 1776		
<212> ДНК		
<213> Искусственная последовательность		
<220>		
<223> DP47GS Fab HC-Fc «выступ» (LALA P329G)-IL-2 wt (2)		
<400> 292		
gaggtgcaat tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc	60	
tcctgtgcag cctccggatt caccttiage agttatgccg tgagctgggt ccgccaggct	120	
ccagggaagg ggcaggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac	180	
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240	
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc	300	
ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagtgtcag caccaagggc	360	
ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggac agcggccctg	420	
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgctcgtgaa ctcaggcgcc	480	
ctgaccagcg gcgtgcacac cttcccggtc gtcctacagt cctcaggact ctactccctc	540	
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg	600	
aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagttg agcccaaatc ttgtgacaaa	660	
actcacacat gccacccgtg cccagcacct gaagctgcag ggggaccgtc agtcttcctc	720	
ttcccccaa aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg	780	
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagtcca actggtacct ggaaggcggtg	840	
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg	900	
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtcaag	960	
gtctccaaca aagccctcgg cgcctccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag	1020	
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatgccggg atgagctgac caagaaccag	1080	
gtcagcctgt ggtgcctggt caaaggcttc tatccacagc acatcgccgt ggagtgggag	1140	
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctyga ctccagcggc	1200	
tcctttctcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc	1260	
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc	1320	
ctgtctccgg gtggcggcgg aggtctccga ggcggagggt ctggaggcgg aggtctccga	1380	
cctacttcaa gttctacaaa gaaaacacag ctacaactgg agcatttact gctggattta	1440	

cagatgattt tgaatggaat taataattac aagaatccca aactcaccag gatgctcaca 1500
 tttaagtttt acatgcccaa gaaggccaca gaactgaaac atcttcagtg tctagaagaa 1560
 gaactcaaac ctctggagga agtgctaaat ttagctcaaa gcaaaaactt tcacttaaga 1620
 cccagggaact taatcagcaa tatcaacgta atagtctgg aactaaagg atctgaaaca 1680
 acattcatgt gtgaatatgc tgatgagaca gcaaccattg tagaatttct gaacagatgg 1740
 attacctttg cccaaagcat catctcaaca ctgact 1776

<210> 293
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CH1A1A 98/99 2F1; VL

<400> 293

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Lys Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 294
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CH1A1A 98/99 2F1; VL

<400> 294
 gatatccaga tgaccacgtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtgggaga cagaatcacc 60
 atcacttgca aggccagtgc ggctgtgggt acgtatgttg cgtgggtatca gcagaaacca 120
 gggaagcac ctaagctcct gatctattcg gcatcctacc gcaaaagggg agtcccatca 180
 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcaacttca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatttcg caacttacta ctgtcaccaa tattacacct atcctctatt cacgtttggc 300
 cagggcacca agctcgagat caag 324

<210> 295
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> CH1A1A 98/99 2F1; VH

<400> 295

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

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

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

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

Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

	85	90	95
Ala Arg Trp Asp Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ala Met Asp Tyr Trp Gly			
	100	105	110
Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	
<210> 296			
<211> 363			
<212> ДНК			
<213> Искусственная последовательность			
<220>			
<223> CH1A1A 98/99 2F1; VH			
<400> 296			
caggtgcagc tgggtgcagtc tggcgccgaa gtgaagaaac ctggagctag tgtgaaggtg	60		
tcctgcaagg ccagcggcta caccttcacc gagttcggca tgaactgggt ccgacaggct	120		
ccaggccagg gcctcgaatg gatgggctgg atcaacacca agaccggcga ggccacctac	180		
gtggaagagt tcaagggcag agtgaccttc accacggaca ccagcaccag caccgcctac	240		
atggaactgc ggagcctgag aagcgacgac accgccgtgt actactgcgc cagatgggac	300		
ttcgccattt acgtggaagc catggactac tggggccagg gcaccaccgt gaccgtgtct	360		
agc	363		
<210> 297			
<211> 108			
<212> PRT			
<213> Искусственная последовательность			
<220>			
<223> DP47GS VL			
<400> 297			
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
1 5 10 15			
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser			
20 25 30			
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu			
35 40 45			
Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser			
50 55 60			
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu			
65 70 75 80			
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro			
85 90 95			
Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
100 105			
<210> 298			
<211> 324			
<212> ДНК			
<213> Искусственная последовательность			
<220>			
<223> DP47GS VL			
<400> 298			
gaaatcgtgt taacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc	60		
ctctcttgca gggccagtca gagtggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa	120		
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggagcatcca gcagggccac tggcatccca	180		
gacaggttca gtggcagtgg atccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag	240		
cctgaagatt ttgcagtgtt ttactgtcag cagtatggta gctcaccgct gacgttcggc	300		
caggggacca aagtggaaat caaa	324		
<210> 299			
<211> 115			
<212> PRT			
<213> Искусственная последовательность			
<220>			
<223> DP47GS VH			
<400> 299			

```

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20          25          30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35          40          45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65          70          75          80

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

Ala Lys Gly Ser Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100         105         110

Val Ser Ser
115

<210> 300
<211> 345
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> DP47GS VH

<400> 300
gaggtgcaat tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc      60
tctgtgcag cctcgggatt cacctttagc agttatgccca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccagggaagg ggcctggagt ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaaggggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtgat      240
ctgcagatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaaggcagc      300
ggatttgact actggggcca aggaaccctg gtcaccgtct cgagt                      345

```

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула иммуноглобулина класса IgG₁, содержащая последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 299 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 297 и человеческий Fc-домен IgG₁.

2. Конъюгат, содержащий молекулу иммуноглобулина по п.1 и эффекторный фрагмент, где указанный эффекторный фрагмент представляет собой цитокин, и в котором присутствует не более одного эффекторного фрагмента.

3. Конъюгат по п.2, где указанный цитокин слит с карбоксиконцевой аминокислотой одной из тяжелых цепей иммуноглобулина через пептидный линкер.

4. Конъюгат по п.3, где указанная молекула иммуноглобулина в Fc-доме содержит модификацию типа "выступ-впадина", включающую модификацию типа "выступ" в одной из субъединиц Fc-домена, и модификацию типа "впадина" в другой субъединице Fc-домена.

5. Конъюгат по п.4, где модификация типа "выступ" включает аминокислотную замену T366W, и где модификация типа "впадина" включает аминокислотные замены T366S, L368A и Y407V (нумерация EU).

6. Конъюгат по п.5, где субъединица Fc-домена, содержащая модификацию типа "выступ", дополнительно содержит аминокислотную замену S354C, и субъединица Fc-домена, содержащая модификацию типа "впадина", дополнительно содержит аминокислотную замену Y349C (нумерация EU).

7. Конъюгат по любому из пп.4-6, где указанный цитокин слит с амино- или карбоксиконцевой аминокислотой субъединицы Fc-домена, содержащего модификацию типа "выступ".

8. Конъюгат по любому из пп.2-7, где указанный иммуноглобулин в Fc-доме содержит аминокислотные замены L234A, L235A и P329G (нумерация EU) в каждой из его субъединиц.

9. Конъюгат по любому из пп.2-8, в котором указанный цитокин представляет собой интерлейкин-2 (IL-2).

10. Конъюгат по любому из пп.2-9, в котором указанный цитокин представляет собой полипептид мутантного человеческого интерлейкина-2 (IL-2), содержащий аминокислотные замены F42A, Y45A, L72G (нумерация соответствует последовательности человеческого IL-2 SEQ ID NO: 2).

11. Конъюгат по п.10, где указанный полипептид мутантного человеческого интерлейкина-2 (IL-2) дополнительно содержит аминокислотную замену T3A.

12. Конъюгат по п.10 или 11, где указанный полипептид мутантного человеческого интерлейкина-2

(IL-2) дополнительно содержит аминокислотную замену C125A.

13. Конъюгат по любому из пп.10-12, где указанный полипептид мутантного человеческого интерлейкина-2 (IL-2) содержит полипептидную последовательность SEQ ID NO: 3.

14. Выделенный полинуклеотид, кодирующий молекулу иммуноглобулина по п.1.

15. Выделенный полинуклеотид, кодирующий конъюгат по любому из пп.2-13.

16. Клетка-хозяин, содержащая выделенный полинуклеотид по п.14.

17. Клетка-хозяин, содержащая выделенный полинуклеотид по п.15.

18. Способ получения молекулы иммуноглобулина, включающий культивирование клетки-хозяина по п.16 в условиях, пригодных для экспрессии молекулы иммуноглобулина.

19. Способ по п.18, при котором дополнительно осуществляют выделение молекулы иммуноглобулина.

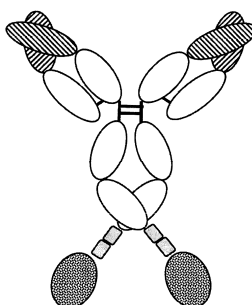
20. Молекула иммуноглобулина, полученная способом по любому из пп.18, 19.

21. Способ получения конъюгата, содержащего молекулу иммуноглобулина и цитокин, включающий культивирование клетки-хозяина по п.17 в условиях, пригодных для экспрессии конъюгата.

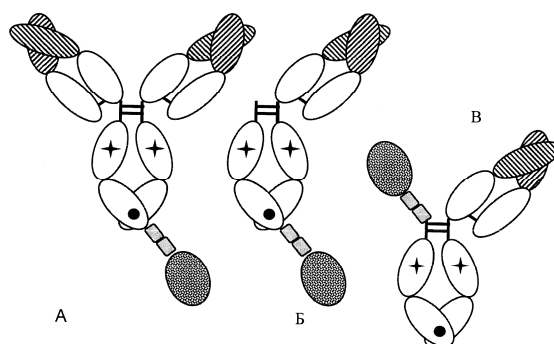
22. Способ по п.21, при котором дополнительно осуществляют выделение конъюгата.

23. Конъюгат, содержащий молекулу иммуноглобулина и цитокин, полученный способом по п.22.

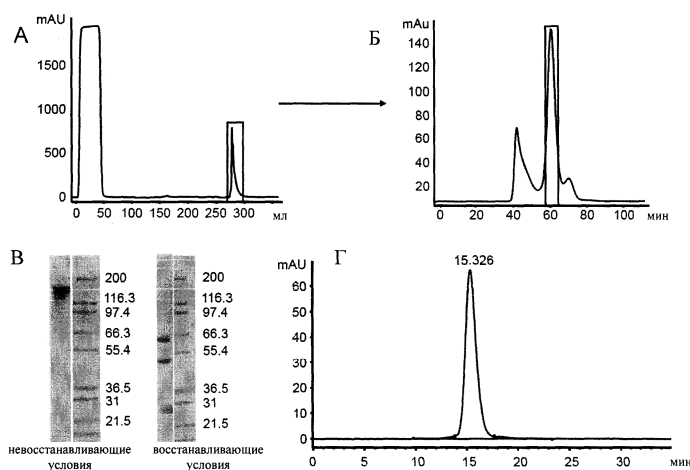
24. Фармацевтическая композиция для лечения рака или воспалительного заболевания, содержащая молекулу иммуноглобулина по п.1 или 20 или конъюгат по одному из пп.2-13 и 23 и фармацевтически приемлемый носитель.



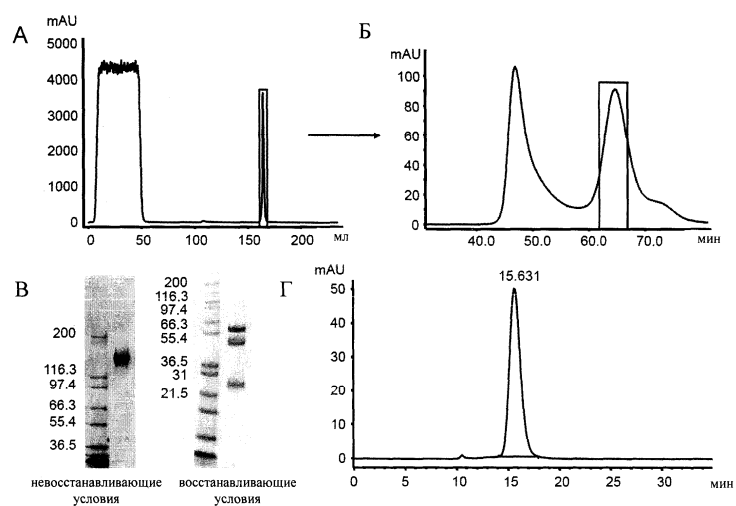
Фиг. 1



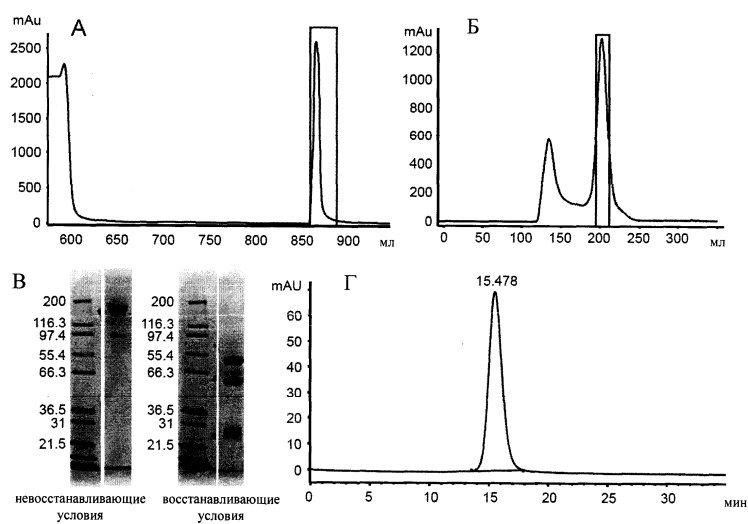
Фиг. 2



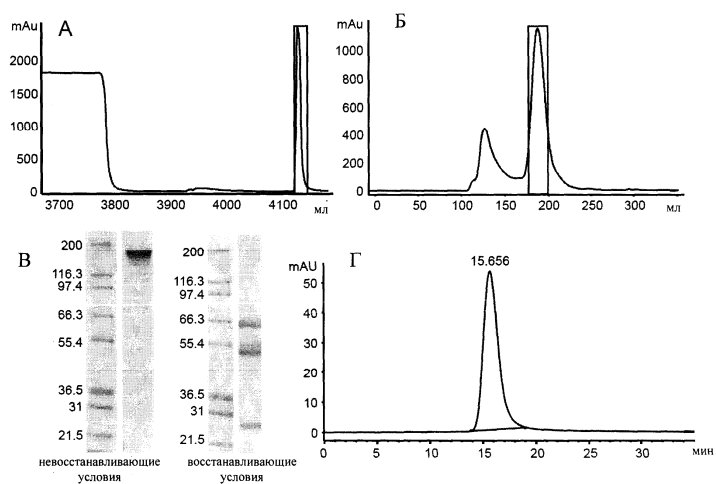
Фиг. 3



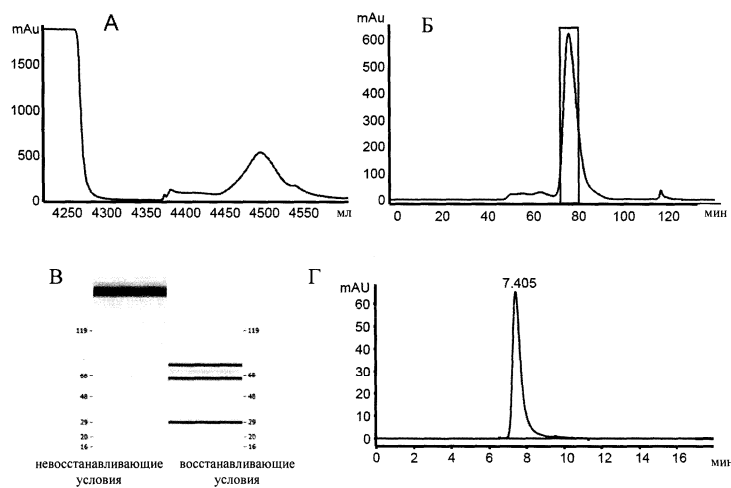
Фиг. 4



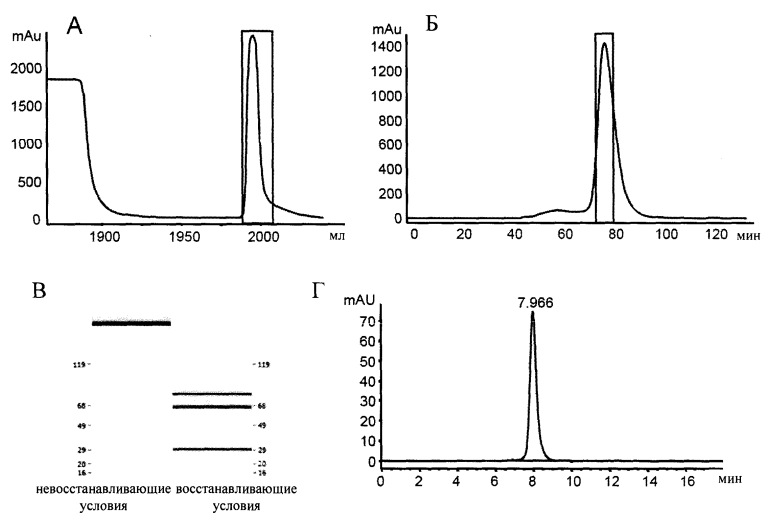
Фиг. 5



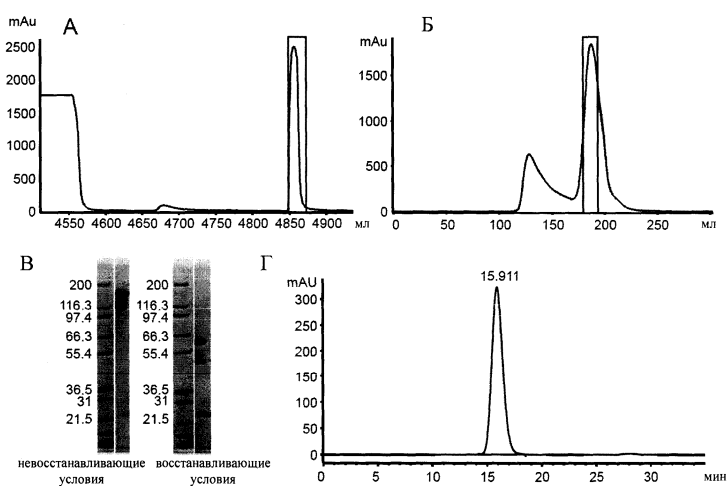
Фиг. 6



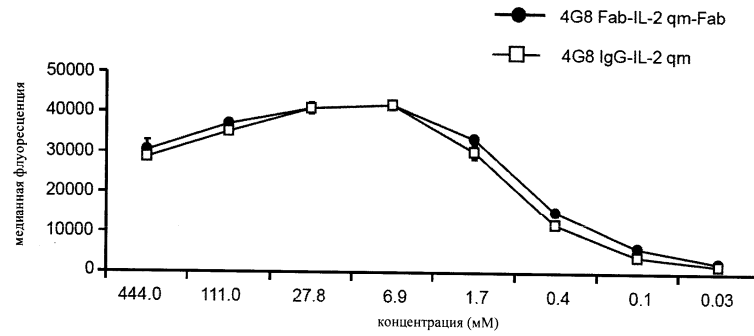
Фиг. 7



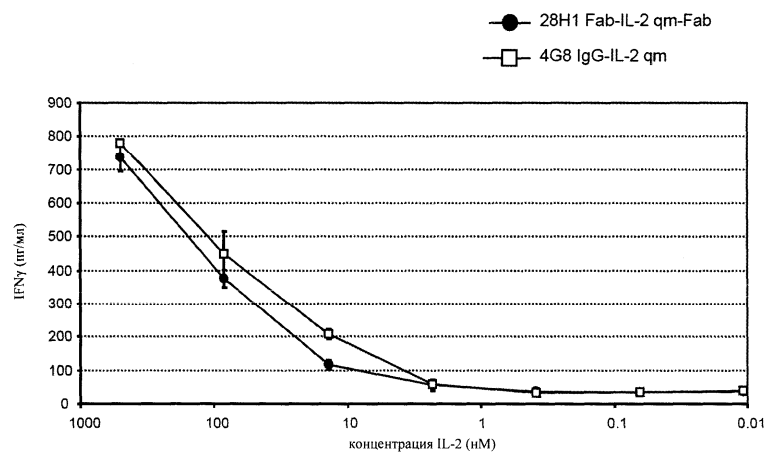
Фиг. 8



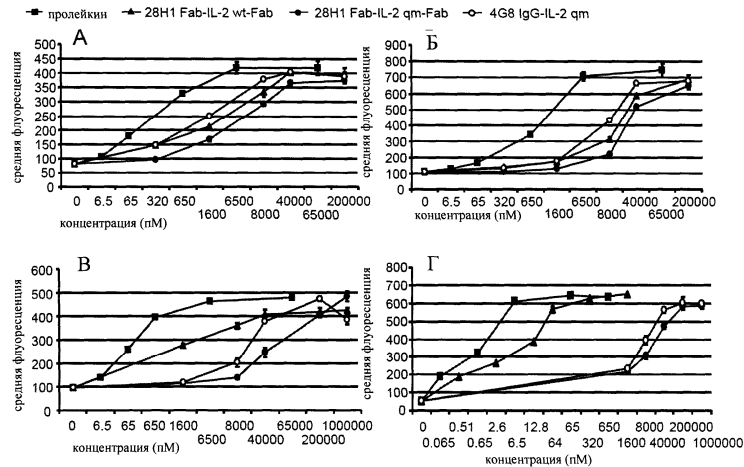
Фиг. 9



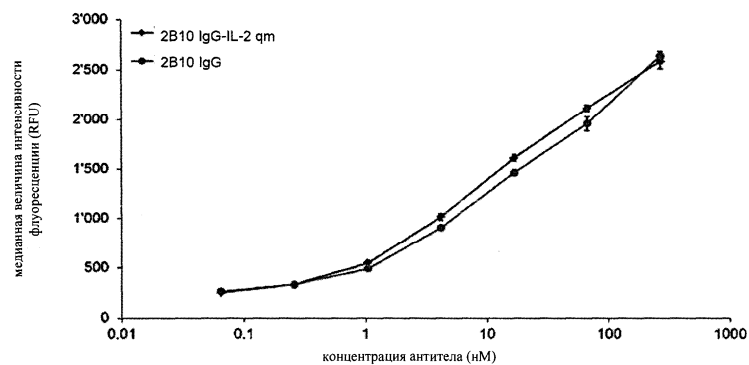
Фиг. 10



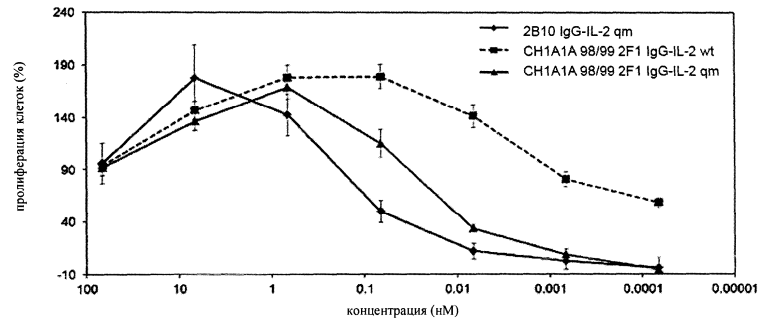
Фиг. 11



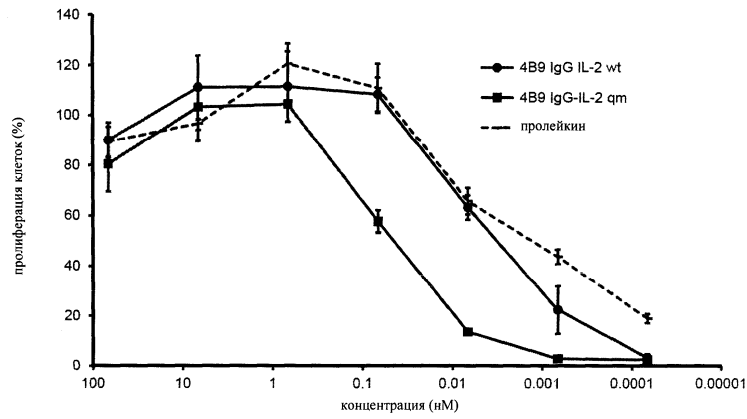
Фиг. 12



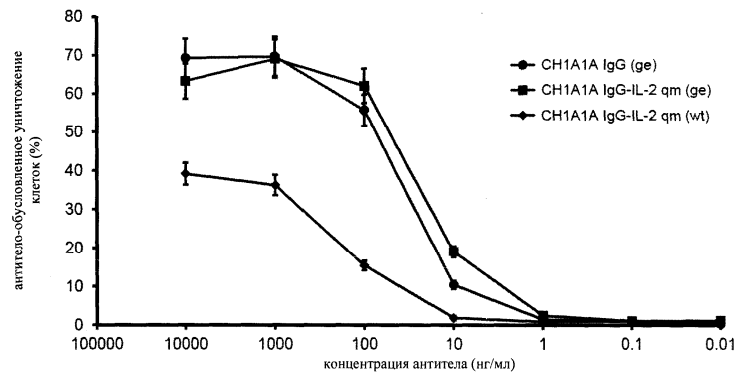
Фиг. 13



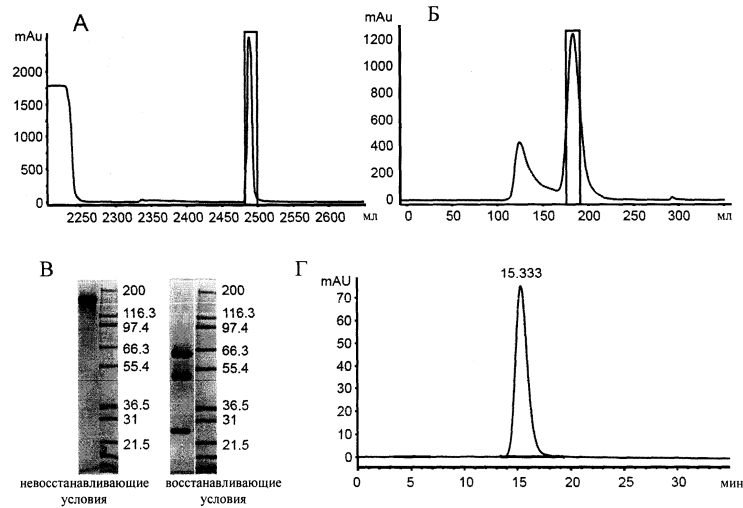
Фиг. 14



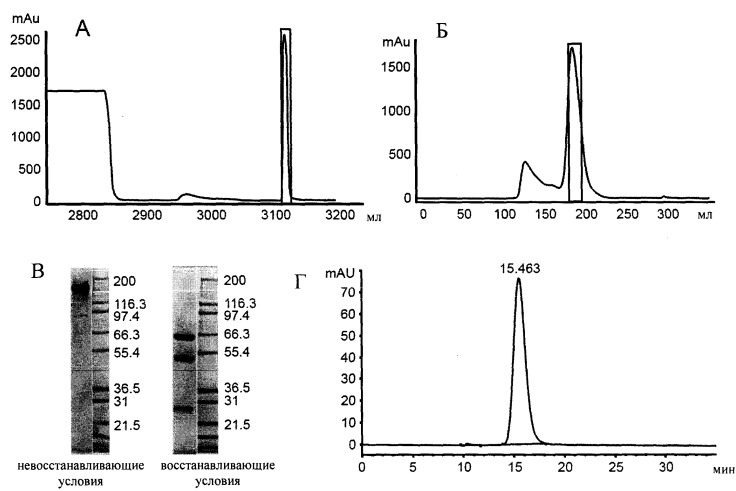
Фиг. 15



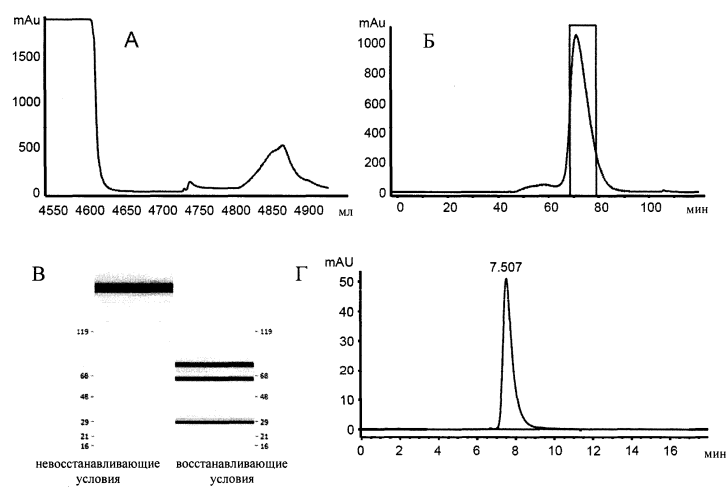
Фиг. 16



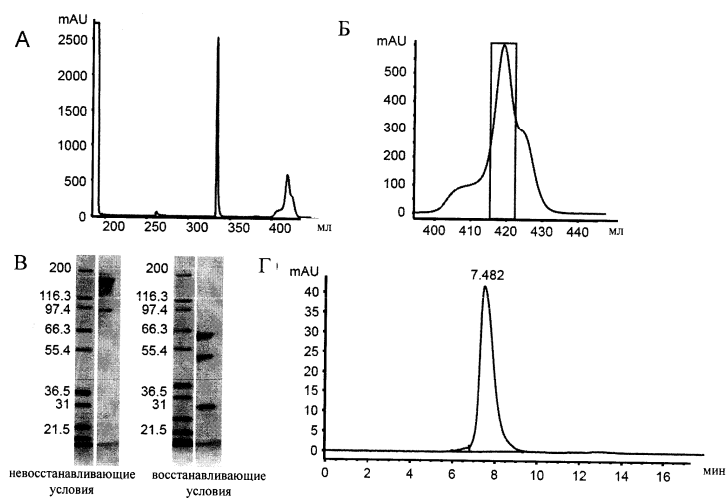
Фиг. 17



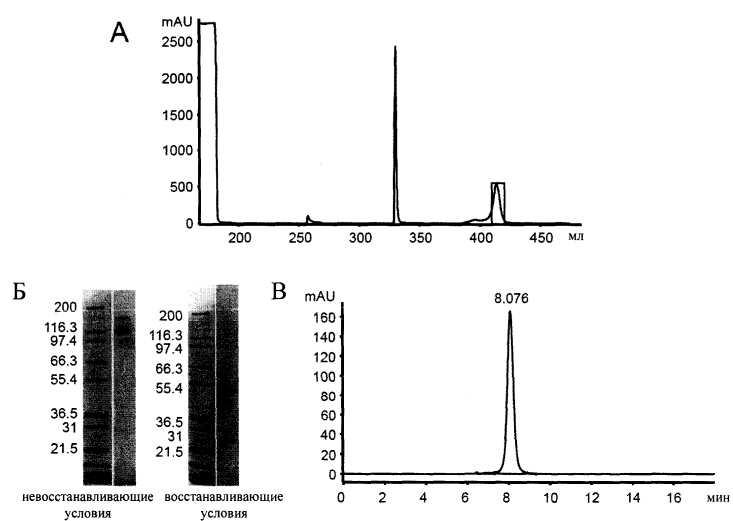
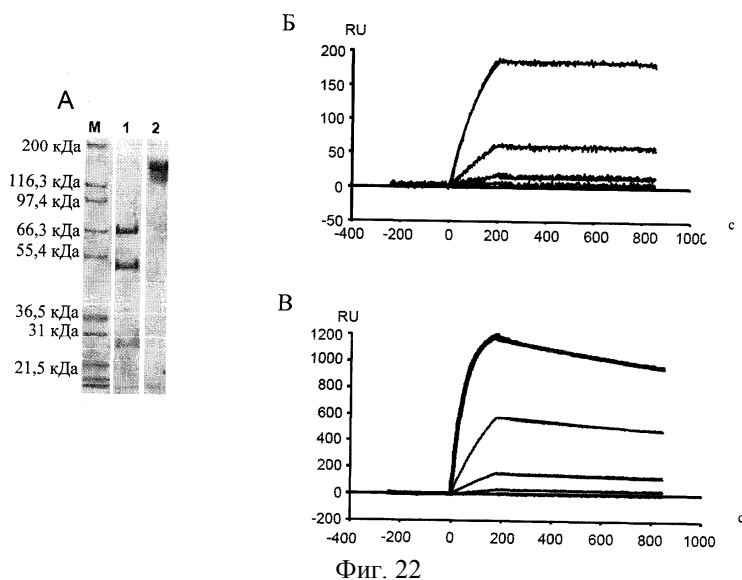
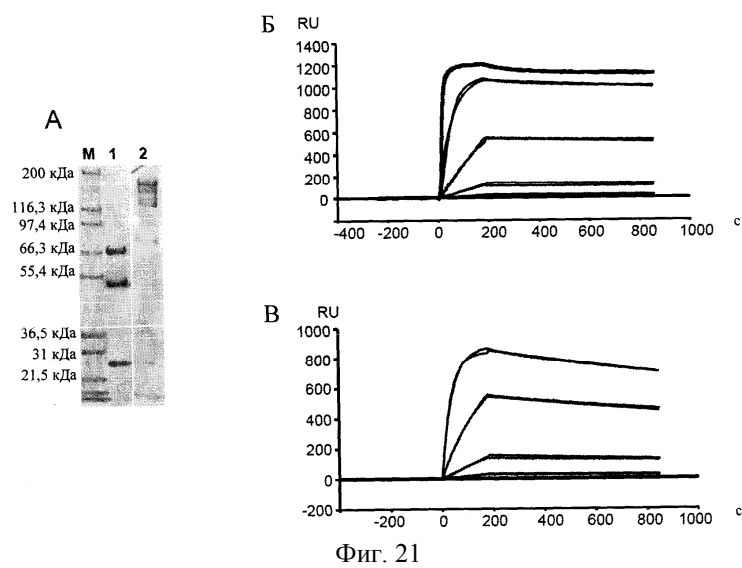
Фиг. 18



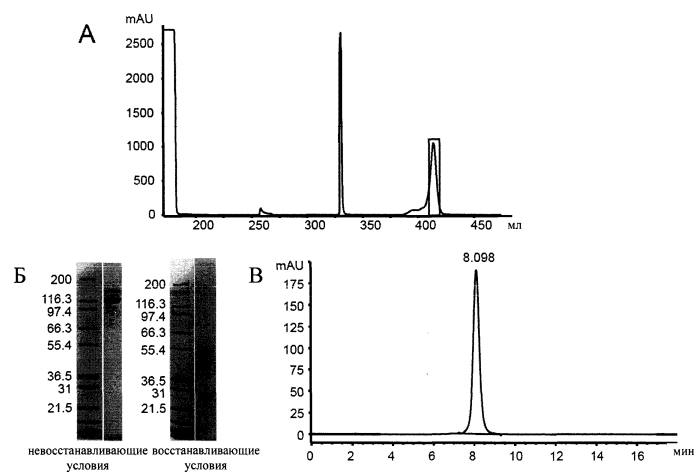
Фиг. 19



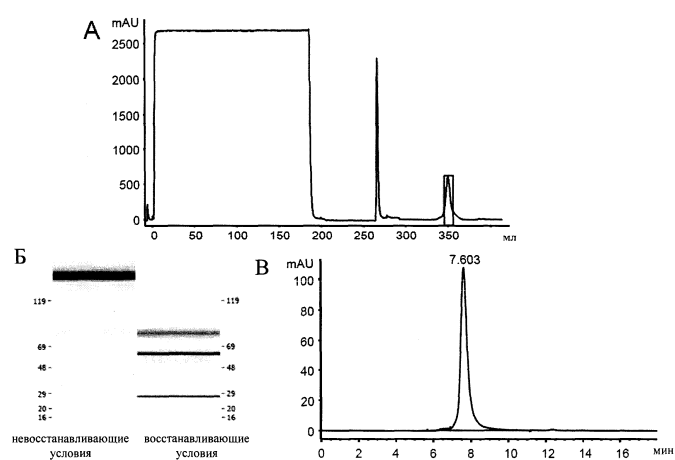
Фиг. 20



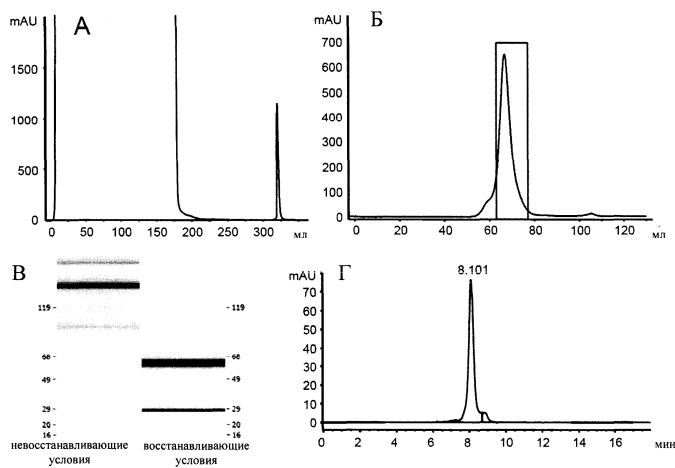
034251



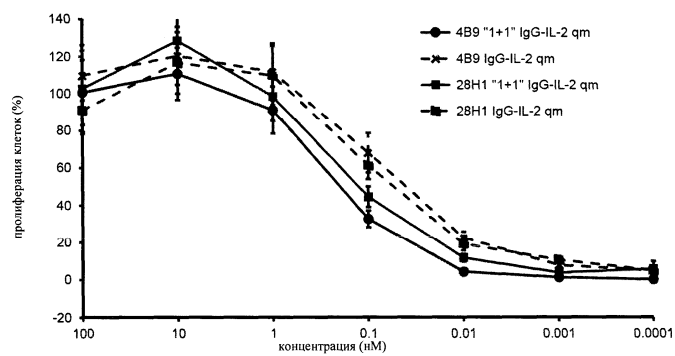
Фиг. 24



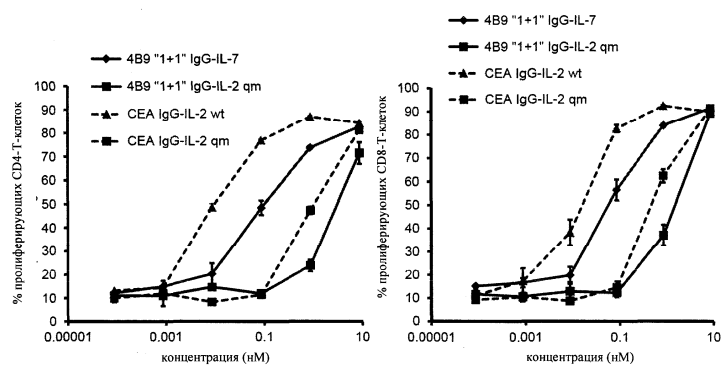
Фиг. 25



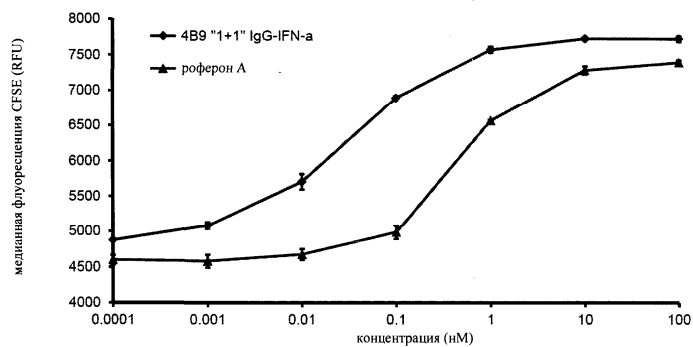
Фиг. 26



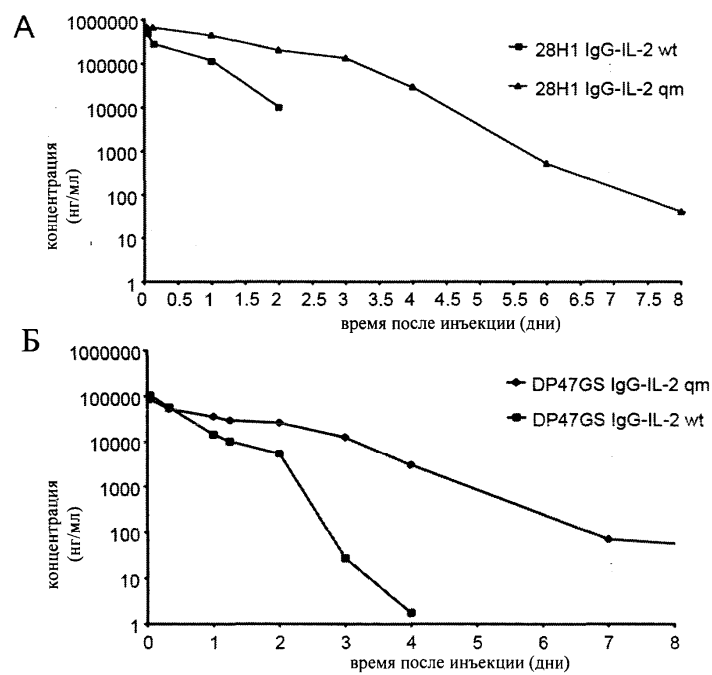
Фиг. 27



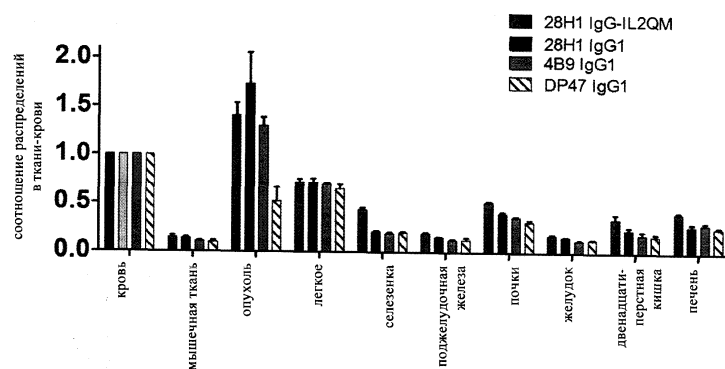
Фиг. 28



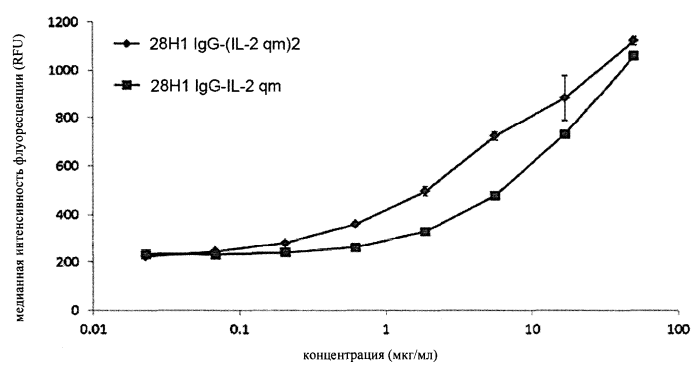
Фиг. 29



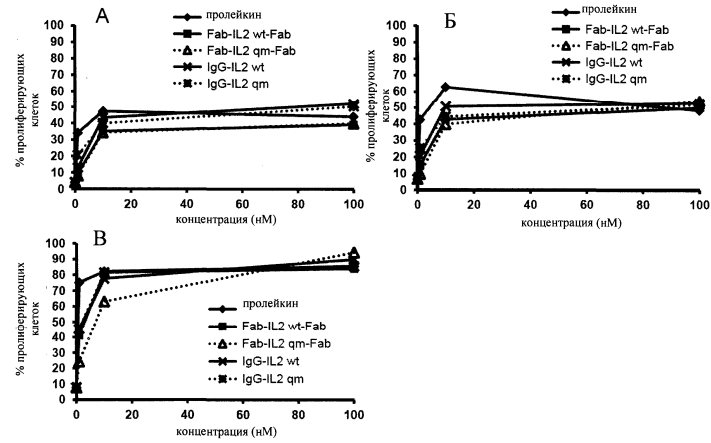
Фиг. 30



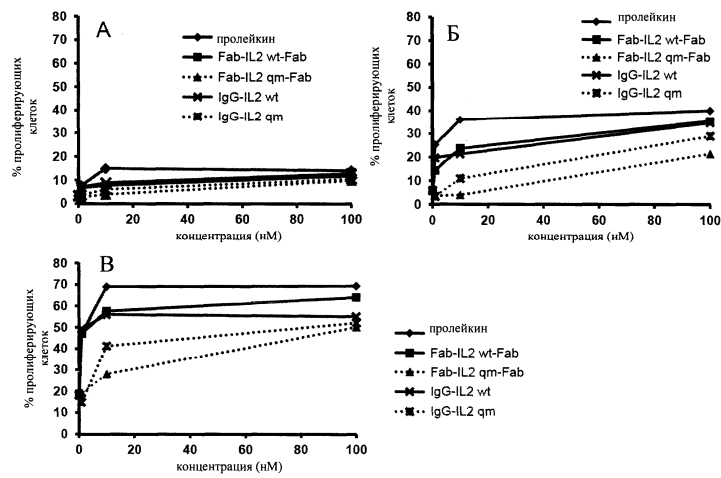
Фиг. 31



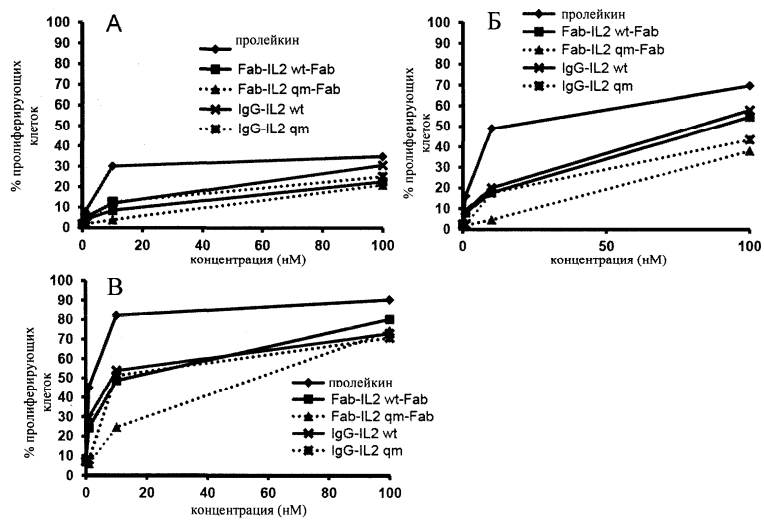
Фиг. 32



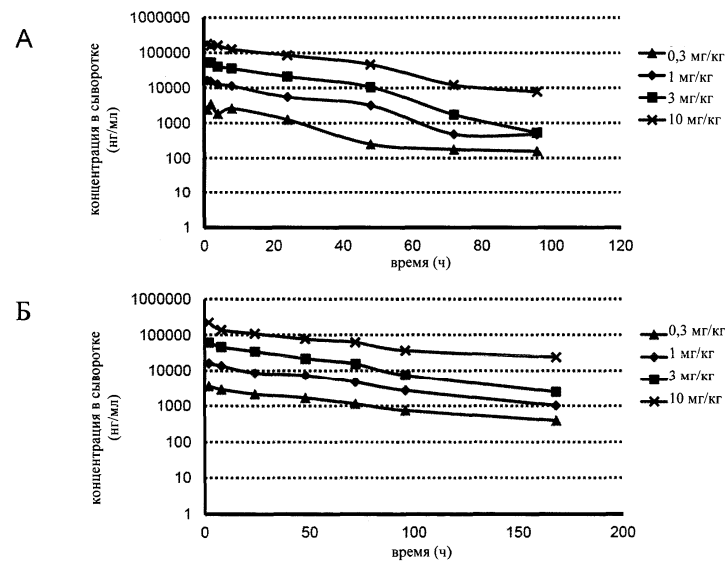
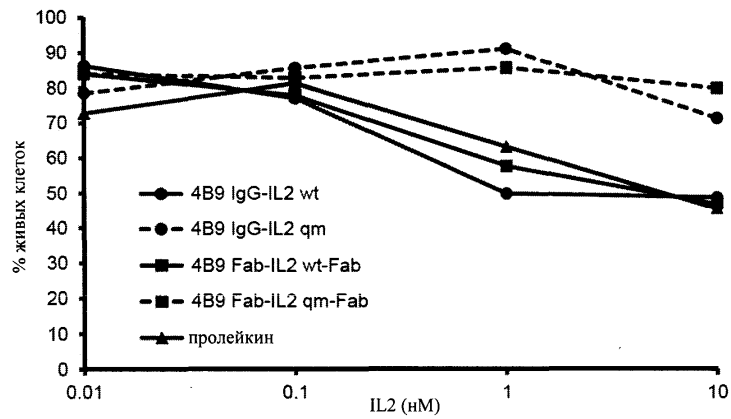
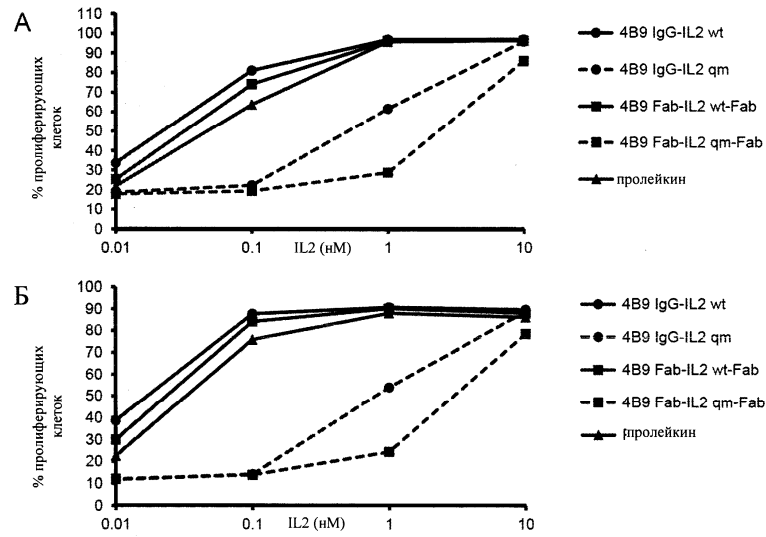
Фиг. 33

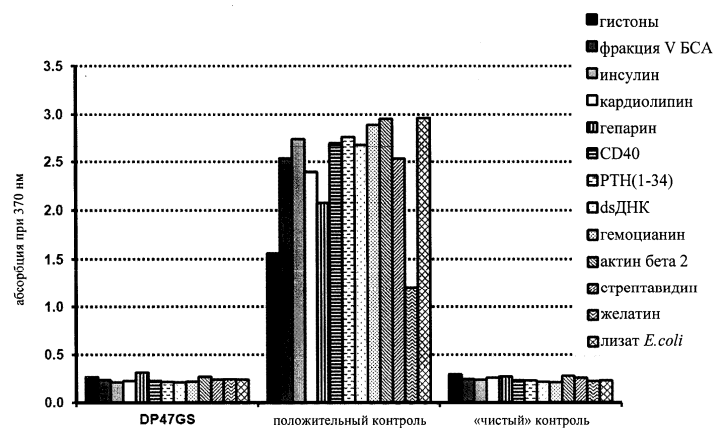


Фиг. 34

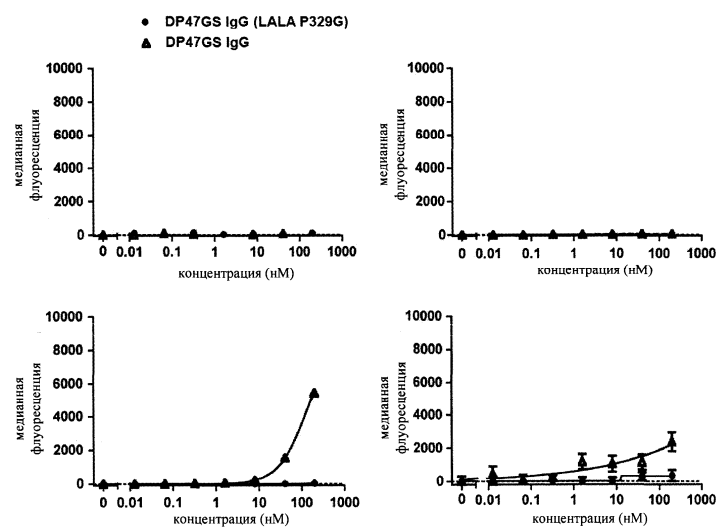


Фиг. 35

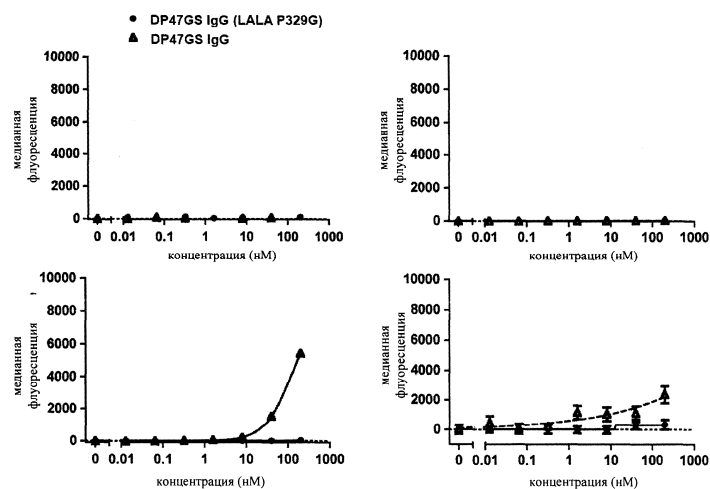




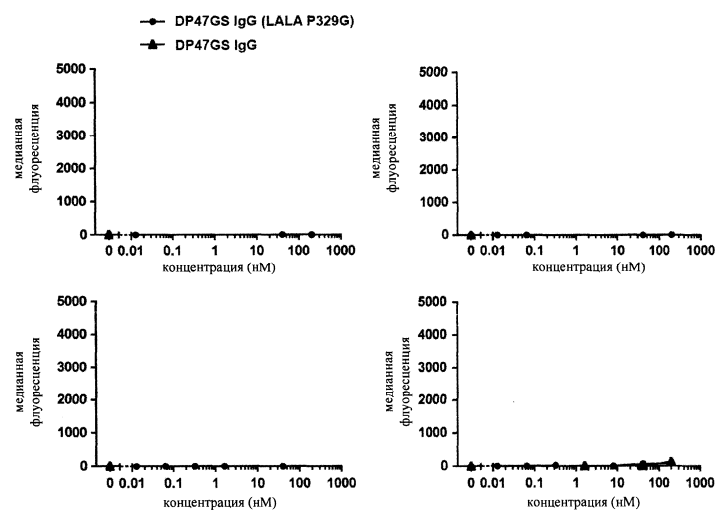
Фиг. 39



Фиг. 40А



Фиг. 40Б



Фиг. 40В

