

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 035896

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.08.27

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

(21) Номер заявки
201791775

(22) Дата подачи заявки
2016.02.12

(54) ЦИСТЕИНОВАЯ ПРОТЕАЗА

(31) 1502305.4

(56) WO-A1-2013037824

(32) 2015.02.12

(33) GB

(43) 2018.02.28

(86) PCT/EP2016/053054

(87) WO 2016/128559 2016.08.18

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ХАНСА МЕДИКАЛ АБ (SE)

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

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

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

035896 B1

035896 B1

035896

B1

Область техники

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

Предшествующий уровень техники

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

Сущность изобретения

Было показано, что способность IdeS расщеплять IgG имеет применение *ex vivo*, например в способах получения фрагментов Fab и Fc, которые могут быть применены для анализа IgG. См., например, WO 2003051914 и WO 2009033670. Также было показано, что IdeS может быть применена *in vivo* в качестве терапевтического средства, поскольку она способна расщеплять *in vivo* молекулы IgG, которые являются медиаторами заболевания, или их присутствие нежелательно по другим причинам. См., например, WO 2003051914, WO 2006131347 и WO 2013110946. IdeS может быть применена при лечении любого заболевания или состояния, которое полностью или частично опосредуется IgG. IgG полностью или частично является медиатором при множестве аутоиммунных заболеваний, например при остром отторжении органов донора.

Тем не менее, IdeS представляет собой иммуногенный белок. Таким образом, если IdeS применяют в качестве терапевтического средства, то иммунная система субъекта, получающего IdeS, часто отвечает на его воздействие. Реакция иммунной системы на IdeS обычно включает выработку антител, специфических для IdeS. В настоящем описании эти антитела могут быть названы "антителами к лекарственному препарату" (сокращенно "ADA" от англ. "anti-drug antibody" - противолекарственные антитела), специфическими для IdeS или "IdeS-специфическими ADA". Ответная реакция иммунной системы на IdeS в общем и выработка IdeS-специфических ADA, в частности, могут приводить к проблемам двух родственных типов. Во-первых, может быть снижена эффективность действия IdeS, например, из-за связывания ADA, что может приводить к необходимости введения более высоких или повторных дозировок для достижения того же эффекта. ADA, оказывающее такое действие, может быть названо "нейтрализующим ADA". Во-вторых, могут возникнуть нежелательные или даже опасные осложнения, такие как гипервоспалительная реакция, вызываемая иммунными комплексами ADA и IdeS. Чем выше количество ADA, специфических для IdeS конкретного субъекта, тем выше вероятность возникновения таких проблем. Присутствие и количество IdeS-специфических молекул ADA в организме пациента может быть определено любым подходящим способом, таким как специфический для конкретного средства флуоресцентный иммуноферментный анализ CAP FEIA (ImmunoCAP) или анализ с определением титров, проведенный на образце сыворотки крови пациента. Если количество IdeS-специфических молекул ADA в организме пациента превышает пороговое значение, определяемое лечащим врачом, то введение IdeS может стать нецелесообразным или это может указывать на необходимость введения более высокой дозировки IdeS. Такое повышение дозировки может, в свою очередь, привести к повышению количества IdeS-специфических молекул ADA в организме пациента, что делает дальнейшее введение IdeS нецелесообразным.

IdeS представляет собой фактор вирулентности *S.pyogenes*, который является возбудителем таких обычных инфекций, как тонзиллит и стрептококковое воспаление горла. Соответственно, большинство людей-пациентов уже сталкивались с IdeS в этом качестве, и, вероятно, в кровяном русле таких субъектов уже имеются антитела к IdeS. Обнаружение IdeS-специфических ADA в образцах сыворотки крови выбранных случайным образом людей (имеющих их в результате перенесенных ранее стрептококковых инфекций) является обычным явлением, также как и их обнаружение в препаратах IVIg (от англ. Intravenous Immunoglobulin, что означает "внутривенный иммуноглобулин"), которые являются препаратами

IgG, извлеченными из объединенной сыворотки крови тысяч доноров. Даже если субъект не имеет IdeS-специфических ADA до первоначального введения IdeS, имеется вероятность того, что такие молекулы будут вырабатываться впоследствии. Таким образом, у любого конкретного субъекта проблемы, связанные с иммуногенностью IdeS, с большой вероятностью будут препятствовать терапевтическому применению IdeS. Эти проблемы могут приводить к повышению дозы IdeS и/или полностью препятствовать лечению IdeS, в особенности, если требуется многократное введение. Имеющиеся способы устранения этих проблем включают, например, модификацию лекарственного средства полиэтиленгликолем (ПЭГ) для снижения иммуногенности или введение терапевтического средства совместно с иммунодепрессантом.

Авторы настоящего изобретения разработали совершенно новый подход. Авторы изобретения проанализировали последовательность IdeS и сравнили ее с последовательностью белка IdeZ, который приблизительно на 66% идентичен IdeS. IdeZ представляет собой IgG-цистеиновую протеазу, вырабатываемую *Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*, бактериями, имеющимися в основном в организме лошадей. Поскольку IdeZ не является человеческим патогенным микроорганизмом, в плазме крови людей обычно не имеется антител к этому белку. Однако IdeZ имеет уровень активности IgG-цистеиновой протеазы по отношению к человеческому IgG, который значительно ниже уровня активности IdeS. Авторы настоящего изобретения исследовали те положения последовательности IdeZ, которые повышают его активность по отношению к человеческому IgG, но при этом не приводят к значительному повышению иммуногенности. В качестве исходных веществ для настоящего исследования авторы изобретения использовали последовательность IdeZ и последовательность новой гибридной последовательности, сконструированной авторами изобретения, которая на 81,7% идентична последовательности IdeS и на 81% идентична последовательности IdeZ. Согласно настоящему изобретению эта гибридная последовательность может быть обозначена IdeS/Z.

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

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

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

Авторы настоящего изобретения смогли идентифицировать те положения в последовательностях IdeZ и гибридного IdeS/Z, которые в результате проведения модификации, рассмотренной в настоящем описании, позволяют получать новые полипептиды, обладающие более высокой активностью IgG-цистеиновой протеазы по отношению к человеческому IgG, чем IdeZ. Активность IgG-цистеиновой протеазы по отношению к человеческому IgG, которой обладает полипептид согласно изобретению, предпочтительно, по меньшей мере, равна активности IgG-цистеиновой протеазы по отношению к человеческому IgG, которой обладает IdeS. Полипептид согласно изобретению может эффективнее расщеплять первую цепь молекулы IgG, чем вторую цепь (см. схему на фиг. 18), в частности, если IgG представляет собой изотип IgG2. Полипептид согласно изобретению может эффективнее расщеплять IgG1, чем IgG2. Полипептид согласно изобретению обычно обладает меньшей иммуногенностью, чем IdeS, и предпочтительно может быть не более иммуногенным, чем IdeZ или IdeS/Z.

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

N-конца SEQ ID NO: 5 соответственно.

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

- (a) по меньшей мере на 50% идентичен SEQ ID NO: 4 или 5;
- (b) имеет цистеин (C) в том положении указанного варианта последовательности, которое соответствует положению 102 SEQ ID NO: 3; и необязательно
- (c) имеет в тех положениях указанного варианта последовательности, которые соответствуют положениям 92, 272, 294 и 296 SEQ ID NO: 3, лизин (K), гистидин (H), аспарагиновую кислоту (D) и аспарагиновую кислоту (D), соответственно; и при этом указанный полипептид более эффективно расщепляет человеческий IgG, чем IdeZ, и/или, по меньшей мере, расщепляет человеческий IgG с той же эффективностью, что и IdeS.

Предпочтительно указанный вариант SEQ ID NO: 4 или 5:

- (1) имеет положительно заряженную аминокислоту в том положении варианта, которое соответствует положению 138 SEQ ID NO: 3, и положительно заряженная аминокислота необязательно представляет собой аргинин (R) или лизин (K); и/или
- (2) имеет положительно заряженную аминокислоту в том положении варианта, которое соответствует положению 139 SEQ ID NO: 3, и положительно заряженная аминокислота необязательно представляет собой аргинин (R) или лизин (K); и/или
- (3) не включает непрерывной последовательности DDYQRNATEA YAKEVPHQIT; и/или
- (4) имеет по меньшей мере одну из следующих модификаций:
 - i. удаление остатков лейцина (L) и треонина (T) в тех положениях варианта, которые соответствуют положениям 64 и 65 в SEQ ID NO: 3;
 - ii. треонин (T) вместо аргинина (R) в том положении варианта, которое соответствует положению 70 в SEQ ID NO: 3;
 - iii. удаление тирозина (Y) в том положении варианта, которое соответствует положению 71 в SEQ ID NO: 3;
 - iv. глутамин (Q) вместо аспарагина (N) в том положении варианта, которое соответствует положению 72 в SEQ ID NO: 3;
 - v. глицин (G) вместо аспарагина (N) в том положении варианта, которое соответствует положению 73 в SEQ ID NO: 3;
 - vi. аланин (A) вместо глутаминовой кислоты (E) в том положении варианта, которое соответствует положению 67 в SEQ ID NO: 3;
 - vii. аспарагин (N) вместо глутамина (Q) в том положении варианта, которое соответствует положению 68 в SEQ ID NO: 3.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Изобретение также относится к наборам для осуществления способов согласно изобретению.

Краткое описание графических материалов

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

на фиг. 3 - результаты репрезентативного SDS-PAGE анализа в геле, который применяли для визуализации продуктов расщепления, получаемых при инкубации IgG1 с полипептидами согласно изобретению или с контрольными веществами;

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

на фиг. 5 - результаты репрезентативного SDS-PAGE анализа в геле, который применяли для визуализации продуктов расщепления, получаемых при инкубации IgG1 с дополнительными полипептидами согласно изобретению или с контрольными веществами;

на фиг. 6 - результаты репрезентативного SDS-PAGE анализа в геле, который применяли для визуализации продуктов расщепления, получаемых при инкубации IgG2 с полипептидами согласно изобретению или с контрольными веществами;

на фиг. 7 - результаты репрезентативного SDS-PAGE анализа в геле, который применяли для визуализации продуктов расщепления, получаемых при инкубации IVIg с полипептидами согласно изобретению или с контрольными веществами;

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

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

на фиг. 12 - репрезентативные кривые титрования при расщеплении IgG1 различными полипептидами IgG-цистеиновой протеазы;

на фиг. 13 - репрезентативные кривые титрования при расщеплении IgG2 различными полипептидами IgG-цистеиновой протеазы;

на фиг. 14 - результаты репрезентативного анализа SDS-PAGE, который применяли для визуализации продуктов расщепления, получаемых при инкубации IgG с полипептидами согласно изобретению или с контрольными веществами;

на фиг. 15 - результаты репрезентативного анализа SDS-PAGE, который применяли для визуализации продуктов расщепления, получаемых при инкубации IgG с полипептидами согласно изобретению или с контрольными веществами;

на фиг. 16 - результаты репрезентативного анализа SDS-PAGE, который применяли для визуализации продуктов расщепления, получаемых при инкубации IVIg с полипептидами согласно изобретению или с контрольными веществами;

на фиг. 17 - результаты репрезентативного анализа SDS-PAGE, который применяли для визуализации продуктов расщепления, получаемых при инкубации IVIg с полипептидами согласно изобретению или с контрольными веществами;

на фиг. 18 схематично представлено расщепление иммуноглобулинов полипептидами согласно изобретению;

на фиг. 19 представлены результаты репрезентативного анализа % конкуренции за центры связывания ADA между полипептидами согласно изобретению и контрольными веществами;

на фиг. 20 - результаты другого репрезентативного анализа % конкуренции за центры связывания ADA между полипептидами согласно изобретению и контрольными веществами;

на фиг. 21 - репрезентативные результаты анализа эффективности ELISA, применяемого для определения эффективности расщепления IgG человека под действием полипептидов согласно изобретению *in vivo*;

на фиг. 22 - результаты репрезентативного анализа SDS-PAGE, который применяли для визуализации продуктов расщепления IgG, получаемых *in vivo* под действием полипептидов согласно изобретению.

Краткое описание последовательностей

SEQ ID NO: 1 представляет собой полную последовательность IdeS, включающую N-терминальный метионин и сигнальную последовательность. Она также называется Эталонной последовательностью NCBI No. WP_010922160.1.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения.

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

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

Употребляемый в настоящем описании термин "полипептид" имеет самое широкое из присущих ему значений и означает соединение, состоящее из двух или более составляющих аминокислот, аналогов аминокислот или других пептидомиметиков. Таким образом, термин "полипептид" включает короткие пептидные последовательности, а также полипептиды и белки большей длины. Употребляемый в настоящем описании термин "аминокислота" относится к встречающимся в природе и/или не встречающимся в природе или синтетическим аминокислотам, включающим оптические изомеры D или L, к аналогам аминокислот и к пептидомиметикам.

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

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

Функциональные признаки полипептида.

Настоящее изобретение относится к новому полипептиду, обладающему активностью цистеиновой протеазы в отношении IgG (т.е. активностью IgG-цистеиновой протеазы), и при этом указанный полипептид проявляет большую эффективность при расщеплении IgG, чем IdeZ. Активность IgG-цистеиновой протеазы по отношению к человеческому IgG, которой обладает полипептид согласно изобретению, предпочтительно, по меньшей мере, равна активности IgG-цистеиновой протеазы по отношению к человеческому IgG, которой обладает IdeS. Кроме того, полипептид согласно изобретению обычно обладает более низкой иммуногенностью, чем IdeS, и предпочтительно может быть не более иммуногенным, чем IdeZ или IdeS/Z. При рассмотрении контроля или сравнения с полипептидом согласно изобретению, "IdeS", "IdeZ" и "IdeS/Z" означают полипептиды, состоящие из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 2, 4 и 5 соответственно. В альтернативном варианте или дополнительно "IdeS", "IdeZ" и "IdeS/Z", если их применяют в качестве вещества для контроля или сравнения, могут означать полипептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, 4 и 5, соответственно,

содержащую дополнительный остаток метионина (М) на N-конце и/или метку на С-конце, которые способствуют экспрессии в стандартных бактериальных экспрессирующих системах и выделению из таких систем. Подходящие метки включают гистидиновую метку, которая может быть непосредственно присоединена к С-концу полипептида или присоединена опосредованно через любую подходящую линкерную последовательность, такую как 3, 4 или 5 остатков глицина. Гистидиновая метка обычно состоит из шести гистидиновых остатков, хотя ее длина может быть больше, обычно до 7, 8, 9, 10 или 20 аминокислот, или меньше, например, составлять 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислоту. Последовательность примера IdeS полипептида, применяемого согласно настоящему изобретению в качестве контрольного, приведена под обозначением SEQ ID NO: 22. Этот полипептид включает последовательность SEQ ID NO: 2, а также дополнительный N-терминальный метионин и гистидиновую метку, и в настоящем описании он может быть обозначен pCART124. Последовательность примера полипептида IdeZ, используемого согласно настоящему изобретению в качестве контроля, обозначена SEQ ID NO: 23. Этот полипептид включает последовательность SEQ ID NO: 4, содержащую дополнительный N-терминальный метионин и гистидиновую метку, и в настоящем описании он может быть обозначен pCART144. Последовательность примера полипептида IdeS/Z, используемого согласно настоящему изобретению в качестве контроля, обозначена SEQ ID NO: 24. Этот полипептид включает последовательность SEQ ID NO: 5, содержащую дополнительный N-терминальный метионин и гистидиновую метку, и в настоящем описании он может быть обозначен pCART145.

Активность IgG-цистеиновой протеазы может быть оценена с помощью любого подходящего способа, например, инкубацией полипептида с образцом, содержащим IgG, и определением наличия продуктов расщепления IgG. Эффективность может быть оценена в присутствии или отсутствии ингибитора, такого как нейтрализующее антитело. Однако согласно изобретению, если не указано иное, эффективность обычно означает эффективность, определяемую в отсутствие такого ингибитора. Подходящие способы рассмотрены в примерах. В настоящем описании эффективность расщепления IgG полипептидом может быть названа "активностью" полипептида. Активность полипептида согласно изобретению предпочтительно по меньшей мере в 2,0 раза превышает активность IdeZ, определяемую с помощью того же анализа. В альтернативном варианте активность полипептида согласно изобретению предпочтительно по меньшей мере эквивалентна активности IdeS, определяемой с помощью того же анализа. Активность полипептида согласно изобретению может по меньшей мере в 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 4,0, 4,5, 5,0, 6,0, 7,0, 7,5 или 8,0 раз превышать активность IdeS, определяемую с помощью того же анализа. Активность полипептида согласно изобретению предпочтительно по меньшей мере в 2,0 раза, более предпочтительно по меньшей мере в 3,0 или 4,0 раза и наиболее предпочтительно по меньшей мере в 8,0 раз превышает активность IdeS, определяемую с помощью того же анализа.

Полипептид согласно изобретению обычно обладает меньшей иммуногенностью, чем IdeS, и, таким образом, более высокой активностью, чем IdeZ, и/или активностью, эквивалентной активности IdeS, которая представляет собой приемлемый минимальный стандарт активности цистеиновой протеазы по отношению к человеческому IgG. Однако более высокая активность, чем у IdeS, является желательным усовершенствованием. Такая повышенная активность обычно позволяет применять пониженные дозировки полипептида согласно изобретению для достижения того же терапевтического эффекта, который достигается при использовании более высоких дозировок IdeS. Пониженная дозировка также может сделать доступным введение полипептида согласно изобретению большее количество раз, чем IdeS. Это происходит из-за того, что применение пониженной дозировки нивелирует проблемы, связанные с иммуногенностью терапевтического средства, поскольку снижается вероятность возникновения ответной реакции иммунной системы или снижается интенсивность этой реакции на средство, присутствующее в меньшей концентрации.

Анализ для определения эффективности полипептида в процессе расщепления IgG, то есть анализы для определения активности полипептида, хорошо известны в данной области техники, и для этой цели может быть применен любой подходящий анализ. Подходящие анализы включают анализ на основе ELISA, например, анализ, рассмотренный в примерах. В таком анализе на лунки аналитического планшета обычно наносят мишень для антитела, такую как альбумин бычьей сыворотки (англ. bovine serum albumin, сокращенно BSA). Затем в лунки добавляют образцы испытуемого полипептида, и затем - образцы мишень-специфического антитела, которое в этом примере представляет собой антитело, специфическое для BSA. Полипептид и антитело оставляют взаимодействовать в условиях, подходящих для воздействия цистеиновой протеазы на IgG. Спустя подходящий промежуток времени, аналитический планшет промывают и добавляют идентифицирующее антитело, которое специфично связывается с мишень-специфическим антителом в условиях, подходящих для связывания с мишень-специфическим антителом. Идентифицирующее антитело будет связываться с любым интактным мишень-специфическим антителом, которое лунке связано с мишенью в каждой. После промывки количество идентифицирующих антител, находящихся в лунке, будет пропорционально количеству мишень-специфических антител, закрепленных в этой лунке. Идентифицирующее антитело может быть непосредственно или опосредованно сопряжено с маркером (англ. label) или другой репортерной системой (такой как фермент), таким образом, что может быть определено количество идентифицирующих антител, остающихся в каждой

лунке. Чем выше активность испытуемого полипептида, находящегося в лунке, тем меньше остается интактных мишень-специфических антител и, следовательно, меньше остается идентифицирующих антител. Обычно по меньшей мере в одну лунку данного аналитического планшета вместо испытуемого полипептида добавляют IdeS для непосредственного сравнения активности испытуемых полипептидов с активностью IdeS. Для сравнения также могут быть включены IdeZ и IdeS/Z.

Активность испытуемого полипептида может быть определена с помощью других анализов непосредственной визуализацией и/или количественным определением фрагментов IgG, образующихся при расщеплении IgG под действием испытуемого полипептида. Анализ такого типа также рассмотрен в примерах. Анализ обычно включает инкубацию образца IgG с испытуемым полипептидом (или с одним или более из следующих полипептидов: IdeS, IdeZ и IdeS/Z, применяемых в качестве контрольного образца) в различных концентрациях и серийное титрование. Затем продукты, получаемые при инкубации при каждой концентрации, разделяют гель-электрофорезом, например способом SDS-PAGE. Целые молекулы IgG и фрагменты, получаемые при расщеплении IgG, затем могут быть идентифицированы по размеру и количественно оценены по интенсивности окрашивания подходящим красителем. Чем больше количество полученных при расщеплении фрагментов, тем выше активность испытуемого полипептида в заданной концентрации. Воздействие полипептида согласно изобретению в более низких концентрациях, чем IdeZ и/или IdeS (при более низких значениях в серии титрования), обычно приводит к образованию обнаруживаемого количества фрагментов, получаемых при расщеплении. Этот анализ также позволяет идентифицировать испытуемые полипептиды, более эффективно расщепляющие первую или вторую тяжелую цепь молекулы IgG, поскольку также можно определить количества различных фрагментов, получаемых при каждом расщеплении. Полипептид согласно изобретению может более эффективно расщеплять первую цепь молекулы IgG, чем ее вторую цепь (см. схему на фиг. 18), в частности, если IgG представляет собой изотип IgG2. Полипептид согласно изобретению может более эффективно расщеплять IgG1, чем IgG2.

Этот анализ также может быть адаптирован для определения степени снижения активности полипептида согласно изобретению в присутствии IdeS-специфических ADA. При проведении адаптированного анализа при инкубации образца IgG с испытуемым полипептидом (или с IdeS в качестве контрольного образца), в сыворотку крови или препарат IVIg, содержащий IdeS-специфические ADA, включают реакционную среду. Предпочтительно, на активность полипептида согласно изобретению не влияет присутствие ADA, или в присутствии ADA его активность снижается в меньшей степени, чем активность IdeS в том же анализе. Другими словами, предпочтительно нейтрализующее влияние IdeS-специфических ADA на полипептид согласно изобретению меньше или эквивалентно нейтрализующему влиянию IdeS-специфических ADA на IdeS в том же анализе.

Как было указано выше, полипептид согласно изобретению обычно обладает меньшей иммуногенностью, чем IdeS. Таким образом, полипептид согласно изобретению может вызывать такую же или предпочтительно более слабую ответную реакцию иммунной системы, чем IdeS, определяемую с помощью того же анализа, при нахождении в эквивалентной дозировке или концентрации. Иммуногенность полипептида согласно изобретению обычно составляет не более 50%, не более 45%, не более 40%, не более 35%, не более 30% или не более 25% от иммуногенности IdeS, определяемой с помощью того же анализа. Предпочтительно иммуногенность полипептида согласно изобретению составляет не более 25% от иммуногенности IdeS, определяемой с помощью того же анализа.

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

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

лунке. Обычно по меньшей мере в одну лунку данного аналитического планшета вместо испытуемого полипептида добавляют предварительно инкубированную смесь IVIg и IdeS для проведения непосредственного сравнения между связыванием ADA с испытуемыми полипептидами и связыванием с IdeS; в качестве дополнительных контрольных полипептидов также могут быть применены IdeZ и/или IdeS/Z.

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

Структурные признаки полипептида.

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

Длина полипептида согласно изобретению обычно составляет по меньшей мере 100, 150, 200, 250, 260, 270, 280, 290, 300 или 310 аминокислот. Полипептид согласно изобретению обычно содержит не более 400, 350, 340, 330, 320 или 315 аминокислот. Следует понимать, что для получения длины полипептида согласно изобретению любой из указанных выше нижних пределов может быть скомбинирован с любым из указанных выше верхних пределов. Например, длина полипептида может составлять от 100 до 400 аминокислот или от 250 до 350 аминокислот. Длина полипептида предпочтительно составляет от 290 до 320 аминокислот, наиболее предпочтительно от 300 до 315 аминокислот.

Первичная структура (последовательность аминокислот) полипептида согласно изобретению основана на первичной структуре IdeZ или IdeS/Z, а именно, аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 соответственно. Последовательность полипептида согласно изобретению включает вариант последовательности аминокислот SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, который по меньшей мере на 50% идентичен последовательности аминокислот SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. Вариант последовательности может быть по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, предпочтительно по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичен последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. Вариант может быть идентичен последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 за исключением того, что он включает одну или более специфических модификаций, указанных в настоящем описании. Идентичность последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5 может быть определена в области, составленной по меньшей мере из 50, по меньшей мере 100, по меньшей мере 200, по меньшей мере 300 или более непрерывно расположенных аминокислот последовательности, представленной SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5, или более предпочтительно по всей длине SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5.

Идентичность аминокислот может быть вычислена с помощью любого подходящего алгоритма. Например, алгоритмы PILEUP и BLAST могут быть применены для вычисления идентичности или сопоставления последовательностей (например, идентификации эквивалентных или соответствующих последовательностей (обычно с использованием параметров по умолчанию), например, как описано в публикации Altschul S.F. (1993) J. Mol. Evol. 36:290-300; Altschul, S.F. с соавт. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10). Программное обеспечение для проведения анализов BLAST (от англ. Basic local alignment search tool, т.е. "средство поиска основного локального выравнивания") имеется в свободном доступе на сайте National Center for Biotechnology Information (Национального Центра Биотехнологической Информации) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Этот алгоритм включает сначала идентификацию пары последовательностей с высоким показателем сходства (англ. high scoring sequence pair, сокращенно HSP) посредством идентификации коротких слов длины W исследуемой последовательности, которые либо соответствуют, либо удовлетворяют некоторому положительно оцениваемому пороговому значению показателя Т при

сопоставлении со словом той же длины в последовательности, имеющейся в базе данных. Т означает пороговое значение показателя соседнего слова (Altschul с соавт., выше). Начальные совпадения соседнего слова действуют как сигнал для начала поиска HSP, содержащих их. Совпадения слов распространяют в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, повышается суммарная оценка выравнивания. Рост совпадения слов в каждом направлении останавливают тогда, когда суммарная оценка выравнивания уменьшается на величину X по сравнению с достигнутым ею максимальным значением; суммарный показатель стремится к нулю или менее из-за накопления одного или более остатков выравнивания, имеющих отрицательную оценку; или достигнут конец любой последовательности. Чувствительность и скорость сопоставления определяются параметрами W, T и X алгоритма BLAST. По умолчанию в программе BLAST используют длину (W) слова, составляющую 11, матрицы весов выравнивания BLOSUM62 (см. Henikoff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919) (B) 50, ожидание (E) 10, M=5, N=4, и сравнение обеих цепочек.

Алгоритм BLAST выполняет статистический анализ сходства двух последовательностей; см., например, Karlin и Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787. Одним параметром сходства, определяемым алгоритмом BLAST, является наименьшая суммарная вероятность (P(N)), которая указывает вероятность случайного совпадения между двумя полинуклеотидными или аминокислотными последовательностями. Например, последовательность считается одинаковой другой последовательности, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении первой последовательности со второй последовательностью составляет менее приблизительно 1, предпочтительно менее приблизительно 0,1, более предпочтительно менее приблизительно 0,01, и наиболее предпочтительно менее приблизительно 0,001. В альтернативном варианте в пакете программного обеспечения UWGCG имеется программа BESTFIT, которая может быть применена для вычисления идентичности (например, с параметрами по умолчанию) (Devereux с соавт. (1984) Nucleic Acids Research 12, 387-395).

Последовательность полипептида согласно изобретению включает вариант последовательности аминокислот SEQ ID NO: 4 или 5, в которую внесены изменения, такие как добавление, изъятие или замена аминокислот по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. Если не указано иное, изменения предпочтительно представляют собой консервативные аминокислотные замены. При консервативных заменах аминокислоты заменяют другими аминокислотами, имеющими схожую химическую структуру, сходные химические свойства или сходный объем боковой цепи. Введенные аминокислоты могут иметь такую же полярность, гидрофильность, гидрофобность, основность, кислотность, нейтральность или заряд, как и аминокислоты, которые они заменяют. В альтернативном варианте при консервативной замене может быть введена другая аминокислота, например ароматическая или алифатическая, вместо имевшейся ранее ароматической или алифатической аминокислоты. Консервативные замены аминокислот хорошо известны в данной области техники и могут быть выбраны в соответствии со свойствами 20 основных аминокислот, указанных ниже в табл. A1. Если аминокислоты имеют сходную полярность, то это может быть определено по шкале гидрофобности для боковых цепей аминокислот, приведенной в табл. A2.

Таблица A1. Химические свойства аминокислот

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

	нейтральная		нейтральная
Lys (K)	полярная, гидрофильная, заряд(+)	Trp (W)	ароматическая, гидрофобная, нейтральная
Leu (L)	алифатическая, гидрофобная, нейтральная	Tyr (Y)	ароматическая, полярная, гидрофобная

Таблица A2. Шкала гидрофобности

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

Аминокислотная последовательность полипептида согласно изобретению включает вариант последовательности аминокислот SEQ ID NO: 4 или 5. Однако в таком варианте последовательности предпочтительно остаются определенные остатки аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 5. Например, в таком варианте последовательности обычно остаются определенные остатки, которые, как известно, необходимы для обеспечения активности IgG-цистеиновой протеазы. Таким образом, в аминокислотной последовательности полипептида согласно изобретению должен оставаться цистеин в положении 102 SEQ ID NO: 3 (68-й остаток SEQ ID NO: 4 или 5). Необязательно также остаются лизин в положении 92, гистидин в положении 272 и аспарагиновая кислота в положениях 294 и 296 SEQ ID NO: 3. Они представляют собой 58-, 238-, 260- и 262-й остатки от N-конца SEQ ID NO: 4 и 58-, 236-, 258- и 260-й остатки от N-конца SEQ ID NO: 5 соответственно. Таким образом, полипептид согласно изобретению обычно включает вариант последовательности аминокислот SEQ ID NO: 2, который имеет цистеин (C) в том положении указанного варианта последовательности, которое соответствует положению 102 SEQ ID NO: 3; и необязательно имеет в тех положениях указанного варианта последовательности, которые соответствуют положениям 92, 272, 294 и 296 SEQ ID NO: 3, лизин (K), гистидин (H), аспарагиновую кислоту (D) и аспарагиновую кислоту (D) соответственно.

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

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

(2) замена аспарагина (N) в положении 139 SEQ ID NO: 3 положительно заряженной аминокислотой усиливает активность полипептида, который включает это изменение. Таким образом, полипептид согласно изобретению может включать вариант последовательности аминокислот SEQ ID NO: 4 или 5, который имеет положительно заряженную аминокислоту в том положении варианта, которое соответствует положению 139 SEQ ID NO: 3. Обычные положительно заряженные аминокислоты перечислены выше в табл. A1. Положительно заряженная аминокислота предпочтительно представляет собой аргинин (R) или лизин (K). Соответственно, согласно настоящему изобретению, эта конкретная модификация

может быть обозначена "N139R/K";

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

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

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

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

"-" указывает на отсутствующий остаток.

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

- i. удаление остатков лейцина (L) и треонина (T) в тех положениях варианта, которые соответствуют положениям 64 и 65 в SEQ ID NO: 3;
- ii. треонин (T) вместо аргинина (R) в том положении варианта, которое соответствует положению 70 в SEQ ID NO: 3;
- iii. удаление тирозина (Y) в том положении варианта, которое соответствует положению 71 в SEQ ID NO: 3;
- iv. глутамин (Q) вместо аспарагина (N) в том положении варианта, которое соответствует положению 72 в SEQ ID NO: 3;
- v. глицин (G) вместо аспарагина (N) в том положении варианта, которое соответствует положению 73 в SEQ ID NO: 3;
- vi. аланин (A) вместо глутаминовой кислоты (E) в том положении варианта, которое соответствует положению 67 в SEQ ID NO: 3;
- vii. аспарагин (N) вместо глутамина (Q) в том положении варианта, которое соответствует положению 68 в SEQ ID NO: 3.

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

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

- (a) по меньшей мере на 50% идентичен SEQ ID NO: 4 или 5;
- (b) имеет цистеин (C) в том положении указанного варианта последовательности, которое соответствует положению 102 в SEQ ID NO: 3; и необязательно
- (c) имеет в тех положениях указанного варианта последовательности, которые соответствуют положениям 92, 272, 294 и 296 в SEQ ID NO: 3, лизин (K), гистидин (H), аспарагиновую кислоту (D) и аспарагиновую кислоту (D) соответственно.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Замены (замещения) обычно представляют собой замену имеющейся аминокислоты другой аминокислотой, имеющей отличающиеся свойства. Например, аминокислота, не имеющая заряда, может быть замещена аминокислотой, имеющей заряд, и наоборот. Предпочтительные замещения в перечисленных положениях представлены ниже в табл. В1 и В2 с помощью однобуквенного кода.

Таблица В1. Вариант А

Существующая аминокислота в SEQ ID NO: 4	Положение в SEQ ID NO: 3	Предпочтительная замена
H	84	N
A	93	T
D	95	N
K	97	A
F	137	I
Q	140	E
A	147	E
D	150	R
N	162	E
R	165	K
D	166	E
N	171	Y
A	174	T
N	205	K
D	226	N
L	237	F
N	239	E
N	243	K
K	250	S
Q	251	E
T	254	E
E	255	K
N	282	D
E	288	K
A	312	K
H	315	K
K	347	Q
S	349	N

Таблица В2. Вариант В

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

Каждое из замещений, указанных в табл. В1 и В2, может быть обозначено согласно настоящему изобретению обозначением, полученным комбинацией содержимого ячеек в первой, второй и третьей колонке в каждом ряду слева направо. Например, согласно настоящему изобретению, замещение в пер-

вом ряду табл. B1 может быть обозначено "H84N", замещение во втором ряду может быть обозначено "A93T" и т.д. Конкретные модификации: "D226N", приведенная в табл. B1, и "D224N", приведенная в табл. B2, предназначены для разрушения известного мотива клеточной адгезии в последовательности IdeZ и IdeS/Z, который представляет собой непрерывную RGD последовательность в положениях 224-226 в SEQ ID NO: 3.

В приведенных ниже табл. C1 и C2 представлены модификации, применяемые для получения аминокислотных последовательностей некоторых примеров полипептидов согласно изобретению.

Таблица C1

Внутренняя ссылка	Модификации по сравнению с IdeZ (SEQ ID NO: 4) (положения соответствуют SEQ ID NO: 3)	SEQ ID NO полной последовательности
pCART197	H84N, N138R, A147E, D150R, N162E, N171Y, N205K, D226N, Q251E, E255K, A312K, S349N	6
pCART198	A93T, D95N, Q140E, R165K, D166E, A174T, D226N, L237F, N239E, N243K, N282D, E288K, H315K, K347Q	7
pCART200	D36_I53замещениеS31_V48 SEQ 2 т.е. SFSANQEI RYSEVTPYHV замещает DYQRNATE AYAKEVPHQI	8
pCART201	D35_T54del	9
pCART202	R70T, Y71del, N72Q, N73G	10
pCART203	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G	11
pCART204	R70T, Y71del	12
pCART206	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, F137I	13
pCART207	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, N138R	14
pCART208	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, F137I, N138R	15
pCART210	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, H84N, N138R, N162E, N205K, D226N	16
pCART217	D35_T54del, L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, N138R, D226N	17
pCART219	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, K97A, N138R, D226N	18
pCART226	D35_T54del, L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, K97A, N138R, D226N	19
	N138R, D226N	
pCART229	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, N138R, D226N	20

Таблица C2

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

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

SEQ ID NO: 1

MRKRCYSTSAAVLAAVTLFVLSVDRGVIADSFSAHQEIRYSEVTPYHVTSSVWTKGVTTPPA
NFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFNGKDDLLCGAAMETKMLHWWFDQNKDQIKRY

LEEHPKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVID
MFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLI
KKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWGADFDNSGNLKAIVVTDSDSNASIGMKKYFVG
VNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO: 2

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTTPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTENG
KDLLCGAATAGHMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPKQKINFNGEQMFDVKEAIDTKNH
QLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRGG
IFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINLWG
ADFDNSGNLKAIVVTDSDSNASIGMKKYFVG VNSAGKVAISAKEIKEDNIGAQVLGLFTLS
TGQDSWNQTN

SEQ ID NO: 3

MKTIAYPNKPHLSAGLLTAIAIFSLASSNITYADDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVT
PLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKA FDGKDNLLCGAAMETKHMLHWWFDQNK
TEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAIDTKDSQTSQLFNYFRDKAFPNSARQLGVM
PDLVLD MFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGDQTLLTARHDLKNK
GLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGADFN AEGNLEAIYVTDSDANASIG
MKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 4

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKA
FDGKDNLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAIDTK
DSQTSQLFNYFRDKAFPNSARQLGVM PDLVLD MFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDK
DKRGGIFDAVFTRGDQTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHV
INLWGADFN AEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLG
LFTLSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 5

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVFHAPYVANQGWDITKA
FDGKDNLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPKQKINFNGDHMFVKKAIID
TKNHQLDSKLFNYFKEKAFPGLSARRIGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKD

PRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKNKNLNDISTIIKQELTKGKALGLSHTYANVSINHVI
NLWGADFNAEGNLEAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLG
LFTLSTGQDSWQKLS

SEQ ID NO: 6 (pCART197)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLANQGWDITKA
FDGKDNLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLKEAIRTK
DSQTNSQLFEYFRDKAFPYLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVCRPYQDK
DKRGGIFDAVFTRGNQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKEELTKGRALALSHTYANVSISHVI
NLWGADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINKHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGL
FTLSSGKDIWQKLN

SEQ ID NO: 7 (pCART198)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKT
FNGKDNLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNEELFDLKAADTK
DSQTNSQLFNYFKEKAFPNLSTRQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDK
DKRGGIFDAVFTRGNQTTLLTARHDFKEKGLKDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHV
INLWGADFDAEGNLKAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGKVAISAKKIEGENIGAQVLG
LFTLSSGKDIWQQLS

SEQ ID NO: 8 (pCART200)

DSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKAF
DGKDNLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAADTKD
SQTNSQLFNYFRDKAFPNLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKD
KRGGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVI
NLWGADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGL
FTLSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 9 (pCART201)

SVWTKGVTPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITKAFDGKDNLLCGAAMETKHMLH
WWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAADTKDSQTNSQLFNYFRDKAFPNLS
ARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGDQTTLLT
ARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGADFNAEGNLEAIYVTD
SDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 10 (pCART202)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFTQGEDIHAPYLAHQGWYDITKAF
 DGKDNLLCGAAMETKMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLAAIDTKD
 SQNSQLFNYFRDKAFPNSARQLGVMPDLVLD MFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKD
 KRGGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVI
 NLWGADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGL
 FTLSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 11 (pCART203)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDIHAPYLAHQGWYDITKAFDG
 KDNLLCGAAMETKMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLAAIDTKDSQ
 TNSQLFNYFRDKAFPNSARQLGVMPDLVLD MFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKR
 GGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINL
 WGADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFT
 LSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 12 (pCART204)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFRYNNEDIHAPYLAHQGWYDITKAFD
 GKDNLLCGAAMETKMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLAAIDTKDS
 QTNSQLFNYFRDKAFPNSARQLGVMPDLVLD MFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDK
 RGGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINL
 WGADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFT
 LSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 13 (pCART 206)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDIHAPYLAHQGWYDITKAFDG
 KDNLLCGAAMETKMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIINNQELFDLAAIDTKDSQT
 NSQLFNYFRDKAFPNSARQLGVMPDLVLD MFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRG
 GIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLW
 GADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTL
 SSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 14 (pCART207)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDIHAPYLAHQGWYDITKAFDG
 KDNLLCGAAMETKMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLAAIDTKDSQ
 TNSQLFNYFRDKAFPNSARQLGVMPDLVLD MFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKR

GGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINL
WGADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFT
LSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 15 (pCART208)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDIHAPYLAHQGWYDITKAFDG
KDNLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIIRNQELFDLKAIDTKDSQT
NSQLFNYFRDKAFPNSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRG
GIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLW
GADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTL
SSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 16 (pCART210)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDIHAPYLANQGWYDITKAFDG
KDNLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLKEAIRTKDSQ
TNSQLFEYFRDKAFPYLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVKRPYQDKDKR
GGIFDAVFTRGNQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKEELTKGRALALSHTYANVSISHVINL
WGADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINKHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFT
LSSGKDIWQKLN

SEQ ID NO: 17 (pCART217)

SVWTKGVTPPEQFTQGEDIHAPYLAHQGWYDITKAFDGDKNLLCGAAMETKHMLHWW
FDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLKAIDTKDSQTNSQLFNYFRDKAFPNSAR
QLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGNQTTLLTAR
HDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGADFNAEGNLEAIYVTDSD
ANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 18 (pCART219)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDIHAPYLAHQGWYDITKAFDG
ADNLLCGAAMETKHMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLKAIDTKDSQ
TNSQLFNYFRDKAFPNSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKR
GGIFDAVFTRGNQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINL
WGADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFT
LSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 19 (pCART226)

SVWTKGVTPPEQFTQGEDIHAPYLAHQGWYDITKAFDGDNLLCGAAMETKMLHWW
FDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLKAIDTKDSQTNSQLFNYFRDKAFPNLSAR
QLGVMPDLVDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKRGGIFDAVFTRGNQTTLLTAR
HDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINLWGADFNAGNLEAIYVTDSD
ANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTLSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 20 (pCART229)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDIHAPYLAHQGWYDITKAFDG
KDNLLCGAAMETKMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFRNQELFDLKAIDTKDSQ
TNSQLFNYFRDKAFPNLSARQLGVMPDLVDMFINGYYLNVFKTQSTDVNRPYQDKDKR
GGIFDAVFTRGNQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISHVINL
WGADFNAGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFT
LSSGKDIWQKLS

SEQ ID NO: 21 (pCART191)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKAF
DGKDNLLCGAAMETKMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEHMFDVKKAITD
KNHQLDSKLFNYFKEKAFPYLSAKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDP
RGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKNKNLNDISTIIKQELTKGKALGLSHTYANVRINHVIN
LWGADFNAGNLEAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGL
FTLSTGQDSWQKLS

SEQ ID NO: 22 (pCART192)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKAF
DGKDNLLCGAAMETKMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEHMFDVKEAIRT
KNHQLDSKLFNYFKEKAFPYLSAKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKKGSKDP
RGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKNKNLNDISTIIKSELTKGKALGLSHTYANVRINHVIN
LWGADFNAGNLEAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQVLGL
FTLSTGQDSWQKLN

SEQ ID NO: 23 (pCART193)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDVFHAPYVANQGWYDITKTF
NGKDDLLCGAAMETKMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIRT
KNHQLDSKLFNYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDP

RGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFFKEKNLKEISDLIKQELTEGKALGLSHTYANVRINHVIN
LWGADFDAEAGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVAAGKVAISAKKIEGENIGAQVLGL
FTLSTGQDSWNQTS

SEQ ID NO: 24 (pCART194)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPLTPEQFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTF
NGKDDLLCGAAMETKMLHWWFDQNKDQIKRYLEENPEKQKINFRGEQMFVDVKEAIRT
KNHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKKGSKDP
RGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFFKEKNLKEISDLIKEELTKGKALGLSHTYANVRINHVIN
LWGADFDAEAGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVAAGKVAISAKKIEGENIGAQVLGL
FTLSTGQDSWNQTN

SEQ ID NO: 25 (pCART205)

DDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPEQFTQGEDVIHAPYVANQGWDITKAFDGD
KDNLLCGAAMETKMLHWWFDQNKDQIKRYLEENPEKQKINFRGEQMFVDVKAIDTKN
HQLDSKLFNYFKEKAFGLSARRIGVFPDHVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPRG
GIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFFKNKNLNDISTIIKQELTKGKALGLSHTYANVSINHVINLW
GADFAEAGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVAAGHVAISAKKIEGENIGAQVLGLFTL
STGQDSWQKLS

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

Получение полипептидов.

Полипептид, рассматриваемый в настоящем описании, может быть получен любыми подходящими средствами. Например, полипептид может быть синтезирован непосредственным образом с помощью стандартных методик, известных в данной области техники, таких как твердофазный синтез с использованием Fmoc (от англ. 9-fluorenylmethoxycarbonyl, т.е. 9-флуоренилметоксикарбонил), твердофазный синтез с использованием Boc (от англ. N-tert-butoxycarbonyl (t-BOC), т.е. N-трет-бутоксикарбонил) или синтезом пептидов в растворе. В альтернативном варианте полипептид может быть получен трансформацией клетки, обычно бактериальной клетки, под действием молекулы нуклеиновой кислоты или вектора, который кодирует этот полипептид. Получение полипептидов экспрессией в бактериальных клетках-хозяевах рассмотрено ниже и раскрыто в примерах. Изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты и векторам, которые кодируют полипептид согласно изобретению. Изобретение также относится к клетке-хозяину, включающей такую нуклеиновую кислоту или вектор. Примеры полинуклеотидных молекул, кодирующих полипептиды, рассматриваемые в настоящем описании, приведены в виде последовательностей SEQ ID NO: 33-55. Каждая из этих последовательностей включает на конце 3' кодон для N-терминального метионина (ATG) и перед терминирующим кодоном (стоп-кодоном) (TAA) на конце 5' кодоны для 3× gly линкера и 6× his гистидиновой метки, которые необязательно могут быть включены.

Согласно настоящему изобретению термины "молекула нуклеиновой кислоты" и "полинуклеотид" используются взаимозаменяемо и относятся к полимерной форме нуклеотидов любой длины, как к дезоксирибонуклеотидам, так и к рибонуклеотидам или их аналогам. Неограничивающие примеры полинуклеотидов включают ген, фрагмент гена, информационную (матричную) РНК (мРНК), кДНК (комплементарную ДНК), рекомбинантные полинуклеотиды, плазмиды, векторы, выделенную ДНК любой последовательности, выделенную РНК любой последовательности, зонды для нуклеиновых кислот и праймеры. Полинуклеотид согласно изобретению может быть предоставлен в выделенной или по существу выделенной форме. "По существу выделенная форма" означает практически полное, но не полное выделение полипептида из любой окружающей среды. Полинуклеотиды могут быть смешаны с носителями или разбавителями, которые не влияют на предполагаемое применение полинуклеотида, но при этом он считается по существу выделенным. Последовательность нуклеиновых кислот, которая "кодирует" выбранный полипептид, представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая *in vivo* транскрибируется (в случае ДНК) и транслируется (в случае мРНК) в полипептид под управлением подходящих регуляторных последовательностей, например, экспрессионного вектора. Границы кодирующей последова-

тельности определяются иницирующим кодоном на 5' концевом участке (амино) и кодоном, терминирующим трансляцию, на 3' (карбоксильном) концевом участке. Для целей настоящего изобретения такие последовательности нуклеиновых кислот могут включать, без ограничений, кДНК, полученную на основе вирусной, прокариотической или эукариотической мРНК, геномные последовательности из вирусной или прокариотической ДНК или РНК и даже синтетические последовательности ДНК. Последовательность окончания транскрипции может находиться в положении 3' к кодирующей последовательности.

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

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

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

Для улучшения получения, выделения или очистки полипептида он может быть модифицирован или из него могут быть получены производные. Например, если полипептид согласно изобретению получают рекомбинантной экспрессией в бактериальной клетке-хозяине, то для улучшения экспрессии последовательность полипептида может включать дополнительный остаток метионина (М) на N-конце. В другом примере полипептид согласно изобретению может быть модифицирован или из него могут быть получены производные присоединением лиганда, который может связываться непосредственно и специфично со средствами разделения. В альтернативном варианте полипептид может быть модифицирован или из него могут быть получены производные присоединением одного члена связывающей пары, и средства разделения включают реагент, который модифицирован или из него получены производные присоединением другого члена связывающей пары. Для указанной цели может быть применена любая подходящая связывающая пара. В одном из предпочтительных примеров осуществления, в котором полипептид, применяемый согласно изобретению, модифицирован или из него получены производные присоединением одного члена связывающей пары, полипептид предпочтительно представляет собой полипептид, меченый гистидином или биотином. Обычно аминокислотную кодирующую последовательность гистидиновой или биотиновой метки включают на генном уровне, и полипептид рекомбинантно экспрессируется микроорганизмами *E.coli*. Гистидиновая или биотиновая метка может находиться на любом конце полипептида, предпочтительно на С-концевом участке. Она может быть непосредственно присоединена к полипептиду или присоединена опосредованно через любую подходящую линкерную последовательность, такую как 3, 4 или 5 остатков глицина. Гистидиновая метка обычно состоит из шести гистидиновых остатков, но может иметь и большую длину, обычно составляющую до 7, 8, 9, 10 или 20 аминокислот или менее, например, включать 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислоту.

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

В данной области техники известно множество модификаций боковой цепи, и они могут быть применены к боковым цепям полипептидов для придания полипептидам дополнительной требуемой активности или характеристик, которые могут быть необходимы согласно настоящему изобретению. Также следует понимать, что полипептиды могут быть химически модифицированы, например, модифицирова-

ны после завершения трансляции. Например, они могут быть подвергнуты гликозилированию, фосфорилированию, или они могут включать модифицированные аминокислотные остатки.

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

Композиции и препараты, включающие полипептиды.

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

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

Такие композиции могут быть приготовлены, упакованы или проданы в виде формы, подходящей для струйного (болюсного) введения или для длительного введения. Инъекционные композиции могут быть приготовлены, упакованы или проданы в виде стандартной лекарственной формы, например, в виде ампул или контейнеров для многократного введения, содержащих консервант. Композиции включают, без ограничений, суспензии, растворы, эмульсии в масляных или водных носителях, пасты и имплантируемые препараты с пролонгированным высвобождением или биоразлагаемые препараты. Такие композиции дополнительно могут включать один или более дополнительных ингредиентов, включающих, без ограничений, суспендирующие, стабилизирующие или диспергирующие агенты. В одном из примеров осуществления композиции для парентерального введения активный ингредиент предоставлен в сухом виде (например, в виде порошка или гранул) для восстановления путем добавления подходящего носителя (например, стерильной воды, не содержащей пирогенов) перед парентеральным введением восстановленной композиции. Композиции могут быть приготовлены, упакованы или проданы в виде стерильной водной или масляной суспензии или раствора для инъекций. Эта суспензия или раствор могут быть приготовлены способами, известными в данной области техники, и кроме активного ингредиента могут включать дополнительные ингредиенты, такие как диспергирующие агенты, смачивающие агенты или суспендирующие агенты, рассмотренные в настоящем описании. Стерильные препараты для инъекций могут быть получены с использованием нетоксичного, приемлемого для парентерального введения разбавителя или растворителя, такого как, например, вода или 1,3-бутандиол. Другие приемлемые разбавители и растворители включают, без ограничений, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия и летучие масла, такие как синтетические моно- или диглицериды.

Другие подходящие для парентерального введения композиции включают композиции, содержащие активный ингредиент в микрокристаллической форме, в виде липосомного препарата или в виде компонента биоразлагаемых полимерных систем. Композиции или имплантаты с пролонгированным высвобождением могут включать фармацевтически приемлемые полимерные или гидрофобные материалы, такие как эмульсии, ионообменная смола, плохо растворимый полимер или плохо растворимую соль. Композиции могут быть подходящими для введения любым подходящим способом, включающим, например, внутрикожное, подкожное, чрескожное, внутримышечное, внутриартериальное, интраперитонеальное, внутрисуставное, внутрикостное (эндостальное) или другое подходящее введение. Предпочтительно композиции подходят для введения посредством внутривенного вливания.

Способы применения полипептидов.

Изобретение относится к применению полипептидов согласно изобретению в различных способах. Например, полипептиды согласно изобретению могут служить полезными инструментами для целей биотехнологии. Полипептиды могут быть применены для специфического *ex vivo* расщепления IgG, в частности человеческого IgG. В таком способе полипептид может быть инкубирован с образцом, содержащим IgG, в условиях, которые позволяют проявляться специфической активности цистеиновой протеазы. Специфическое расщепление может быть подтверждено, и продукты расщепления выделены любым подходящим способом, например способом, рассмотренным в документах WO 2003051914 и WO 2009033670. Таким образом, способ может быть применен, в частности, для образования фрагментов Fc и F(ab')₂. Затем при восстановлении (например, в 2-меркаптоэтаноламина или цистеамине) фрагментов F(ab')₂, которые образуются при расщеплении IgG под действием полипептида согласно изобретению, могут быть получены фрагменты Fab.

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

Полипептиды согласно настоящему изобретению также могут быть применены для лечения или профилактики. При терапевтическом применении полипептиды или композиции вводят субъекту, уже страдающему расстройством или находящемуся в определенном состоянии, в количестве, достаточном для лечения, облегчения или частичной приостановки развития состояния или одного или более его симптомов. Терапевтическое лечение может привести к снижению тяжести симптомов заболевания или увеличению частоты или продолжительности бессимптомных периодов. Количество, достаточное для достижения этого эффекта, называется "терапевтически эффективным количеством". При профилактическом применении полипептиды или композиции вводят субъекту, у которого пока еще не проявляются симптомы расстройства или состояния, в степени, достаточной для предотвращения или остановки развития симптомов. Такое количество называют "профилактически эффективным количеством". Определение риска развития у субъекта заболевания или состояния может быть произведено любыми подходящими средствами. Таким образом, изобретение также относится к полипептиду согласно изобретению, применяемому для лечения человека или животного. Согласно настоящему изобретению также предложен способ профилактики или лечения заболевания или состояния субъекта, где способ включает введение субъекту полипептида согласно изобретению в профилактически или терапевтически эффективном количестве. Полипептид может быть введен совместно с иммунодепрессантом. Полипептид предпочтительно вводят посредством внутривенного вливания, но он может быть введен любым подходящим способом, включающим, например, внутрикожное, подкожное, чрескожное, внутримышечное, внутриартериальное, интраперитонеальное, внутрисуставное, внутрикостное или другое подходящее введение. Вводимое количество полипептида может составлять от 0,01 мг/кг МТ (массы тела) до 2 мг/кг МТ, от 0,04 до 2 мг/кг МТ, от 0,12 МТ до 2 мг/кг МТ, предпочтительно от 0,24 до 2 мг/кг МТ и наиболее предпочтительно от 1 до 2 мг/кг МТ. Полипептид может быть введен одному и тому же субъекту множество раз, при условии, что количество ADA в сыворотке крови субъекта, которые способны связываться с полипептидом, не превышает порогового значения, определяемого лечащим врачом. Количество ADA в сыворотке крови субъекта, которые способны связываться с полипептидом, может быть определено любым подходящим способом, таким как агент-специфическое испытание CAP FEIA (ImmunoCAP) или анализ с определением титров.

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

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

Таблица D

ЗАБОЛЕВАНИЕ	АУТОАНТИГЕНЫ
Болезнь Аддисона	Стероид-21-гидроксилаза, 17-альфа-гидроксилаза (17ОН) и фермент, расщепляющий боковую цепь (P450 _{scs}), тиреопероксидаза, тиреоглобулин и H+/K(+)-
Анти-GMB гломерулонефрит (синдром Гудпасчера)	Антитела к клубочковой базальной мембране (анти-GMB): неколлагеноподобные (NC1) домены альфа-3, альфа-4, альфа-5 (IV) коллагена
Васкулиты, связанные с антителами к цитоплазме нейтрофилов (ANCA-связанный васкулит) (гранулематоз Вегенера, синдром Черджа-Стросс, микроскопический полиангиит)	Миелопероксидаза, протеиназа 3
Анти-NMDAR энцефалит	N-метил-D-аспартат рецептор (англ. N-methyl-D-aspartate receptor, сокращенно NMDAR)
Антифосфолипидный синдром (англ. Anti-Phospholipid Syndrome, сокращенно APS) и катастрофический APS	Отрицательно заряженные фосфолипиды, образующие комплекс с белками плазмы крови, связывающими фосфолипиды (например, бета-2-GPI), кардиолипин, бета-2-гликопротеин I и (бета-2-GPI)
Аутоиммунные буллезные заболевания кожи (пузырчатка). Пузырчатка листовидная (англ. pemphigus foliaceus, сокращенно PF), fogo selvagem (FS) (эндемическая форма), пузырьчатка обыкновенная (англ. pemphigus vulgaris, сокращенно PV)	IgG к кератиноцитам. Специфичной мишенью является десмоглеин (Dsg) 1 (десмосомальные кадгерины)
Аутоиммунная гемолитическая анемия (англ. autoimmune hemolytic anemia, сокращенно AIHA)	Собственные антигены на красных кровяных клетках
Аутоиммунный гепатит (англ. Autoimmune hepatitis, сокращенно AIH)	Актин, антинуклеарное антитело (англ. antinuclear antibody, сокр. ANA), гладкомышечное антитело (англ. smooth muscle antibody сокр. SMA), антитело к микросомам печени и почек (англ. liver/kidney microsomal antibody, сокр. LKM-1), антитела к растворимым печеночным антигенам (англ. anti-soluble liver antigen, сокр. SLA/LP) и

	антимитохондриальное антитело (англ. anti-mitochondrial antibody, сокр. AMA), CYP2D6, CYP2C9-тиениловая кислота, UGT1A, CYP1A2, CYP2A6, CYP3A, CYP2E1, CYP11A1, CYP17 и CYP21
Аутоиммунная нейтропения (англ. Autoimmune neutropenia, сокращенно AIN)	FcγRIIIb
Буллезный пемфигоид (англ. bullous pemphigoid, сокращенно BP)	Полудесмосомальные белки BP230 и BP180 (коллаген типа XVII), ламинин 5, альфа-6 субъединица интегрина альфа-6 бета-4 и p200
Глютеновая болезнь	трансглутаминаза 2 (TG2), трансглутаминаза 3, актин, ганглиозид, коллаген, кальретикулин и зонулин, антигены щитовидной железы, эндокринной ткани поджелудочной железы, антитела против желудка и печени, анти-нуклеарные составляющие, антиретикулиновые антитела, актин, антигены гладких мышц, кальретикулин, десмин, коллагены, антигены костной ткани, антигены ткани мозга, ганглиозид, нейронные антигены, антигены кровеносных сосудов
Хроническая крапивница	Альфа-субъединица высокоаффинного IgE рецептора, IgE
Полная врожденная блокада сердца (англ. complete congenital heart block, сокращенно CCHB)	Ro (антиген A при синдроме Шёгрена (англ. Sjögens syndrome, сокращенно SSA)), La (антиген B при синдроме Шёгрена)
Диабет типа 1A (T1DM)	Аутоантитела островковых клеток (англ. islet cell autoantibodies, сокр. ICA), антитела к инсулину (IAA), декарбоксилаза глутаминовой кислоты (GAA или GAD), протеинтирозинфосфатаза (IA2 или ICA512), связанный с инсулиновой пептид-2. Полагают, что для наилучших прогнозов,

	касающихся проявления диабета, большее значение играет количество антител, а не одно индивидуальное антитело
Приобретенный буллезный эпидермолиз (англ. epidermolysis bullosa acquisita, сокращенно ЕВА)	145-kDa неколлагеновый аминотерминальный (NC-1) домен коллагена VII
Первичная криоглобулинемия смешанного типа	Антигены первичной криоглобулинемии смешанного типа
Синдром Гудпасчера (также называемый болезнью Гудпасчера и геморрагическая интерстициальная пневмония с нефритом)	альфа3(IV) коллаген (или антиген Гудпасчера)
Болезнь Грейвса (Базедова болезнь), включает зоб и гипертиреоз, инфильтратный экзофтальм и инфильтратную дерматопатию.	Тиреотропиновый рецептор (TSHR) тиреоидная пероксидаза (ТПО)
Синдром Гийена-Барре (англ. Guillain-Barré syndrome, сокр. GBS). Острая воспалительная демиелинизирующая полинейропатия (англ. acute inflammatory demyelinating polyneuropathy, сокр. AIDP), острая моторная аксональная нейропатия (англ. acute motor axonal neuropathy, сокр. AMAN)	Ганглиозиды GM1, GM1b, GD1a и GalNAc-GD1a, гликофинголипид, миелиновые белки PMP22 и P0
Гемофилия – приобретенный дефицит FVIII	Фактор VIII
Идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура (англ. idiopathic thrombocytopenic purpura, сокр. ИТП)	Гликопротеин тромбоцитов (англ. platelet glycoprotein, сокр. GP) IIb-IIIa и/или GPIb-IX
Миастенический синдром Итона-	Потенциалозависимые кальциевые каналы

Ламберта (англ. Lambert-Eaton myasthenic syndrome, сокр. LEMS)	
Смешанное заболевание соединительной ткани (англ. mixed connective tissue disease, сокр. MCTD)	IgG, направленный против сплайсингосомы, U1-snRNP
Множественная миелома	Антигены множественной миеломы
Тяжелая миастения, миастенический криз	Ацетилхолиновые рецепторы (AChR), мышечно-специфичная киназа (MuSK)
Миокардит, дилатационная кардиомиопатия (англ. dilated cardiomyopathy, сокр. DCM) (конгестивная кардиомиопатия)	Сердечно-реактивные аутоантитела к множеству антигенов, например, сердечный миозин
Оптиконевромиелит (англ. neuromyelitis optica, сокр. NMO)	Аквапорин 4 (AQP4)
Первичный билиарный цирроз печени (англ. primary biliary cirrhosis, сокр. PBC)	Комплекс (PDC)-E2 пируватдегидрогеназы и другие члены семейства оксалоокислотных дегидрогеназ, гликопротеин-210, p62, sp100
Первичный прогрессирующий рассеянный склероз (англ. primary progressive multiple sclerosis, сокр. PPMS)	Миелиновый олигодендроцитарный гликопротеин (англ. myelin oligodendrocyte glycoprotein, сокр. MOG), миелиновый протеолипидный белок (англ. myelin proteolipid protein, сокр. PLP), транскетолаза (англ. transketolase, сокр. ТК), фосфодиэстераза циклических нуклеотидов типа I (cyclic nucleotide phosphodiesterase type I, сокр. CNPase I), белок-медиатор 2 ответной реакции коллапсина, тубулин бета-4, нейрофасцин
Ревматическое поражение сердца (англ. rheumatic heart disease, сокр. RHD), (ревматическая атака)	Сердечный миозин
Ревматоидный артрит (англ. rheumatoid arthritis, сокр. RA)	Коллаген типа II, цитруллинированные белки (например, (фибриноген, виментин, филагрин, енолаза коллагена типа II,)), G6PI, RFs (анти-

	Fc/IgG), виментин и цитокератин
Сывороточная реакция, иммунокомплексная гиперчувствительность (тип III)	Различные антигены
Синдром Шёгрена (англ. Sjögren Syndrome, сокр. SS)	Ro (антиген A при синдроме Шёгрена (SS-A)), La (антиген B при синдроме Шёгрена (SS-B)), р80 коилин, антинуклеарные антитела, анти-тиреодные, анти-центромерные антитела (феномен Рейно), анти-карбоангидраза II (дистальный почечный канальцевый ацидоз), анти-митохондриальные антитела (патология печени), криоглобулины (развитие до неходжкинской лимфомы), альфа- и бета-фодрин, аутоантиген островковых клеток, полимераза поли(ADP)рибозы (англ. poly(ADP)ribose polymerase, англ. PARP), NuMA, голгины (англ. golgins), NOR-90, M3-мускариновый рецептор
Системная красная волчанка (англ. systemic lupus erythematosus, сокр. SLE), включающая волчаночный нефрит	Аутоантитела к нуклеарным составляющим (например, к двухнитевой ДНК и нуклеосомам), двухнитевая ДНК, PARP, Sm, PCDA, рбосомные Р белки рРНК, C1q
Синдром скованного человека (англ. stiff-person syndrome, сокр. SPS)	Декарбоксилаза глутаминовой кислоты (англ. glutamic acid decarboxylase, сокр. GAD), амфифизин (англ. amphiphysin)
Системный склероз (склеродерма)	ДНК-топоизомераза I (Sci-70), U3 snRNP, U2 snRNP, 7-2 RNP, NOR-90, белки, связанные с центромерами, и нуклеолярные антигены, анти-Th/To, анти-РНК полимераза I/III, анти-ТГФ (тромбоцитарный фактор роста) рецептор, анти-фибриллин-1, M3-мускариновый рецептор
Отторжение трансплантата	Антигены отторжения трансплантата
Тромбоцитопенический акроангиотромбоз (англ. thrombotic thrombocytopenic purpura, сокр. ТТР)	ADAMTS13

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

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

Терапевтическое средство, полезный эффект которого повышают, обычно представляет собой антитело, которое вводят для лечения рака или другого заболевания. Терапевтическое средство может представлять собой IVIg. В контексте этого примера осуществления изобретения, в альтернативном варианте, может рассматриваться как предоставление способа лечения рака или другого заболевания у субъекта, где способ включает: (а) введение субъекту полипептида согласно изобретению; и (б) последующее введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела, которое представляет собой терапию

при раке или другом заболевании, и при этом

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

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

Другими словами, изобретение также относится к полипептиду, предназначенному для применения в таком способе лечения рака или другого заболевания. Изобретение также относится к применению агента при получении медикамента для лечения рака или другого заболевания таким способом. Раковое заболевание может представлять собой острую лимфобластическую лейкемию, острую миелоидную лейкемию, аденокарциному, связанные со СПИД раковые заболевания, связанную со СПИД лимфому, рак анального канала, рак аппендикса, астроцитому, детскую церебеллярную или церебральную базальноклеточную карциному, рак желчевыводящих путей, экстрагепатический рак, рак мочевого пузыря, рак костной ткани, остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому, глиому ствола головного мозга, рак головного мозга, опухоль головного мозга церебеллярную астроцитому, опухоль головного мозга церебрально астроцитому/злокачественную глиому, опухоль головного мозга эпендимому, опухоль головного мозга медуллобластому, опухоль головного мозга - супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, опухоль головного мозга глиому зрительных путей и глиому гипоталамуса, рак груди, аденомы/карциномы бронхов, лимфому Беркитта, карциномную опухоль, карциномную опухоль желудочно-кишечную, карциному неизвестной этиологии, лимфому центральной нервной системы, церебеллярную астроцитому, церебральную астроцитому/злокачественную глиому, рак шейки матки, хроническую лимфоцитарную лейкемию, хроническую миелогенную лейкемию, хронические миелолипролиферативные нарушения, рак толстой кишки, Т-клеточную лимфому кожи, десмопластическую мелкокруглоклеточную опухоль, рак эндометрия, эпендимому, рак пищевода, саркому Юинга семейства опухолей Юинга, экстракраниальную эмбрионально-клеточную опухоль, детскую, экстрагонадную эмбрионально-клеточную опухоль, рак внепеченочного желчного протока, рак глаз, внутриглазную меланому, рак глаз, ретинобластому, рак желчного пузыря, желудочный рак (рак желудка), желудочно-кишечную карциномную опухоль, желудочно-кишечную стромальную опухоль (стромальную опухоль ЖКТ), эмбрионально-клеточную опухоль: экстракраниальную, экстрагонадную или яичников, гестационную трофобластическую опухоль, глиому ствола головного мозга, глиому, детскую церебральную астроцитому, глиому детскую зрительных путей и гипоталамуса, желудочный карциномид, волосатоклеточный лейкоз, рак головы и шеи, рак сердца, печеночно-клеточный рак (рак печени), лимфому Ходжкина, гипоглоточный рак, глиому гипоталамуса и зрительных путей, внутриглазную меланому, карциному островковых клеток (эндокринной ткани поджелудочной железы), саркому Капоши, рак почки (рак почечных клеток), рак гортани, лейкемии, лейкемию острую лимфобластическую (также называемую острой лимфоцитарной лейкемией), лейкемию острую миелоидную (также называемую острой миелогенной лейкемией), лейкемию хроническую лимфоцитарную (также называемую хронической лимфоцитарной лейкемией), лейкемию хроническую миелогенную (также называемую хронической миелоидной лейкемией), лейкоз ворсистых клеток, рак губ и ротовой полости, липосаркому, рак печени (первичный), рак легких, немелкоклеточный рак легких, мелкоклеточный рак легких, лимфомы, лимфому, связанную со СПИД, лимфому Беркитта, лимфому кожи Т-клеточную, лимфому Ходжкина, лимфомы, неходжкинские (по старой классификации - все лимфомы, за исключением лимфомы Ходжкина), лимфому первичную центральной нервной системы, макроглобулинемию Вальденстрема, злокачественную фиброзную гистиоцитому костной ткани/остеосаркому, медуллобластому, меланому, меланому внутриглазную (глаза), карциному из клеток Меркеля, мезотелиому взрослых злокачественную, мезотелиому, метастатический плоскоклеточный рак шеи с бессимптомным возникновением, рак ротовых органов, синдром множественной эндокринной неоплазии, множественную миелому/плазмноклеточную опухоль, фунгоидный микоз, миелодиспластические синдромы, миелодиспластические/миелолипролиферативные заболевания, миелогенную лейкемию хроническую, миелоидную лейкемию острую взрослых, миелоидную лейкемию острую детского возраста, миелому, множественную (рак костного мозга), миелолипролиферативные нарушения, рак носовой полости и околоносовой пазухи, носоглоточную карциному, нейробластому, неходжкинскую лимфому, немелкоклеточный рак легких, рак ротовой полости, ротоглоточный рак, остеосаркому/злокачественную фиброзную гистиоцитому костной ткани, рак яичников, рак эпителия яичников (поверхностная эпителиально-стромальную опухоль), эмбрионально-клеточную опухоль яичников, опухоль яичников с низким злокачественным потенциалом, рак поджелудочной железы, рак островковых клеток поджелудочной железы, рак околоносовой пазухи и носовой полости, рак паращитовидных желез, рак полового члена, фарингеальный рак, феохромоцитому, астроцитому шишковидного тела, герминому шишковидного тела, пинеобластому и супратенториальные примитивные нейроэктодермальные опухоли, аденому гипофиза, плазмноклеточную опухоль/множественную миелому, плевроролечную бластому, первичную лимфому центральной нервной системы, рак предстательной железы, рак прямой кишки, карциному почечных клеток (рак почки), рак почечной лоханки и уретры, переходноклеточный рак, ретинобластому, рабдомиосаркому, рак слюнной железы, саркому семейства опухолей Юинга, саркому Капоши, саркому мягких тканей, саркому матки, синдром Сезари, рак

кожи (немеланоцитарный), рак кожи (меланома), карциному кожи, рак клеток Меркеля, мелкоклеточный рак легких, рак тонкого кишечника, саркому мягких тканей, плоскоклеточную карциному, плоскоклеточный рак шеи с бессимптомным первичным периодом метастатический, рак желудка, супратенториальную примитивную нейроэктодермальную опухоль, Т-клеточную лимфому, кожные раковые заболевания - см. фунгоидный микоз и синдром Сезари, рак яичка, рак горла, тимому, тимому и карциному вилочковой железы, рак щитовидной железы, рак щитовидной железы, переходноклеточный рак почечной лоханки и уретры, трофобластическую опухоль уретры и почечной лоханки, переходноклеточный рак уретры, рак эндометрия матки, саркому матки, вагинальный рак, глиому зрительных путей и гипоталамуса, рак вульвы, макроглобулинемию Вальденстрема и опухоль Вильмса (рак почки).

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

Антитело, вводимое в этапе (b), предпочтительно представляет собой специфический для опухоли антиген, связанный с одним или более перечисленных выше типов раковых заболеваний. Целевые мишени антитела, применяемого в способе, включают CD2, CD3, CD19, CD20, CD22, CD25, CD30, CD32, CD33, CD40, CD52, CD54, CD56, CD64, CD70, CD74, CD79, CD80, CD86, CD105, CD138, CD174, CD205, CD227, CD326, CD340, MUC16, GPNMB, PSMA, Cripto, ED-B, TMEFF2, EphA2, EphB2, FAP, av интегрин, мезотелин, EGFR, METK-72, GD2, CA1X, 5T4, $\alpha 4\beta 7$ интегрин, Her2. Другими мишенями являются цитокины, такие как интерлейкины с IL-1 по IL-13, факторы некроза опухоли α и β , интерфероны α , β и γ , фактор роста опухоли β (англ. tumor growth factor, сокр. TGF- β), фактор, стимулирующий колониеобразование (англ. colony-stimulating factor, сокр. CSF) и гранулоцитарно-моноцитарный фактор, стимулирующий колониеобразование (англ. granulocyte monocyte colony stimulating factor, сокр. GMCSF). См. публикацию Human Cytokines: Handbook for Basic & Clinical Research (Цитокины человека: Руководство по базовым и клиническим исследованиям) (Aggarwal с соавт. Изд. Blackwell Scientific, Boston, MA 1991). Другими мишенями являются гормоны, ферменты и внутриклеточные и внеклеточные мессенджеры, такие как, аденилциклаза, гуанилциклаза и фосфолипаза C. Другими целевыми мишенями являются антигены лейкоцитов, такие как CD20 и CD33. Целевыми мишенями также могут являться лекарственные средства. Молекулами-мишенями могут являться молекулы организма человека, млекопитающего или бактерии. Другими мишенями являются антигены, такие как белки, гликопротеины и углеводы микробных патогенов, как вирусных, так и бактериальных, и опухолей. Другие мишени рассмотрены в документе US 4366241.

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

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

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

Схемы введения могут быть отрегулированы для получения оптимальной требуемой ответной ре-

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

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

Антитело может представлять собой Абагоумаб, Абциксимаб, Атоксумаб, Адалимуаб, Адекатумаб, Афелимоаб, Афутуумаб, Алакизумаб пегол, ALD518, Алемтуумаб, Алирокумаб, Алтумаб пентетат, Амадуксимаб, Анатумаб мафенатокс, Анрукинумаб, Аполиумаб, Аркитумаб, Азелизумаб, Атинумаб, Атлизумаб (или тоцилизумаб), Атородимумаб, Бапинеуумаб, Базиликсимаб, Бавитиксимаб, Бектумаб, Белиумаб, Бенрализумаб, Бертилимумаб, Безилесомаб, Бевацизумаб, Безлостокумаб, Бициромаб, Бимагумаб, Биватуумаб мертанзин, Блинатуумаб, Блосозумаб, Брентиксимаб ведотин, Бриакинумаб, Бродалаумаб, Канакинумаб, Кантуумаб мертанзин, Кантуумаб равтанзин, Каплацизумаб, Капромаб пендетид, Карлумаб, Катумаксаб, CC49, Цеделизумаб, Цертолизумаб пегол, Цетуксимаб, Ch.14.18, Цитатуумаб богатокс, Циксутумаб, Клазакизумаб, Кленоликсимаб, Кливатуумаб тетраксетан, Конатумаб, Концизумаб, Кренезумаб, CR6261, Дацетуумаб, Даклизумаб, Далотуумаб, Даратумаб, Демцизумаб, Деносуаба, Детумаб, Дорлимоаб аритокс, Дроцитумаб, Дулиготумаб, Дупилумаб, Дусигитумаб, Экромексимаб, Экулизумаб, Эдобакомаб, Эдреколомаб, Эфализумаб, Эфунгумаб, Эллотуумаб Элсилимоаб, Энаватуумаб, Энлимоаб пегол, Энокизумаб, Энотикумаб, Энситуксимаб, Эпитумаб цитуксетан, Эпратуумаб, Эрлизумаб, Эртумаксаб, Этарацизумаб, Этролизумаб, Эволокумаб, Эксбивирумаб, Фанолесомаб, Фаралимоаб, Фарлетуумаб, Фасимуаба, FBTA05, Фелвизумаб, Фезакинумаб, Фиклатуумаб, Фигитумаб, Фланвотумаб, Фонтолизумаб, Форалумаб, Форавирумаб, Фрезолиумаб, Фулранумаб, Футуксимаб, Галиксимаб, Ганитумаб, Гантенерумаб, Гавилимоаб, Гемтуумаб озогамин, Гевонизумаб, Гирентуксимаб, Глембатумаб ведотин, Голиумаб, Гомиликсимаб, GS6624, Ибализумаб, Ибритуумаб тиуксетан, Икрукумаб, Иговомаб, Имциромаб, Имгатуумаб, Инклакумаб, Индатуксимаб равтанзин, Инфликсимаб, Интетумаб, Инолимоаб, Инотуумаб озогамин, Ипилиумаб, Иратумаб, Итолизумаб, Иксекизумаб, Келиксимаб, Лабетуумаб, Лампализумаб, Лебрикизумаб, Лемалесомаб, Лерделиумаб, Лексатумаб, Либивирумаб, Лигелизумаб, Линтуумаб, Лирилумаб, Лоделцизумаб, Лорвотуумаб мертанзин, Лукатумаб, Лумиликсимаб, Маратумаб, Маслимоаб, Маврилиумаб, Матуумаб, Меролизумаб, Метелиумаб, Милатуумаб, Минретумаб, Митумаб, Могамулизумаб, Моролиумаб, Мотавизумаб, Моксетумаб пазудотокс, Муромонаб-CD3, Наколомаб тафенатокс, Намилумаб, Наптумаб эстафенатокс, Нарнумаб, Натализумаб, Небакумаб, Нецитумаб, Нерелимоаб, Несвакумаб, Нимотуумаб, Ниволумаб, Нофетумаб мерпантан, Обинутуумаб, Окаратуумаб, Окрелизумаб, Одулимоаб, Офатумаб, Оларатумаб, Олокизумаб, Омализумаб, Онартуумаб, Опортумаб монатокс, Ореговомаб, Ортикумаб, Отеликсизумаб, Окселумаб, Озанезумаб, Озорализумаб, Пагибаксимаб, Паливизумаб, Панитумаб, Панобакумаб, Парсатуумаб, Пасколизумаб, Патекизумаб, Патритумаб, Пемтумаб, Перакизумаб, Пертуумаб, Пекселизумаб, Пидилизумаб, Пинатуумаб ведотин, Пинтумаб, Плакуламаб, Полатуумаб ведотин, Понезумаб, Приликсимаб, Притоксаксимаб, Притумаб, PRO 140, Квилизумаб, Ракотумаб, Радретумаб, Рафивирумаб, Рамуцирумаб, Ранибизумаб, Раксикакумаб, Регавирумаб, Резлизумаб, Рилотумаб, Ритуксимаб, Робатумаб, Роледумаб, Ромосозумаб, Ронтализумаб, Ровелизумаб, Руплизумаб, Самализумаб, Сарилумаб, Сатумаб пендетид, Секукинумаб, Серибантумаб, Сетоксаксимаб, Севирумаб, Сибротуумаб, Сифалимуаба, Силтуксимаб, Симтуумаб, Сиплизумаб, Сирукумаб, Соланезумаб, Солитомаб, Сонепцизумаб, Сонтуумаб, Стамуламаб, Сулесомаб, Сувизумаб, Табалаумаб, Такатуумаб тетраксетан, Тадоцизумаб, Тализумаб, Танезумаб, Таплитумаб паптокс, Тефибазумаб, Телимоаб аритокс, Тенатумаб, тенеликсимаб, Теплизумаб, Тепротумаб, TGN1412, Тицилиумаб (или тремелиумаб), Тилдракизумаб, Тигатуумаб, TNX-650, Тоцилизумаб (или атлизумаб), Торализумаб, Тозитумаб, Тралокинумаб, Трастуумаб, TRBS07, Трегализумаб, Тремелиумаб, Тукотуумаб целмолейкин, Тувирумаб, Ублитуксимаб, Урелумаб, Уртоксумаб, Устекинумаб, Ваталиксимаб, Вателизумаб, Ведолизумаб, Велтуумаб, Вепалимоаб, Весенкумаб, Визилизумаб, Волоциксимаб, Ворсетуумаб мафодотин, Вотумаб, Залутумаб, Занолимуаба, Затуксимаб, Зиралимуаба или Золимоаб аритокс.

Предпочтительные антитела включают Натализумаб, Ведолизумаб, Белиумаб, Атацисепт, Алефа-

септ, Отеликсизумаб, Теплизумаб, Ритуксимаб, Офатумумаб, Окрелизумаб, Эпратузумаб, Алемтузумаб, Абатасепт, Экулизумаб, Омализумаб, Канакинумаб, Меплизумаб, Реслизумаб, Тоцилизумаб, Устекину-маб, Бриакинумаб, Этанерсепт, Инфликсимаб, Адалимумаб, Цертолизумаб пегол, Голимумаб, Трастузумаб, Гемтузумаб, Озогамицин, Ибритумомаб, Тиуксетан, Тоститумомаб, Цетуксимаб, Бевацизумаб, Панитумумаб, Деносуаb, Ипилимумаб, Брентуксимаб и Ведотин.

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

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

Присутствие высокого титра антител к МНС антигенам потенциального донора (т.е. донор-специфических антител (англ. donor specific antibodies, сокр. DSA)) является прямым противопоказанием к трансплантации из-за риска острого отторжения, опосредуемого антителами. Коротко говоря, сенсibilизация к антигенам МНС донора затрудняет поиск подходящего донора. Положительный анализ на перекрестную совместимость является однозначным препятствием для трансплантации. Поскольку приблизительно одна треть пациентов, ожидающих трансплантации почки, сенсibilизированы и 15% из них - высоко сенсibilизированы, это приводит к созданию очереди из пациентов, ожидающих трансплантации. В США среднее время ожидания в списке на трансплантацию почки в 2001-2002 гг. составило 1329 суток для пациентов с показателем в испытании с панель-реактивными антителами (PRA), составляющим 0-9%, 1920 суток для пациентов с показателем PRA 10-79% и 3649 суток для пациентов с показателем PRA 80% или более (база данных OPTN, 2011).

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

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

В альтернативном варианте в контексте этого примера осуществления способ может рассматриваться как способ лечения функциональной недостаточности органа у субъекта, где способ включает: (a) введение субъекту полипептида согласно изобретению, и (b) последующую трансплантацию субъекту замещающего органа, причем

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

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

Другими словами, этот пример осуществления может рассматриваться как способ профилактики отторжения трансплантированного органа у субъекта, в частности профилактики опосредуемого антите-

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

Описание примеров осуществления изобретения.

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

Пример 1. Конструирование, получение и очистка полипептидов.

Производили анализ зрелой молекулы IdeS и идентифицировали области, подходящие для мутации. В некоторых случаях для оценки вероятного исхода мутации применяли анализ *in silico*. После подбора последовательности каждого полипептида кДНК, кодирующую каждый полипептид, получали на устройстве GeneCust, Luxembourg, либо с помощью сайт-направленной мутации исходной последовательности, либо синтезом, зависящим от количества вводимых мутаций. кДНК были секвенированы и перенесены в экспрессионный вектор рЕТ9а (Novagene) в рамке с С-терминальной 6×His меткой, присоединенной к С-концевому участку коротким глициновым линкером (3×Gly). Для улучшения бактериальной экспрессии добавляли N-терминальный метионин. Плазмиды трансформировали (тепловой шок) в *E. coli* BL21 (DE3) (Stratagene) и высевали на планшеты с агарозой LB (Luria-Bertani), содержащей 30 мг/мл канамицина. Отбирали отдельные колонии и в течение ночи производили культивирование (3 мл среды LB) при 37°C, 250 об/мин. На следующий день готовили глицериновые растворы, и в 10 мл ТВ-среды (от англ. Terrific Broth), дополненной 30 мг/мл канамицина и антивспенивателя, производили инокуляцию культивированной в течение ночи культуры и выращивали до достижения OD (optical density) 0,6-0,8 (37°C, 300 об/мин). На этом этапе добавляли IPTG (изопропил-β-D-1-тиогаляктопиранозид, 1 мМ), и культивирование продолжали в течение 1 ч, после чего бактерии собирали центрифугированием. Гранулы промывали в ФСБ (фосфатно-солевом буфере) и замораживали при -20°C. Для лизиса бактерий применяли протокол замораживания-оттаивания (три цикла замораживания/оттаивания, каждый в 1 мл ФСБ), и белки очищали, применяя центрифужные колонки, заранее заполненные Ni-NTA (где NTA означает нитрилтриацетическую кислоту, от англ. nitrilotriacetic acid) (Pierce). После очистки элюированные белки подвергали активации в 10 мМ ДТТ (дитиотреитол), и затем производили обмен буфера (3 объема ФСБ в MWCO 9K Millipore cфг устройства). Чистоту и стабильность каждого белка оценивали способом электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (англ. Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoreses, сокращенно SDS-PAGE) в устройстве из нержавеющей стали для проведения SDS-PAGE анализа 12% Mini-PROTEANOTGX™ precast gel (Biorad).

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

Внутренняя ссылка	Модификации по сравнению с IdeZ (SEQ ID NO: 4) (положения соответствуют SEQ ID NO: 3)	SEQ ID NO
рCART19 7	H84N, N138R, A147E, D150R, N162E, N171Y, N205K, D226N, Q251E, E255K, A312K, S349N	6

pCART19 8	A93T, D95N, Q140E, R165K, D166E, A174T, D226N, L237F, N239E, N243K, N282D, E288K, H315K, K347Q	7
pCART20 0	D36_I53замещениеS31_V48 SEQ 2 т.е. SFSANQEI RYSEVTPYHV замещает DYQRNATE AYAKEVPHQI	8
pCART20 1	D35_T54del	9
pCART20 2	R70T, Y71del, N72Q, N73G	10
pCART20 3	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G	11
pCART20 4	R70T, Y71del	12
pCART20 6	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, F137I	13
pCART20 7	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, N138R	14
pCART20 8	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, F137I, N138R	15
pCART21 0	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, H84N, N138R, N162E, N205K, D226N	16
pCART21 7	D35_T54del, L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, N138R, D226N	17
pCART21 9	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, K97A, N138R, D226N	18
pCART22 6	D35_T54del, L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, K97A, N138R, D226N	19
pCART22 9	L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, N138R, D226N	20
Внутренняя ссылка	Модификации по сравнению с IdeS/Z (SEQ ID NO: 5) (положения соответствуют SEQ ID NO: 3)	SEQ ID NO
pCART19 1	R70T, Y71del, N72Q, N73G, D140E, G171Y, R175K, R176H, I177L, S267R	21
pCART19 2	R70T, Y71del, N72Q, N73G, N138R, D140E, K147E, D150R, N162E, G171Y, R175K, R176H, I177L, E206K, Q249S, K253N, S267R, A310K, S347N	22
pCART19 3	R70T, Y71del, N72Q, N73G, A93T, D95N, N99D, D140E, N141Q, K147E, N162E, G171Y, A174T, R175K, R176H, I177L, N237E, N241K, D242E, T245D, I246L, K253E, S267R, E286K, H311A, H313K, Q344N, K345Q, L346T	23
pCART19 4	R70T, Y71del, N72Q, N73G, A93T, D95N, N99D, N138R, D140E, N141Q, K147E, D150R, N162E, G171Y, A174T, R175K, R176H, I177L, E206K, N237E, N241K, D242E, T245D, I246L, Q249E, S267R, N280D, E286K, A310K, H311A, H313K, Q344N, K345Q, L346T, S347N	24
pCART20 5	L64_65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, F77I, N138R, D140E, N141Q	25

В качестве контрольных веществ применяли варианты IdeS, IdeZ и IdeS/Z, которые были получены

в соответствии с методикой, рассмотренной выше. Согласно настоящему изобретению эти варианты были обозначены pCART124, pCART144 и pCART145 соответственно.

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

Последовательность pCART124 приведена ниже

MDSFSANQEIRYSEVTPYHVTSVWTKGVTPPANFTQGEDVFHAPYVANQGWDITKTFN
GKDDLLCGAAMETKMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGEQMFDVKEAIDTK
NHQLDSKLFYFKEKAFPYLSTKHLGVFPDHDVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSKDPR
GGIFDAVFTRGDQSKLLTSRHDFKEKNLKEISDLIKKELTEGKALGLSHTYANVRINHVINL
WGADFDSDNGNLKAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVSAGKVAISAKEIKEDNIGAQLGLF
TLSTGQDSWNQTNGGGHHHHHH (SEQ ID NO: 26)

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

Последовательность pCART144 приведена ниже

MDDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPLTPEQFRYNNEDVIHAPYLAHQGWYDITK
AFDGKDNLLCGAAMETKMLHWWFDQNKTEIEAYLSKHPEKQKIIFNNQELFDLKAIDT
KDSQTNSQLFNYFRDKAFPNLSARQLGVMPDLVLDMFINGYYLVNFKTQSTDVNRPYQD
KDKRGGIFDAVFTRGDQTTLLTARHDLKNKGLNDISTIIKQELTEGRALALSHTYANVSISH
VINLWGADFNAEGNLEAIYVTDSDANASIGMKKYFVGINAHGHVAISAKKIEGENIGAQL
GLFTLSSGKDIWQKLSGGHHHHHH (SEQ ID NO: 27)

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

Последовательность pCART145 приведена ниже

MDDYQRNATEAYAKEVPHQITSVWTKGVTPPLTPEQFRYNNEDVFHAPYVANQGWDIT
KAFDGKDNLLCGAAMETKMLHWWFDQNKDQIKRYLEEHPEKQKINFNGDHMFVKK
IDTKNHQLDSKLFNYFKEKAFPGLSARRIGVFPDHDVIDMFINGYRLSLTNHGPTPVKEGSK
DPRGGIFDAVFTRGNQSKLLTSRHDFKNKLNLDISTIIKQELTKGKALGLSHTYANVSINH
VINLWGADFNAEGNLEAIYVTDSDSNASIGMKKYFVGVSNAHGHVAISAKKIEGENIGAQL
GLFTLSTGQDSWQKLSGGHHHHHH (SEQ ID NO: 28)

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

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

pCART124 (IdeS; SEQ ID NO: 33)

ATGGAMETKTTTTCTGCTAATCAAGAGATMETKATATTCGGAAGTAACACCTTATCAC
GTTACTTCCGTTTGGACCAAAGGAGTTACTCCTCCAGCAAACCTTCACTCAAGGTGAA
GATGTTTTTACGCTCCTTATGTTGCTAACCAAGGATGGTATGATATTACCAAAACATT
CAATGGAAAAGACGATCTTCTTTGCGGGGCTGCCACAGCAGGGAATATGCTTCACTG
GTGGTTCGATCAAAACAAAGACCAAAATTAACGTTATTTGGAAGAGCATCCAGAAAAG

CAAAAAATAAACTTCAATGGCGAACAGATGTTTGACGTAAAAGAAGCTATCGACACTA
 AAAACCACCAGCMETKAMETKTAAATTATTTGAATATTTTAAAGAAAAAGCTTCCCTT
 ATCTATCTACTAAACACCMETKGAGTTTTCCCTGATCATGTAATTGATATGTTCAATA
 CGGCTACCGCCTMETKTCTAACTAACACGGTCCAACGCCAGTAAAAGAAGGMETKT
 AAAGATCCCCGAGGTGGTATTTTTGACGCCGTATTTACAAGAGGTGATCAAAGTAAG
 CTATTGACAAGTCGTCATGATTTTAAAGAAAAAATCTCAAAGAAATCAGTGATCTCAT
 TAAGAAAGAGTTAACCGAAGGCAAGGCTCMETKGCCTATCACACACCTACGCTAACG
 TACGCATCAACCATGTTATAAACCTGTGGGGAGCTGACTTTGATTCTAACGGGAACC
 TTAAGCTATTTATGTAACAGACTCTGAMETKTAATGCATCTATTGGTATGAAGAAATA
 CTTTGTGGTGTTAATTCCGCTGGAAAAGMETKCTATTTCTGCTAAAGAAATAAAGA
 AGATAATAMETKGTGCTCAAGTACMETKGGTTATTTACACTTTCAACAGGGCAAGAME
 TKTTGGAATCAGACCAATGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART144 (IdeZ; SEQ ID NO: 34)

ATGGACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAAGCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAG
 ATCACTTCTGTATGGACCAAAGGTGTTACACCACTAACACCCGAGCAGTTTCGATATA
 ATAACGAAGATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAGGCTGGTACGATATCA
 CCAAGGCCTTCGATGGGAAGGATAATCTCTTGTTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAAT
 ATGCTGCATTGGTGGTTTGATCAAAATAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAAC
 ACCCTGAAAAGCAAAAAATCATTTTTAACCAACCAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGC
 TATCGATACCAAGGACAGTCAAACCAAMETKTCAGCTTTTTAATTATTTMETKAGATAA
 AGCCTTTCCAAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTATGCCTGATCTTGTTMETKA
 TATGTTTATCAATGGTTACTACTTAAATGTGTTTAAACACAGTCTACTGATGTCAATC
 GACCTTATCAGGACAAGGACAAACGAGGTGGTATTTTCGATGCTGTTTTACCAGAG
 GAGATCAGACAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAAATGA
 CATCAGCACCATTTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCATAT
 ACCTACGCCAATGTMETKCATMETKCCATGTGATTAACCTGTGGGGAGCTGATTTTAA
 TGCTGAAGGAAACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACTCAGATGCTAATGCGTCTAT
 TGGTATGAAAAAATTTTTGTCCGCATTAATGCTCATGGACATGTCGCCATTTCTGCC
 AAGAAAAMETKAAGGAGAAAAACATTGGCGCTCAAGTATMETKGCTTATTTACGCTTTC
 CAGTGGCAAGGACATTTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACC
 ACTAA

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

ATGGATGATTATCAGCGCAACGCGACCGAAGCGTATGCGAAAGAAGTGCCGCATCA
 GATTACCAGCGTGTGGACCAAAGGCGTGACCCCGCTGACCCCGGAACAGTTTCGCT

ATAACAACGAAGATGTGTTTCATGCGCCGTATGTGGCGAACCAGGGCTGGTATGATA
TTACCAAAGCGTTTGATGGCAAAGATAACCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGGGC
AACATGCTGCATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAGATCAGATTAAACGCTATCTGGAAG
AACATCCGGAAAAACAGAAAATTAACCTTTAACGGCGATAACATGTTTGATGTGAAAAA
AGCGATTGATACCAAAAACCATCAGCTGGAMETKCAAACTGTTTAACTATTTTAAAGA
AAAAGCGTTTCCGGGCCTGAGCGCGCGCCGATTGGCGTGTTTCCGGATCATGTGA
TTGATATGTTTATTAACGGCTATCGCCTGAGCCTGACCAACCATGGCCCCGACCCCGG
TGAAAGAAGGCAGCAAAGATCCGCGCGGCGGCATTTTTGATGCGGTGTTTACCCGC
GGCAACCAGAGCAAACCTGCTGACCAGCCGCCATGATTTTAAAAACAAAAACCTGAAC
GATATMETKCAACATTATTAACAGGAACTGACCAAAGGCAAAGCGCTGGGCCTGAG
CCATACCTATGCGAACGTGAGCATTAAACCATGTGATTAACCTGTGGGGCGCGGATTT
TAACGCGGAAGGCAACCTGGAAGCGATTTATGTGACCGAMETKCGAMETKCAACGC
GAGCATTGGCATGAAAAAATATTTTGTGGGCGTGAAACGCGCATGGCCATGTGGCGAT
METKCGCGAAAAAAATTGAAGGCGAAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGCCTGTTTA
CCCTGAGCACCGGCCAGGAMETKCTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCA
CCATCACCCTAA

pCART197 (SEQ ID NO: 36)

ATGGATGATTATCAGCGCAACGCGACCGAAGCGTATGCGAAAGAAGTGCCGCATCA
GATTACCAGCGTGTGGACCAAAGGCGTGACCCCGCTGACCCCGGAACAGTTTCGCT
ATAACAACGAAGATGTGATTATGCGCCGTATCTGGCGAACCAGGGCTGGTATGATA
TTACCAAAGCGTTTGATGGCAAAGATAACCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGGGC
AACATGCTGCATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAACCGAAATTGAAGCGTATCTGAGC
AAACATCCGGAAAAACAGAAAATTATTTTTCGCAACCAGGAACTGTTTGATCTGAAAG
AAGCGATTTCGACCAAAGAMETKCCAGACCAACAGCCAGCTGTTTGAATATTTTCGC
GATAAAGCGTTTCCGTATCTGAGCGCGCGCCAGCTGGGCGTGATGCCGGATCTGGT
GCTGGATATGTTTATTAACGGCTATTATCTGAACGTGTTTAAACCCAGAGCACCGAT
GTGAAACGCCCCGTATCAGGATAAAGATAAACGCGGCGGCATTTTTGATGCGGTGTTT
ACCCGCGGCAACCAGACCACCCTGCTGACCGCGCGCCATGATCTGAAAAACAAAGG
CCTGAACGATATMETKCAACATTATTAAGAAGAACTGACCAAAGGCCGCGCGCTGG
CGCTGAGCCATACCTATGCGAACGTGAGCATMETKCCATGTGATTAACCTGTGGGGC
GCGGATTTTAAACGCGGAAGGCAACCTGGAAGCGATTTATGTGACCGAMETKCGATGC
GAACGCGAGCATTGGCATGAAAAAATATTTTGTGGGCATTAACAAACATGGCCATGT
GGCGATMETKCGCGAAAAAAATTGAAGGCGAAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGC
CTGTTTACCCTGAGCAGCGGCAAAGATATTTGGCAGAACTGAACGGCGGTGGCCA
TCATCACCCTAA

pCART198 (SEQ ID NO: 37)

ATGGATGATTATCAGCGCAACGCGACCGAAGCGTATGCGAAAGAAGTGCCGCATCA
 GATTACCAGCGTGTGGACCAAAGGCGTGACCCCGCTGACCCCGGAACAGTTTCGCT
 ATAACAACGAAGATGTGATTCATGCGCCGTATCTGGCGCATCAGGGCTGGTATGATA
 TTACCAAAACCTTTAACGGCAAAGATAACCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGGGC
 AACATGCTGCATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAACCGAAATTGAAGCGTATCTGAGC
 AAACATCCGGAACAAACAGAAAATTATTTTAAACAACGAAGAACTGTTTGATCTGAAAG
 CGGCGATTGATACCAAAGAMETKCCAGACCAACAGCCAGCTGTTTAACTATTTTAAAG
 AAAAAGCGTTTCCGAACCTGAGCACCCGCCAGCTGGGCGTGATGCCGGATCTGGTG
 CTGGATATGTTTATTAACGGCTATTATCTGAACGTGTTTAAACCCAGAGCACCGATG
 TGAACCGCCCGTATCAGGATAAAGATAAACGCGGCGGCATTTTTGATGCGGTGTTTA
 CCCGCGGCAACCAGACCACCTGCTGACCGCGCGCCATGATTTTAAAGAAAAAGGC
 CTGAAAGATATMETKCACCATTTAAACAGGAACTGACCGAAGGCCGCGCGCTGGC
 GCTGAGCCATACCTATGCGAACGTGAGCATMETKCCATGTGATTAACCTGTGGGGCG
 CGGATTTTGATGCGGAAGGCAACCTGAAAGCGATTTATGTGACCGAMETKCGATGCG
 AACGCGAGCATTGGCATGAAAAATATTTTGTGGGCATTAACGCGCATGGCAAAGTG
 GCGATMETKCGCGAAAAAAATTGAAGGCGAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGCC
 TGTTTACCCTGAGCAGCGGCAAAGATATTTGGCAGCAGCTGAGCGGCGGTGGCCAT
 CATCACCATCACCCTAA

pCART200 (SEQ ID NO: 38)

ATGGAMETKCTTMETKCGCGAACCAAGGAAATTCGCTAMETKCGAAGTGACCCCGTAT
 CATGTGACCAGCGTGTGGACCAAAGGCGTGACCCCGCTGACCCCGGAACAGTTTCG
 CTATAACAACGAAGATGTGATTCATGCGCCGTATCTGGCGCATCAGGGCTGGTATGA
 TATTACCAAAGCGTTTGATGGCAAAGATAACCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGG
 GCAACATGCTGCATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAACCGAAATTGAAGCGTATCTGA
 GCAAACATCCGGAACAAACAGAAAATTATTTTAAACAACCAAGGAACTGTTTGATCTGAA
 AGCGGCGATTGATACCAAAGAMETKCCAGACCAACAGCCAGCTGTTTAACTATTTTC
 GCGATAAAGCGTTTCCGAACCTGAGCGCGCGCCAGCTGGGCGTGATGCCGGATCTG
 GTGCTGGATATGTTTATTAACGGCTATTATCTGAACGTGTTTAAACCCAGAGCACCG
 ATGTGAACCGCCCGTATCAGGATAAAGATAAACGCGGCGGCATTTTTGATGCGGTGT
 TTACCCGCGGCGATCAGACCACCTGCTGACCGCGCGCCATGATCTGAAAAACAAA
 GGCCTGAACGATATMETKCACCATTTAAACAGGAACTGACCGAAGGCCGCGCGCT
 GCGCTGAGCCATACCTATGCGAACGTGAGCATMETKCCATGTGATTAACCTGTGGG
 GCGCGGATTTTAAACGCGGAAGGCAACCTGGAAGCGATTTATGTGACCGAMETKCGAT

GCGAACGCGAGCATTGGCATGAAAAATATTTTGTGGGCATTAAACGCGCATGGCCAT
GTGGCGATMETKCGCGAAAAAATTGAAGGCGAAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGG
GCCTGTTTACCCTGAGCAGCGGCAAAGATATTTGGCAGAAACTGAGCGGCGGTGGC
CATCATCACCATCACCCTAA

pCART201 (SEQ ID NO: 39)

ATGAGCGTGTGGACCAAAGGCGTGACCCCGCTGACCCCGGAACAGTTTCGCTATAA
CAACGAAGATGTGATTCATGCGCCGTATCTGGCGCATCAGGGCTGGTATGATATTAC
CAAAGCGTTTGATGGCAAAGATAACCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGGGCAACA
TGCTGCATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAACCGAAATTGAAGCGTATCTGAGCAAAC
ATCCGGAACAAACAGAAAATTATTTTAAACAACCAGGAACTGTTTGATCTGAAAGCGGC
GATTGATACCAAAGAMETKCCAGACCAACAGCCAGCTGTTTAACTATTTTCGCGATAA
AGCGTTTCCGAACCTGAGCGCGCGCCAGCTGGGCGTGATGCCGGATCTGGTGCTG
GATATGTTTATTAACGGCTATTATCTGAACGTGTTTAAACCCAGAGCACCGATGTGA
ACCGCCCGTATCAGGATAAAGATAAACGCGGCGGCATTTTGTATGCGGTGTTTACCC
GCGGCGATCAGACCACCTGCTGACCGCGCGCCATGATCTGAAAAACAAAGGCCTG
AACGATATMETKACCATTTATTAACAGGAACTGACCGAAGGCCGCGCGCTGGCGCT
GAGCCATACCTATGCGAACGTGAGCATMETKCCATGTGATTAACTGTGGGGCGCG
GATTTTAAACGCGGAAGGCAACCTGGAAGCGATTTATGTGACCGAMETKCGATGCGAA
CGCGAGCATTGGCATGAAAAATATTTTGTGGGCATTAAACGCGCATGGCCATGTGGC
GATMETKCGCGAAAAAATTGAAGGCGAAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGCCTG
TTTACCCTGAGCAGCGGCAAAGATATTTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCA
TCACCATCACCCTAA

pCART202 (SEQ ID NO: 40)

ATGGACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAAGCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAG
ATCACTTCTGTATGGACCAAAGGTGTTACACCACTAACACCCGAGCAGTTTACTCAAG
GTGAAGATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAGGCTGGTACGATATCACCA
AGGCCTTCGATGGGAAGGATAATCTCTTGTTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAATATG
CTGCATTGGTGGTTTGATCAAAATAAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACC
CTGAAAAGCAAAAAATCATTTTAAACAACCAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATC
GATACCAAGGACAGTCAAACCAAMETKTCAGCTTTTTAATTATTTMETKAGATAAAGC
CTTTCCAAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTTGTTMETKATAT
GTTTATCAATGGTTACTACTTAAATGTGTTTAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGAC
CTTATCAGGACAAGGACAAACGAGGTGGTATTTTCGATGCTGTTTTCACCAGAGGAG
ATCAGACAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAATAAAGGACTAAATGACAT

CAGCACCATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATAC
 CTACGCCAATGTMETKCATMETKCCATGTGATTAACCTTGTTGGGAGCTGATTTTAATG
 CTGAAGGAAACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACTCAGATGCTAATGCGTCTATTG
 GTATGAAAAAATATTTTGTGCGCATTAAATGCTCATGGACATGTCGCCATTTCTGCCAA
 GAAAAMETKAAGGAGAAAAACATTGGCGCTCAAGTATMETKGCTTATTTACGCTTTCCA
 GTGGCAAGGACATTTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCAC
 TAA

pCART203 (SEQ ID NO: 41)

ATGGACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAAGCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAG
 ATCACTTCTGTATGGACCAAAGGTGTTACACCACCCGAGCAGTTTACTCAAGGTGAA
 GATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAGGCTGGTACGATATCACCAGGCC
 TTCGATGGGAAGGATAATCTCTTGTTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAATATGCTGCAT
 TGGTGGTTTGATCAAAATAAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAA
 AGCAAAAAATCATTTTTTAACAACCAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATCGATACC
 AAGGACAGTCAAACCAAMETKTCAGCTTTTTAATTATTTMETKAGATAAAGCCTTTCCA
 AATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTTGTTTCMETKATATGTTTATC
 AATGGTTACTACTTAAATGTGTTTAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGACCTTATCA
 GGACAAGGACAAACGAGGTGGTATTTTCGATGCTGTTTTACCAGAGGAGATCAGAC
 AACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAAATGACATCAGCACC
 ATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATACCTACGCCA
 ATGTMETKCATMETKCCATGTGATTAACCTTGTTGGGAGCTGATTTTAATGCTGAAGGA
 AACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACTCAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATGAAAA
 AATATTTTGTGCGCATTAAATGCTCATGGACATGTCGCCATTTCTGCCAAGAAAAMETK
 AAGGAGAAAAACATTGGCGCTCAAGTATMETKGCTTATTTACGCTTTCCAGTGGCAAG
 GACATTTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART204 (SEQ ID NO: 42)

ATGGACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAAGCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAG
 ATCACTTCTGTATGGACCAAAGGTGTTACACCACCCGAGCAGTTTCGATATAATAACG
 AAGATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAGGCTGGTACGATATCACCAGG
 CCTTCGATGGGAAGGATAATCTCTTGTTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAATATGCTGC
 ATTGGTGGTTTGATCAAAATAAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACCCTGA
 AAAGCAAAAAATCATTTTTTAACAACCAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATCGATA
 CCAAGGACAGTCAAACCAAMETKTCAGCTTTTTAATTATTTMETKAGATAAAGCCTTTC
 CAAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTTGTTTCMETKATATGTTTA

TCAATGGTTACTACTTAAATGTGTTTAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGACCTTAT
 CAGGACAAGGACAAACGAGGTGGTATTTTCGATGCTGTTTTACCAGAGGAGATCAG
 ACAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAAATGACATCAGCA
 CCATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATACCTACG
 CCAATGTMETKCATMETKCCATGTGATTAACCTTGTTGGGAGCTGATTTAATGCTGAA
 GGAAACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACTCAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATG
 AAAAAATATTTTGTGGCATTAAATGCTCATGGACATGTCGCCATTTCTGCCAAGAAAA
 METKAAGGAGAAAAACATTGGCGCTCAAGTATMETKGCTTATTTACGCTTTCCAGTGGC
 AAGGACATTTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART206 (SEQ ID NO: 43)

ATGGACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAAGCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAG
 ATCACTTCTGTATGGACCAAAGGTGTTACACCACCCGAGCAGTTTACTCAAGGTGAA
 GATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAGGCTGGTACGATATCACCAGGCC
 TTCGATGGGAAGGATAATCTCTTGTTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAATATGCTGCAT
 TGGTGGTTTGATCAAAATAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAA
 AGCAAAAAATCATTATTAACAACCAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATCGATAC
 CAAGGACAGTCAAACCAAMETKTCAGCTTTTTAATTATTTMETKAGATAAAGCCTTCC
 AAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTATGCCTGATCTTGTTTCMETKATATGTTTAT
 CAATGGTTACTACTTAAATGTGTTTAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGACCTTATC
 AGGACAAGGACAAACGAGGTGGTATTTTCGATGCTGTTTTACCAGAGGAGATCAGA
 CAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAAATGACATCAGCAC
 CATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATACCTACGC
 CAATGTMETKCATMETKCCATGTGATTAACCTTGTTGGGAGCTGATTTAATGCTGAAG
 GAAACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACTCAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATGAA
 AAAATATTTTGTGGCATTAAATGCTCATGGACATGTCGCCATTTCTGCCAAGAAAAAME
 TKAAGGAGAAAAACATTGGCGCTCAAGTATMETKGCTTATTTACGCTTTCCAGTGGCAA
 GGACATTTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART207 (SEQ ID NO: 44)

ATGGACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAAGCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAG
 ATCACTTCTGTATGGACCAAAGGTGTTACACCACCCGAGCAGTTTACTCAAGGTGAA
 GATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAGGCTGGTACGATATCACCAGGCC
 TTCGATGGGAAGGATAATCTCTTGTTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAATATGCTGCAT
 TGGTGGTTTGATCAAAATAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAA
 AGCAAAAAATCATTTTTTCGTAACCAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATCGATAC

CAAGGACAGTCAAACCAAMETKTCAGCTTTTTAATTATTTMETKAGATAAAGCCTTTCC
AAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGTTATGCCTGATCTTGTTTCMETKATATGTTTAT
CAATGGTTACTACTTAAATGTGTTTAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGACCTTATC
AGGACAAGGACAAACGAGGTGGTATTTTCGATGCTGTTTTACCAGAGGAGATCAGA
CAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAAATGACATCAGCAC
CATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATACCTACGC
CAATGTMETKCATMETKCCATGTGATTAACCTTGTTGGGGAGCTGATTTTAATGCTGAAG
GAAACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACTCAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATGAA
AAAATATTTTGTGGCATTAAATGCTCATGGACATGTCGCCATTTCTGCCAAGAAAAME
TKAAGGAGAAAAACATTGGCGCTCAAGTATMETKGCTTATTTACGCTTTCCAGTGGCAA
GGACATTTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART208 (SEQ ID NO: 45)

ATGGACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAAGCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAG
ATCACTTCTGTATGGACCAAAGGTGTTACACCACCCGAGCAGTTTACTCAAGGTGAA
GATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAGGCTGGTACGATATCACCAGGCC
TTCGATGGGAAGGATAATCTCTTGTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAATATGCTGCAT
TGGTGGTTTGATCAAAATAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAA
AGCAAAAAATCATTATTCGTAACCAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATCGATAC
CAAGGACAGTCAAACCAAMETKTCAGCTTTTTAATTATTTMETKAGATAAAGCCTTTCC
AAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGTTATGCCTGATCTTGTTTCMETKATATGTTTAT
CAATGGTTACTACTTAAATGTGTTTAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGACCTTATC
AGGACAAGGACAAACGAGGTGGTATTTTCGATGCTGTTTTACCAGAGGAGATCAGA
CAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAAATGACATCAGCAC
CATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATACCTACGC
CAATGTMETKCATMETKCCATGTGATTAACCTTGTTGGGGAGCTGATTTTAATGCTGAAG
GAAACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACTCAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATGAA
AAAATATTTTGTGGCATTAAATGCTCATGGACATGTCGCCATTTCTGCCAAGAAAAME
TKAAGGAGAAAAACATTGGCGCTCAAGTATMETKGCTTATTTACGCTTTCCAGTGGCAA
GGACATTTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART210 (SEQ ID NO: 46)

ATGGATGATTATCAGCGCAACGCGACCGAAGCGTATGCGAAAGAAGTGCCGCATCA
GATTACCAGCGTGTGGACCAAAGGCGTGACCCCGCCGGAACAGTTTACTCAAGGTG
AAGATGTGATTCATGCGCCGTATCTGGCGAACCAGGGCTGGTATGATATTACCAAAG
CGTTTGATGGCAAAGATAACCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGGGCAACATGCTG

CATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAACCGAAATTGAAGCGTATCTGAGCAAACATCCG
GAAAAACAGAAAATTATTTTCGCAACCAGGAAGTGTGATCTGAAAGAAGCGATTCC
GCACCAAAGAMETKCCAGACCAACAGCCAGCTGTTTGAATATTTTCGCGATAAAGCG
TTTCCGTATCTGAGCGCGCGCCAGCTGGGCGTGATGCCGGATCTGGTGCTGGATAT
GTTTATTAACGGCTATTATCTGAACGTGTTTAAAACCCAGAGCACCGATGTGAAACGC
CCGTATCAGGATAAAGATAAACGCGGCGGCATTTTGTGCGGTGTTTACCCGCGGC
AACCAGACCACCCTGCTGACCGCGCGCCATGATCTGAAAAACAAAGGCCTGAACGA
TATMETKACCATTATTAAGAAGAAGTACCAAAGGCCGCGCGCTGGCGCTGAGCC
ATACCTATGCGAACGTGAGCATMETKCCATGTGATTAACCTGTGGGGCGCGGATTTT
AACGCGGAAGGCAACCTGGAAGCGATTTATGTGACCGAMETKCGATGCGAACGCGA
GCATTGGCATGAAAAAATTTTTGTGGGCATTAACAAACATGGCCATGTGGCGATME
TKCGCGAAAAAATTGAAGGCGAAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGCCTGTTTACC
CTGAGCAGCGGCAAAGATATTTGGCAGAACTGAACGGCGGTGGCCATCATCACCA
TCACCACTAA

pCART217 (SEQ ID NO: 47)

ATGTCTGTATGGACCAAAGGTGTTACACCACCCGAGCAGTTTACTCAAGGTGAAGAT
GTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAGGCTGGTACGATATCACCAAGGCCTTC
GATGGGAAGGATAATCTTGTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAATATGCTGCATTG
GTGGTTTGATCAAAAATAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAAAG
CAAAAAATCATTTTTCGTAACCAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATCGATACCAA
GGACAGTCAAACCAAMETKTCAGCTTTTTAATTATTTMETKAGATAAAGCCTTTCCAAA
TCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTATGCCTGATCTTGTTTCMETKATATGTTTATCAA
TGTTACTACTTAAATGTGTTTAAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGACCTTATCAG
GACAAGGACAAACGAGGTGGTATTTTCGATGCTGTTTTACCAGAGGAAACCAGACA
ACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAAATGACATCAGCACCA
TTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATACCTACGCCAA
TGTMETKCATMETKCCATGTGATTAACCTGTGGGGAGCTGATTTTAATGCTGAAGGAA
ACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACTCAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATGAAAAA
ATATTTTGTGCGCATTAATGCTCATGGACATGTCGCCATTTCTGCCAAGAAAAMETKA
AGGAGAAAACATTGGCGCTCAAGTATMETKGCTTATTTACGCTTTCCAGTGGCAAGG
ACATTTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCACTAA

pCART219 (SEQ ID NO: 48)

ATGGACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAAGCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAG
ATCACTTCTGTATGGACCAAAGGTGTTACACCACCCGAGCAGTTTACTCAAGGTGAA

GATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAGGCTGGTACGATATCACCAAGGCC
 TTCGATGGGGCGGATAATCTCTTGTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAATATGCTGCAT
 TGGTGGTTTGATCAAAAATAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAA
 AGCAAAAAATCATTTTTTCGTAACCAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATCGATAC
 CAAGGACAGTCAAACCAAMETKTCAGCTTTTTTAATTATTTMETKAGATAAAGCCTTTCC
 AAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTTGTTTCMETKATATGTTTAT
 CAATGGTTACTACTTAAATGTGTTTTAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGACCTTATC
 AGGACAAGGACAAACGAGGTGGTATTTTCGATGCTGTTTTACCAGAGGAAATCAGA
 CAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAAATGACATCAGCAC
 CATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATACCTACGC
 CAATGTMETKCATMETKCCATGTGATTAACCTGTGGGGAGCTGATTTTAATGCTGAAG
 GAAACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACTCAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATGAA
 AAAATATTTTGTGGCATTAAATGCTCATGGACATGTCGCCATTTCTGCCAAGAAAAME
 TKAAGGAGAAAACATTGGCGCTCAAGTATMETKGCTTATTTACGCTTTCCAGTGCGCAA
 GGACATTTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART226 (SEQ ID NO: 49)

ATGTCTGTATGGACCAAAGGTGTTACACCACCCGAGCAGTTTACTCAAGGTGAAGAT
 GTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAGGCTGGTACGATATCACCAAGGCCTTC
 GATGGGGCGGATAATCTCTTGTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAATATGCTGCATTG
 GTGGTTTGATCAAAAATAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAAAG
 CAAAAATCATTTTTTCGTAACCAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATCGATACCAA
 GGACAGTCAAACCAAMETKTCAGCTTTTTTAATTATTTMETKAGATAAAGCCTTTCCAAA
 TCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTTGTTTCMETKATATGTTTATCAA
 TGGTTACTACTTAAATGTGTTTTAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGACCTTATCAG
 GACAAGGACAAACGAGGTGGTATTTTCGATGCTGTTTTACCAGAGGAAATCAGACA
 ACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAAATGACATCAGCACCA
 TTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATACCTACGCCAA
 TGTMETKCATMETKCCATGTGATTAACCTGTGGGGAGCTGATTTTAATGCTGAAGGAA
 ACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACTCAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATGAAAAA
 ATATTTTGTGGCATTAAATGCTCATGGACATGTCGCCATTTCTGCCAAGAAAAMETKA
 AGGAGAAAACATTGGCGCTCAAGTATMETKGCTTATTTACGCTTTCCAGTGCGCAAGG
 ACATTTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART229 (SEQ ID NO: 50)

ATGGACGATTACCAAAGGAATGCTACGGAAGCTTATGCCAAAGAAGTACCACATCAG
ATCACTTCTGTATGGACCAAAGGTGTTACACCACCCGAGCAGTTTACTCAAGGTGAA
GATGTGATCCATGCGCCATATCTTGCTCATCAAGGCTGGTACGATATCACCAAGGCC
TTCGATGGGAAGGATAATCTCTTGTGTGGCGCAGCAACGGCAGGTAATATGCTGCAT
TGGTGGTTTGATCAAAATAAAACAGAGATTGAAGCCTATTTAAGTAAACACCCTGAAA
AGCAAAAAATCATTTTTTCGTAACCAAGAGCTATTTGATTTGAAAGCTGCTATCGATAC
CAAGGACAGTCAAACCAAMETKTCAGCTTTTTAATTATTTMETKAGATAAAGCCTTTCC
AAATCTATCAGCACGTCAACTCGGGGTTATGCCTGATCTTGTTMETKATATGTTTAT
CAATGGTTACTACTTAAATGTGTTTAAAAACACAGTCTACTGATGTCAATCGACCTTATC
AGGACAAGGACAAACGAGGTGGTATTTTCGATGCTGTTTTACCAGAGGAAACCAGA
CAACGCTCTTGACAGCTCGTCATGATTTAAAAAATAAAGGACTAAATGACATCAGCAC
CATTATCAAGCAAGAACTGACTGAAGGAAGAGCCCTTGCTTTATCACATACCTACGC
CAATGTMETKCATMETKCCATGTGATTAACCTTGTTGGGGAGCTGATTTTAATGCTGAAG
GAAACCTTGAGGCCATCTATGTCACAGACTCAGATGCTAATGCGTCTATTGGTATGAA
AAAATATTTTGTGGCATTAAATGCTCATGGACATGTCGCCATTTCTGCCAAGAAAAME
TKAAGGAGAAAACATTGGCGCTCAAGTATMETKGCTTATTTACGCTTTCCAGTGCGCAA
GGACATTTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCCTAA

pCART191 (SEQ ID NO: 51)

ATGGATGATTATCAGCGCAACGCGACCGAAGCGTATGCGAAAGAAGTGCCGCATCA
GATTACCAGCGTGTGGACCAAAGGCGTGACCCCGCTGACCCCGGAACAGTTTACCC
AGGGCGAAGATGTGTTTCATGCGCCGTATGTGGCGAACCAGGGCTGGTATGATATTA
CCAAAGCGTTTGATGGCAAAGATAACCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGGGCAAC
ATGCTGCATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAGATCAGATTAAACGCTATCTGGAAGAAC
ATCCGGAAAAACAGAAAATTAACCTTTAACGGCGAAAACATGTTTGATGTGAAAAAGC
GATTGATACCAAAAACCATCAGCTGGAMETKCAAACCTGTTTAACTATTTTAAAGAAAAA
GCGTTTTCCGTATCTGAGCGCGAAACATCTGGGCGTGTTCGGGATCATGTGATTGAT
ATGTTTATTAACGGCTATCGCCTGAGCCTGACCAACCATGGCCCGACCCCGGTGAAA
GAAGGCAGCAAAGATCCGCGCGGCGGCATTTTTGATGCGGTGTTTACCCGCGGCAA
CCAGAGCAAACCTGCTGACCAGCCGCCATGATTTTAAAAACAAAACCTGAACGATAT
METKCAACATTATTAACAGGAACTGACCAAAGGCAAAGCGCTGGGCCTGAGCCATA
CCTATGCGAACGTGCGCATTAACCATGTGATTAACCTGTGGGGCGCGGATTTTAAACG
CGGAAGGCAACCTGGAAGCGATTTATGTGACCGAMETKCGAMETKCAACGCGAGCA
TTGGCATGAAAAATATTTTGTGGGCGTGAACGCGCATGGCCATGTGGCGATMETKC
GCGAAAAAAATTGAAGGCGAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGCCTGTTTACCCT

GAGCACCGGCCAGGAMETKCTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCAT
CACCACTAA

pCART192 (SEQ ID NO: 52)

ATGGATGATTATCAGCGCAACGCGACCGAAGCGTATGCGAAAGAAGTGCCGCATCA
GATTACCAGCGTGTGGACCAAAGGCGTGACCCCGCTGACCCCGGAACAGTTTACCC
AGGGCGAAGATGTGTTTCATGCGCCGTATGTGGCGAACCAGGGCTGGTATGATATTA
CCAAAGCGTTTTGATGGCAAAGATAACCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGGGCAAC
ATGCTGCATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAGATCAGATTAACGCTATCTGGAAGAAC
ATCCGGAAAAACAGAAAATTAACCTTTCGCGGCGAAAACATGTTTGATGTGAAAGAAG
CGATTGCGACCAAAAAACCATCAGCTGGAMETKCAAACTGTTTGAATATTTTAAAGAAA
AAGCGTTTCCGTATCTGAGCGCGAAACATCTGGGCGTGTTTCCGGATCATGTGATTG
ATATGTTTATTAACGGCTATCGCCTGAGCCTGACCAACCATGGCCCGACCCCGGTGA
AAAAAGGCAGCAAAGATCCGCGCGGCGGCATTTTTGATGCGGTGTTTACCCGCGGC
AACCAGAGCAAACCTGCTGACCAGCCGCCATGATTTTAAAAACAAAAACCTGAACGAT
ATMETKACCAATTATTAAGCGAACTGACCAACGGCAAAGCGCTGGGCCTGAGCCA
TACCTATGCGAACGTGCGCATTAACCATGTGATTAACCTGTGGGGCGCGGATTTTAA
CGCGGAAGGCAACCTGGAAGCGATTTATGTGACCGAMETKCGAMETKCAACGCGAG
CATTGGCATGAAAAAATATTTGTGGGCGTGAACAAACATGGCCATGTGGCGATMET
KCGCGAAAAAAATTGAAGGCGAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGCCTGTTTACC
CTGAGCACCGGCCAGGAMETKCTGGCAGAACTGAACGGCGGTGGCCATCATCACC
ATCACCACTAA

pCART193 (SEQ ID NO: 53)

ATGGATGATTATCAGCGCAACGCGACCGAAGCGTATGCGAAAGAAGTGCCGCATCA
GATTACCAGCGTGTGGACCAAAGGCGTGACCCCGCTGACCCCGGAACAGTTTACCC
AGGGCGAAGATGTGTTTCATGCGCCGTATGTGGCGAACCAGGGCTGGTATGATATTA
CCAAAACCTTTAACGGCAAAGATGATCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGGGCAAC
ATGCTGCATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAGATCAGATTAACGCTATCTGGAAGAAC
ATCCGGAAAAACAGAAAATTAACCTTTAACGGCGAACAGATGTTTGATGTGAAAGAAGC
GATTGATACCAAAAACCATCAGCTGGAMETKCAAACTGTTTGAATATTTTAAAGAAAAA
GCGTTTCCGTATCTGAGCACCAAACATCTGGGCGTGTTTCCGGATCATGTGATTGAT
ATGTTTATTAACGGCTATCGCCTGAGCCTGACCAACCATGGCCCGACCCCGGTGAAA
GAAGGCAGCAAAGATCCGCGCGGCGGCATTTTTGATGCGGTGTTTACCCGCGGCAA
CCAGAGCAAACCTGCTGACCAGCCGCCATGATTTTAAAGAAAAAAACCTGAAAGAAAT
METKCGATCTGATTAACAGGAACCTGACCGAAGGCAAAGCGCTGGGCCTGAGCCAT

ACCTATGCGAACGTGCGCATTAAACCATGTGATTAACCTGTGGGGCGCGGATTTTGAT
GCGGAAGGCAACCTGAAAGCGATTTATGTGACCGAMETKCGAMETKCAACGCGAGC
ATTGGCATGAAAAAATATTTTGTGGGCGTGAACGCGGCGGGCAAAGTGGCGATMETK
CGCGAAAAAATTGAAGGCGAAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGCCTGTTTACCC
TGAGCACCGGCCAGGAMETKCTGGAACCAGACCAGCGGCGGTGGCCATCATCACCA
TCACCACTAA

pCART194 (SEQ ID NO: 54)

ATGGATGATTATCAGCGCAACGCGACCGAAGCGTATGCGAAAAGAAGTGCCGCATCA
GATTACCAGCGTGTGGACCAAAGGCGTGACCCCGCTGACCCCGGAACAGTTTACCC
AGGGCGAAGATGTGTTTCATGCGCCGTATGTGGCGAACCAGGGCTGGTATGATATTA
CCAAAACCTTTAACGGCAAAGATGATCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGGGCAAC
ATGCTGCATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAGATCAGATTAAACGCTATCTGGAAGAAG
ATCCGGAAAAACAGAAAATTAACCTTCGCGGCGAACAGATGTTTGATGTGAAAAGAAG
CGATTTCGCACCAAAAACCATCAGCTGGAMETKCAAACTGTTTGAATATTTTAAAGAAA
AAGCGTTTCCGTATCTGAGCACCAAAACATCTGGGCGTGTTTCCGGATCATGTGATTG
ATATGTTTATTAACGGCTATCGCCTGAGCCTGACCAACCATGGCCCGACCCCGGTGA
AAAAAGGCAGCAAAGATCCGCGCGGCGGCATTTTTGATGCGGTGTTTACCCGCGGC
AACCAGAGCAAACCTGCTGACCAGCCGCCATGATTTTAAAGAAAAAACCTGAAAGAA
ATMETKCGATCTGATTAAAGAAGAACTGACCAAAGGCAAAGCGCTGGGCCTGAGCCA
TACCTATGCGAACGTGCGCATTAAACCATGTGATTAACCTGTGGGGCGCGGATTTTGA
TGCGGAAGGCAACCTGAAAGCGATTTATGTGACCGAMETKCGAMETKCAACGCGAG
CATTGGCATGAAAAAATATTTTGTGGGCGTGAACAAAGCGGGCAAAGTGGCGATMET
KCGCGAAAAAATTGAAGGCGAAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGCCTGTTTACC
CTGAGCACCGGCCAGGAMETKCTGGAACCAGACCAACGCGGTGGCCATCATCACCA
ATCACCACTAA

pCART205 (SEQ ID NO: 55)

ATGGATGATTATCAGCGCAACGCGACCGAAGCGTATGCGAAAAGAAGTGCCGCATCA
GATTACCAGCGTGTGGACCAAAGGCGTGACCCCGCCGGAACAGTTTACTCAAGGTG
AAGATGTGATTCATGCGCCGTATGTGGCGAACCAGGGCTGGTATGATATTACCAAAG
CGTTTGATGGCAAAGATAACCTGCTGTGCGGCGCGGCGACCGCGGGCAACATGCTG
CATTGGTGGTTTGATCAGAACAAAGATCAGATTAAACGCTATCTGGAAGAACATCCG
GAAAAACAGAAAATTAACCTTCGCGGCGAACAGATGTTTGATGTGAAAAAAGCGATTG
ATACCAAAAACCATCAGCTGGAMETKCAAACTGTTTAACTATTTTAAAGAAAAAGCGTT
TCCGGGCCTGAGCGCGCGCCGATTGGCGTGTTTCCGGATCATGTGATTGATATGT
TTATTAACGGCTATCGCCTGAGCCTGACCAACCATGGCCCGACCCCGGTGAAAGAA
GGCAGCAAAGATCCGCGCGGCGGCATTTTTGATGCGGTGTTTACCCGCGGCAACCA
GAGCAAACCTGCTGACCAGCCGCCATGATTTTAAAAACAAAACCTGAACGATATMETK
CACCATTATTAACAGGAACTGACCAAAGGCAAAGCGCTGGGCCTGAGCCATACCTA
TGCGAACGTGAGCATTAAACCATGTGATTAACCTGTGGGGCGCGGATTTTAAACGCGGA
AGGCAACCTGGAAGCGATTTATGTGACCGAMETKCGAMETKCAACGCGAGCATTGG
CATGAAAAAATATTTTGTGGGCGTGAACGCGCATGGCCATGTGGCGATMETKCGCGA
AAAAATTGAAGGCGAAAAACATTGGCGCGCAGGTGCTGGGCCTGTTTACCCGAGC
ACCGGCCAGGAMETKCTGGCAGAACTGAGCGGCGGTGGCCATCATCACCATCACCA
ACTAA

Пример 2.
Оценка активности (эффективности расщепления IgG).
ELISA.

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

Эталонный IdeS BX1001865 (белок для сравнения) был приготовлен в виде серии титрования при поэтапном разведении 1:2 от концентрации 320 до 0,16 нМ, на основании чего была построена стандартная калибровочная кривая для анализа. Результаты, полученные при анализе множества известных концентраций каждого из испытуемых полипептидов, сравнивали с линейным участком калибровочной кривой, определяя концентрацию эталонного IdeS, при которой достигается такая же активность. Делением известной концентрации каждого полипептида на определяемую эквивалентную концентрацию эталонного IdeS, полученную из кривой, определяли показатель, который представлял собой кратность изменения активности по сравнению с эталонным IdeS BX1001865. Например, если действие 5 нМ испытуемого полипептида приводит к результату, эквивалентному действию 10 нМ эталонного IdeS по калибровочной кривой, то активность испытуемого полипептида в 2 раза превышает активность эталонного IdeS BX1001865. Средний показатель кратности активности по сравнению с эталонным IdeS BX1001865 вычисляют из всех показателей, полученных при различных концентрациях для каждого из испытуемых полипептидов, при условии, что они находятся на линейном участке калибровочной кривой. Этот средний показатель затем сравнивают со средним показателем, полученным для pCART124 эталонного IdeS, который включали в каждый планшет для сравнения результатов, полученных на различных планшетах. Средний показатель для pCART124 делят на средний показатель, полученный для испытуемого полипептида, получая "отношение pCART124", которое, по существу, представляет собой отношение активности каждого полипептида к активности IdeS. Отношение pCART124 затем может быть визуально представлено с помощью гистограммы.

Краткое описание лабораторного протокола. На лунки планшетов для множественного титрования наносили BSA (10 мг/мл) и выдерживали в течение ночи, затем промывали с ФСБ-Т (фосфатно-солевым буфером с добавлением Tween) и блокировали в течение 1 ч добавлением 2% желатина из шкуры рыб в ФСБ. Полипептид IdeS BX1001865 получали в виде серии титрования при поэтапном разведении 1:2 ФСБ, содержащим 0,1% желатина, от концентрации 320 до 0,16 нМ. Затем подготавливали испытуемые полипептиды и контрольный pCART124 в концентрациях 15, 7,5, 3,75 и 1,9 нМ в ФСБ, содержащем 0,1% желатина. В каждую лунку, содержащую в качестве субстрата 50 мкл анти-BSA кролика (ACRIS, #R1048P, 10 нМ), добавляли 50 мкл образца полипептида. Планшеты подвергали инкубации при комнатной температуре в течение 1 ч и затем промывали ФСБ-Т. В качестве идентифицирующего антитела добавляли биотинилированное антикроличье Fc-специфическое антитело козы (30000-кратное разбавление) и инкубировали в течение 30 мин. Планшет промывали, добавляли разведенную в 40000 раз пероксидазу SA хрена (англ. SA-Horseradish Peroxidase, сокращенно HRP; Pierce) и инкубировали в течение 30 мин. Планшеты промывали и проявляли с помощью ТМБ (тетраметилбензидинового) однокомпонентного хромогенного субстрата для HRP в течение 7 мин, останавливая добавлением 0,5М H₂SO₄. Поглощение (OD, т.е. оптическую плотность, от англ. optical density) измеряли при λ , равном 450 нм. Для каждого испытуемого полипептида и для pCART124 определяли средние показатели кратности активности по сравнению с BX1001865. Затем, как описано выше для каждого испытуемого полипептида вычисляли "отношение pCART124".

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

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

Результаты, полученные при исследовании pCART202, 203 и 204, представлены на фиг. 2. В част-

ности, активность pCART203 приблизительно в 3,5 раза превышает активность IdeS. Активность pCART202 превышает активность IdeS таким образом, что отношение их активностей составляет от 1 до 1,5. pCART204 имеет активность, сравнимую с активностью pCART144.

Визуальное представление картин расщепления IgG.

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

Для испытаний с чистым IgG каждый испытуемый полипептид или контрольное вещество поэтапно разводили в отношении 1:3 в серии титрования от концентрации 6,7 мг/мл до 0,04 нг/мл в ФСБ, содержащем 0,05% BSA в качестве поддерживающего белка. 25 мкл каждой концентрации переносили в планшеты для множественного титрования и начинали реакцию расщепления, добавляя 25 мкл либо препарата Humira, либо препарата XGEVA (2 мг/мл). Таким образом, каждую из исходных концентраций полипептида в лунке разбавляли в отношении 1:2, получая серию титрования с концентрациями от 3,3 мг/мл до 0,02 нг/мл.

Для испытаний с IVIg каждый испытуемый полипептид или контрольное вещество поэтапно разводили в отношении 1:2 в серии титрования от концентрации 30 мг/мл до 0,015 нг/мл в ФСБ, содержащем 0,05% BSA в качестве поддерживающего белка. 25 мкл каждой концентрации переносили в планшеты для множественного титрования и начинали реакцию расщепления, добавляя 25 мкл 10 мг/мл IVIg. Таким образом, каждую из исходных концентраций полипептида в лунке разбавляли в отношении 1:2, получая титруемую серию концентраций от 15 мг/мл до 0,0075 нг/мл.

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

На фиг. 3 представлены картины расщепления, полученные на субстрате IgG1 при использовании pCART202, 203 и 204 в сравнении с обоими контрольными веществами IdeS (pCART124 и BX1001865) и IdeZ (pCART144). Концентрации ферментов составляли от 3,33 мг/мл (дорожка 1) до 0,02 нг/мл (дорожка 12) при поэтапном серийном разведении в отношении 1:3. Действие интактного адалимуаба (без фермента) показано дорожкой 13. Стрелками справа показаны различные продукты расщепления, получаемые из IgG. Стрелка 1: Интактный IgG; стрелка 2: scIgG (однократно расщепленный (англ. single cleaved) IgG - получен при расщеплении первой тяжелой цепи IgG); стрелка 3: фрагмент F(ab')₂ (получен при расщеплении второй тяжелой цепи IgG). Вертикальные линии были добавлены для облегчения сравнения при проведении расщепления первой тяжелой цепи IgG, при котором интактный IgG превращается в scIgG (между дорожками 6 и 7), и при проведении расщепления второй тяжелой цепи IgG, при котором scIgG превращается во фрагмент F(ab')₂ (между дорожками 2 и 3).

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

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

Таким образом, в целом, на фиг. 3 показано, что внесение в последовательность IdeZ следующих изменений: R70T, Y71del, N72Q, N73G, которые имеются в pCART202 и pCART203, повышает эффек-

тивность расщепления второй тяжелой цепи IgG по сравнению с pCART144 (IdeZ). Кроме того, как видно из действия pCART203, введение L64_T65del модификации также повышает эффективность расщепления первой тяжелой цепи.

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

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

Однако pCART144 (IdeZ) хуже расщепляет вторую тяжелую цепь IgG по сравнению с IdeS (BX1001865 и pCART124). Это приводит к образованию более интенсивной полосы scIgG (стрелка 2) на дорожке 5 (1,9 нг/мл фермента), а также на дорожках 4 и 3 по сравнению с действием IdeS, в результате которого расщепление продолжается до появления полос F(ab')₂ (стрелка 3) уже на следующем этапе титрования (дорожка 4, 3,75 мг/мл). Следует отметить, что при расщеплении на втором участке эффективность pCART203 сравнима с эффективностью IdeS (BX1001865 и pCART124) (дорожки 2, 3 и 4), и превышает эффективность расщепления под действием IdeS и IdeZ (pCART144) на первом участке расщепления (дорожка 7).

Фермент pCART203 демонстрирует расщепление IgG при концентрации 0,5 нг/мл (дорожка 7), а при концентрации приблизительно 0,9 нг/мл в основном образуется scIgG (стрелка 2) (дорожка 6). Это соответствует 2-кратной эффективности по сравнению с IdeS, под действием которого расщепление начинается при его концентрации, составляющей 0,9 нг/мл (дорожка 6), и полоса scIgG становится доминирующей при концентрации 1,9 нг/мл (дорожка 5). В целом, на фиг. 4 показано, что внесение в структуру IdeZ модификаций L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q и N73G повышает эффективность расщепления человеческого IgG даже в присутствии нейтрализующих ADA. Это видно при сравнении действия pCART203 с действием IdeS.

На фиг. 5 представлены картины расщепления, полученные на субстрате IgG1 при использовании pCART205, 206, 207, 208 и 210, в сравнении с обоими контрольными IdeS (pCART124 и BX1001865) и IdeZ (pCART144). Концентрации ферментов снижали при поэтапном серийном разведении в отношении 1:3 от 3,33 мг/мл (дорожка 1) до 0,02 нг/мл (дорожка 12). Стрелками справа показаны различные продукты расщепления, получаемые из IgG. Стрелка 1: интактный IgG; стрелка 2: scIgG (однократно расщепленный IgG - получен при расщеплении первой тяжелой цепи IgG); стрелка 3: фрагмент F(ab')₂ (получен при расщеплении второй тяжелой цепи IgG). Вертикальные линии были добавлены для облегчения сравнения при проведении расщепления первой тяжелой цепи IgG, при котором интактный IgG превращается в scIgG (между дорожками 6 и 7), и при проведении расщепления второй тяжелой цепи IgG, при котором scIgG превращается во фрагмент F(ab')₂ (между дорожками 2 и 3).

Фермент pCART205 проявляет повышенную активность по сравнению с pCART144 (IdeZ) в расщеплении обеих тяжелых цепей IgG (дорожки 6 и 3), что приводит к образованию более интенсивной полосы scIgG (стрелка 2, дорожка 6), очень слабой полосы интактного IgG (стрелка 1, дорожка 6) и более интенсивной полосы F(ab')₂ (стрелка 3, дорожка 3) по сравнению с действием pCART144 (IdeZ) (дорожка 6 и 3). Однако в этом эксперименте в отсутствие нейтрализующих ADA (в отличие от ситуации, показанной на фиг. 4), активность IdeS (pCART124) при расщеплении чистого IgG1 оказывается более высокой, чем активность pCART205.

Оба полипептида pCART207 и pCART210 проявляют повышенную IgG эффективность при расщеплении по сравнению с обоими IdeS (pCART124) и IdeZ (pCART144) (первое расщепление - дорожка 7 и второе расщепление - дорожка 3). Наибольшей эффективностью обладает фермент pCART207 - его эф-

эффективность расщепления обеих тяжелых цепей IgG приблизительно в 3 раза превышает эффективность IdeS (pCART124). Полное превращение в scIgG (стрелка 2) под действием pCART124 происходит при его концентрации, составляющей 14 нг/мл (дорожка 6), в то время как в присутствии pCART207 единственная полоса scIgG (стрелка 2) появляется уже при концентрации 4,6 нг/мл (дорожка 7). Повышение эффективности pCART207 по сравнению с pCART124 наблюдается при расщеплении второй тяжелой цепи IgG. Полоса F(ab')₂ (стрелка 3) более интенсивно проявляется при концентрации pCART207, составляющей 41 нг/мл (дорожка 4), чем в присутствии pCART124 в концентрации 0,37 мг/мл (дорожка 3).

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

На фиг. 6 представлены картины расщепления, полученные на субстрате IgG2 при использовании pCART203, 205, 206, 207, 208 и 210 в сравнении с обоими контрольными IdeS (pCART124 и BX1001865) и IdeZ (pCART144). Концентрации ферментов изменяли в диапазоне от 3,33 мг/мл (дорожка 1) до 0,02 нг/мл (дорожка 12) при поэтапном серийном разведении в отношении 1:3. Стрелками справа показаны различные продукты расщепления, получаемые из IgG. Стрелка 1: интактный IgG; стрелка 2: scIgG (однократно расщепленный IgG - получен при расщеплении первой тяжелой цепи IgG); стрелка 3: фрагмент F(ab')₂ (получен при расщеплении второй тяжелой цепи IgG). Вертикальные линии были добавлены для облегчения сравнения при проведении расщепления первой тяжелой цепи IgG, при котором интактный IgG превращается в scIgG (между дорожками 6 и 7), и при проведении расщепления второй тяжелой цепи IgG, при котором scIgG превращается во фрагмент F(ab')₂ (между дорожками 2 и 3).

Эффективность обоих ферментов pCART203 и pCART207 приблизительно в 3 раза превышает эффективность расщепления под действием pCART144 (IdeZ). При действии pCART144 наблюдали одну интенсивную полосу scIgG (стрелка 2) при концентрации 0,12 мг/мл (дорожка 4), которую можно сравнить с доминирующей полосой scIgG (стрелка 2), получаемой под действием pCART203 и pCART207 при более низкой концентрации, составляющей 41 нг/мл (дорожка 5). Эффективность расщепления и первой, и второй тяжелых цепей IgG под действием pCART203 и pCART207 сравнима с действием IdeS (BX1001865 и pCART124) (дорожка 6 и дорожка 2). Однако, в отсутствие нейтрализующих ADA в этом эксперименте (в отличие от эксперимента, показанного на фиг. 4), активность IdeS (pCART124) в расщеплении обеих тяжелых цепей чистого IgG2 превышает активности pCART206, pCART208 и pCART210 в этих реакциях. Это показывает наличие одной интенсивной полосы scIgG (стрелка 2), присутствующей даже при самой высокой концентрации ферментов pCART206 и pCART208, составляющей 3,3 мг/мл (дорожка 1). Эффективность pCART205, полученного из гибридного IdeS/Z (pCART145), в реакции расщепления чистого человеческого IgG2 приблизительно равна эффективности IdeZ (pCART144) (дорожка 5 - участок первого расщепления и дорожка 2 - участок второго расщепления); при этом образуется единственная полоса scIgG (стрелка 2) при концентрации 0,12 мг/мл (дорожка 4) и доминирующая полоса F(ab')₂ при самой высокой концентрации, составляющей 3,3 мг/мл (дорожка 1).

В целом, на фиг. 6 показано, что наилучшие модификации IdeZ, т.е. те модификации, которые приводят к наибольшему повышению эффективности расщепления IgG2 - это модификации, имеющиеся в pCART203 и pCART207. В этих ферментах имеются модификации L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q, N73G, причем pCART207 дополнительно имеет еще и модификацию N138R.

На фиг. 7 представлены картины расщепления, полученные на субстрате IVIg при действии pCART207, 208 и 210 в сравнении с контрольным IdeS (BX1001865). Концентрации ферментов изменяли в диапазоне от 30 мг/мл (дорожка 1) до 0,015 нг/мл (дорожка 12) при поэтапном серийном разведении в отношении 1:2. Интактный IVIg (в отсутствие фермента) представлен на дорожке 13. Стрелками справа показаны различные продукты расщепления, получаемые из IgG. Стрелка 1: интактный IgG; стрелка 2: scIgG (однократно расщепленный IgG - получен при расщеплении первой тяжелой цепи IgG); стрелка 3: фрагмент F(ab')₂ (получен при расщеплении второй тяжелой цепи IgG). Вертикальные линии были добавлены для облегчения сравнения при проведении расщепления первой тяжелой цепи IgG, при котором интактный IgG превращается в scIgG (между дорожками 6 и 7), и при проведении расщепления второй тяжелой цепи IgG, при котором scIgG превращается во фрагмент F(ab')₂ (между дорожками 2 и 3).

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

В целом, на фиг. 7 показано, что pCART207, pCART208 и pCART210 проявляют более высокую эффективность расщепления человеческого IgG в присутствии анти-IdeS нейтрализующих антител

(ADA), чем IdeS. Аналогичный результат был получен при действии pCART206 (данные не показаны). В последовательностях pCART206, 207, 208 и 210 имеются следующие модификации по сравнению с последовательностью IdeZ: L64_T65del, R70T, Y71del, N72Q и N73G. Кроме того, pCART207, 208 и 210 также имеют модификацию N138R. Таким образом, данные, представленные на фиг. 7, также подтверждают, что указанные модификации повышают эффективность расщепления человеческого IgG в присутствии нейтрализующих ADA.

Пример 3.

Оценка иммуногенности.

Анализ конкурентного связывания анти-IdeS антител.

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

Эталонный IdeS (BX1001865) наносили на планшеты для множественного титрования (5 мг/мл) и выдерживали в течение ночи, затем промывали ФСБ-Т и в течение 1 ч блокировали добавлением 2% BSA в ФСБ, дополненном 2 мМ IHAc и 1М NaCl. С помощью поэтапных разбавлений испытуемого полипептида и 20 мг/мл IVIg в ФСБ, дополненном 0,1% BSA, 2 мМ IHAc и 1М NaCl, был подготовлен планшет для смешивания. Планшет для смешивания инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре на устройстве для встряхивания. По завершении инкубации блокирующий раствор удаляли с планшета, покрытого IdeS, и 50 мкл каждой смеси переносили с планшета для смешивания в лунки планшета с нанесенным покрытием. После инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре на устройстве для встряхивания, планшет промывали ФСБ-Т и добавляли детектор, биотинилированное козье антитело к человеческому F(ab')₂-специфическому фрагменту F(ab')₂ (20000-кратное разбавление). После инкубации в течение 30 мин планшет промывали, добавляли разбавленный в 40000 раз SA-HRP (Pierce) и инкубировали в течение 30 мин. Планшет промывали и проявляли с помощью ТМБ однокомпонентного хромогенного субстрата для HRP в течение 7 мин и останавливали добавлением 0,5М H₂SO₄. Поглощение (OD) измеряли при А, равном 450 нм. Результаты инвертировали (получая значение 1/OD) и представляли в виде отношения в сравнении с pCART124 (1/(испытуемый полипептид/pCART124)) для визуальной демонстрации на гистограммах.

Результаты, полученные при действии pCART191, 192, 193, 194, 197, 198, 200 и 201, представлены на фиг. 8. Результаты, полученные при действии pCART202, 203 и 204, представлены на фиг. 9. Все испытуемые полипептиды проявляют значительное снижение распознавания анти-IdeS антителами по сравнению с IdeS. Самая низкая степень распознавания полипептида (pCART193) была приблизительно на 60% ниже, чем у IdeS. Уровни распознавания оставшихся испытуемых полипептидов были снижены на 70 или даже 80% по сравнению с IdeS.

Анти-IdeS анализ с определением титров.

Этот анализ основан на сравнении IVIg титров при разбавлении. Различные испытуемые полипептиды и контрольные IdeS (BX1001865 и pCART124) наносили на планшеты для микротитрования. Связывание анти-IdeS антител с испытуемыми полипептидами или контрольными веществами оценивали, добавляя в планшеты титруемые количества IVIg (серия поэтапного разведения в отношении 1:2 от 40 до 0,625 мг/мл, т.е. титры соответствуют разведению сыворотки крови от 1:250 до 1:16000). Буфер разбавления содержал высокую концентрацию соли, в результате чего происходило связывание только при высокой степени аффинности (сродства), а также включал 2 мМ IHAc для ингибирования расщепления IgG. Пороговые значения OD (optical density, оптическая плотность) в каждом эксперименте устанавливали на уровне, приблизительно в 3 раза превышающем величину OD холостого опыта. В качестве документируемого результата для каждого испытуемого полипептида записывали титр разведения IVIg, при котором получали наименьшие значения OD (наименьшее связывание анти-IdeS антитела), превышающие пороговое значение. Другими словами, для полипептидов с низким распознаванием анти-IdeS антителами (ADA) требовался менее разбавленный IVIg, в то время как более разбавленный IVIg требовался для ферментов, хорошо распознаваемых антителами ADA. Вкратце, протокол состоял в следующем.

Эталонный IdeS и каждый из испытуемых ферментов наносили на планшеты для множественного титрования (2 мг/мл) и выдерживали в течение ночи, промывали ФСБ-Т и блокировали в течение 1 ч добавлением 2% BSA в ФСБ, дополненном 2 мМ IHAc. Блокирующий раствор удаляли, добавляли 50 мкл

IVIg, полученного в поэтапном разбавлении (буфер разбавления: ФСБ 1M NaCl плюс 0,1%BSA плюс 2 mM ИНАс), и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре на устройстве для встряхивания. Планшеты промывали ФСБ-Т, добавляли детектор, биотинилированное козье антитело к человеческому F(ab')₂-специфическому фрагменту F(ab')₂ (20000-кратное разбавление), и инкубировали в течение 30 мин. Планшеты промывали, добавляли 40000-кратно разбавленную SA-HRP (Pierce) и инкубировали в течение 30 мин. Планшеты промывали и проявляли с помощью ТМБ однокомпонентного хромогенного субстрата для HRP в течение 7 мин и реакцию останавливали добавлением 0,5M H₂SO₄. Поглощение (OD) измеряли при λ , равном 450 нм.

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

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

Краткие выводы.

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

Пример 4.

Оценка активности.

Активность в испытании ELISA.

Для оценки способности к расщеплению человеческих IgG1 и IgG2 были проведены два анализа активности на основе анализа ELISA. В одном анализе оценивали расщепление IgG1, а в другом - расщепление IgG2. Для различных испытуемых полипептидов IgG-цистеиновой протеазы были вычислены значения EC50 (концентрации полумаксимального эффекта). Принцип анализов состоял в следующем: на лунки планшета для множественного титрования наносили F(ab')₂-фрагмент, нацеленный на человеческие IgG антитела, специфично на область Fab. Затем титруемые концентрации полипептида IgG-цистеиновой протеазы (испытуемого или контрольного) инкубировали в лунках вместе с человеческим IgG1 антителом (Humira) или человеческим IgG2 антителом (XGEVA). Количество интактного или однократно расщепленного человеческого IgG (Humira или XGEVA), связанного с лунками, измеряли с помощью идентифицирующего антитела, направленного на человеческий IgG, специфично на Fc часть антитела. Чем выше концентрация заданного полипептида IgG-цистеиновой протеазы в лунке, тем меньше интактного человеческого IgG антитела будет связано с лункой, что приводит к снижению интенсивности сигнала. Аналогично, действие более активного полипептида, представляющего собой IgG-цистеиновую протеазу, будет приводить к созданию более слабого сигнала, чем действие менее активного полипептида, представляющего собой IgG-цистеиновую протеазу, в той же концентрации. В обоих анализах, т.е. при добавлении IgG1 (Humira) и IgG2 (XGEVA), были построены кривые "дозировка титрования-ответ" для контрольного IdeS (pCART124) и всех испытуемых полипептидов IgG-цистеиновой протеазы. Для каждого испытуемого варианта также были вычислены значения EC50, которые представляют собой концентрации полипептида, при которых достигается 50% от его максимального эффекта при расщеплении второй тяжелой цепи молекулы IgG, т.е. концентрации, при которых половина молекул IgG расщеплена один раз и половина молекул IgG полностью расщеплена. Чем ниже значение EC50, тем выше эффективность IgG-цистеиновой протеазы. Расщепление первой тяжелой цепи IgG, IgG до scIgG, в этом анализе не наблюдается, поскольку в нем все еще присутствует Fc-часть IgG, которая может быть обнаружена Fc-специфическим идентифицирующим антителом (фиг. 18).

Краткое описание лабораторного протокола. На лунки планшетов для множественного титрования наносили козье антитело к человеческому F(ab')₂-специфическому фрагменту F(ab')₂ (0,5 мг/мл) (Jackson #109-006-097) и выдерживали в течение ночи (от +2 до 8°C), затем промывали с ФСБ плюс 0,05% Tween 20 (ФСБ-Т) и производили блокировку выдерживанием в 0,45% рыбьем желатине в ФСБ-Т (фосфатно-солевом буферном растворе с добавлением Твин (Tween)) (блокирующий буфер) в течение 45-120 мин при комнатной температуре. Контрольный IdeS (pCART124) и испытуемые полипептидные IgG-цистеиновые протеазы были приготовлены в виде серии титрования поэтапным разбавлением 1:4 блокирующим буфером с исходной концентрацией 80 мг/мл. В лунки добавляли равные объемы (25 мкл), содержащие 0,5 мг/мл человеческого IgG1 (Humira) и титруемое количество полипептидной IgG-цистеиновой протеазы, инкубировали в течение 2 ч при встряхивании и регулируемой температуре, составляющей 37°C, и затем промывали ФСБ-Т. Биотинилированное анти-человеческое IgG Fc-специфическое антитело мыши (m-a-hIgG Bio II, Lot: C0013-ZC43C, Southern Biotech) (600 нг/мл) смешивали со Strep-sulfo (стрептавидином-сульфо) (200 нг/мл) и добавляли в планшеты для множественного титрования. Планшеты герметизировали алюминиевой пленкой и инкубировали при +25°C в течение 1 ч при встряхивании. Затем планшеты промывали ФСБ-Т, и в каждую лунку добавляли 150 мкл разбавленного в 2 раза буфера Т для считывания (MSD read buffer Т, номер по каталогу R92TC-2). Планшеты сразу же

считывали на считывателе планшетов марки MSD (Meso Scale Discovery) QuickPlex SQ 120, Модель 1300.

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

Результаты.

Активность по данным ELISA.

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

Визуализация результатов анализов эффективности на геле.

Визуализация результатов расщепления IgG1 (фиг. 14A) и IgG2 (фиг. 14B) на геле ясно показывает расщепление первой и второй тяжелых цепей (вертикальными линиями на фигурах отмечено расщепление первой и второй тяжелых цепей под действием BX1001865 и расщепление под действием pCART124). Звездочкой (*) на фигурах отмечено приблизительное значение EC50, т.е. концентрации, при которой 50% IgG однократно расщеплено (scIgG) и 50% полностью расщеплено (F(ab')₂).

Данные, полученные на геле, представлены в табл. 2 (расщепление IgG1) и табл. 3 (расщепление IgG2). Расщепление первой тяжелой цепи IgG1 (Humira) происходит приблизительно при одинаковой концентрации, 1,5 нг/мл IdeS (pCART124 и BX1001865), pCART207 и 217, но для получения доминирующей полосы scIgG требуется несколько более высокая концентрация pCART219 и 226, составляющая приблизительно 4,6 (табл. 2). Однако pCART207, 217 и 219 демонстрируют более высокую, чем IdeS (pCART124 и BX1001864), эффективность в расщеплении второй тяжелой цепи IgG1 (табл. 2); их эффективность в реакции расщепления приблизительно в 3 раза выше (один этап титрования), причем концентрации составляют приблизительно 370 нг/мл для IdeS и приблизительно 120 нг/мл для pCART207, 217 и 219. Эффективность pCART207, 217, 219 в расщеплении IgG2 (XGEVA) (фиг. 14B) снижена на один этап титрования (1:3) относительно эффективности IdeS, и эффективность pCART226 снижена приблизительно на два этапа титрования (1:6) относительно эффективности IdeS в расщеплении первой и второй тяжелых цепей IgG (табл. 3). Эффективность pCART229 приблизительно равна эффективности IdeS (BX1001865 и pCART124) при расщеплении первой (4,6 нг/мл) и второй (370 нг/мл) тяжелых цепей IgG1 (Humira) (фиг. 15A и табл. 4), в то время как в расщеплении IgG2 (XGEVA) pCART229 приблизительно на один этап титрования (1:3) менее эффективен, чем IdeS при расщеплении первой и второй тяжелых цепей IgG (фиг. 15B и табл. 4).

Полипептидные IgG цистеиновые протеазы pCART207, 217, 219 и 226 также титровали в объединенном человеческом IgG, IVIg (Octagam), применяя в качестве контрольного вещества IdeS (BX1001865) (фиг. 16). Все перечисленные протеазы проявляли более высокую эффективность расщепления первой тяжелой цепи IgG препарата IVIg по сравнению с IdeS. Для протекания первого расщепления и образования scIgG, концентрации pCART207, 217, 219 и 226 должны были составлять 0,75 мг/мл, в то время как концентрация IdeS (BX1001865) должна была составлять 1,5 мг/мл (фиг. 16 и табл. 5). В реакции второго расщепления pCART207 и 217 были более эффективны, чем IdeS (BX1001865), и для преимущественного образования фрагментов F(ab')₂ их концентрации должны были составлять 3 мг/мл, в то время как концентрация IdeS должна была составлять приблизительно 6 мг/мл (фиг. 16 и табл. 5). pCART219 и 226 были менее эффективны во втором расщеплении IgG в объединенном препарате IVIg по сравнению с IdeS. Расщепление IVIg под действием pCART229 анализировали в более широком диапазоне титрования при поэтапном разбавлении 1:2, начиная с концентрации 30 мг/мл (на фиг. 17), по сравнению с полипептидами, результаты исследований которых представлены на фиг. 16. Одинаковая эффективность была отмечена в опытах с IdeS (BX1001865 и pCART124) и pCART229 (фиг. 17); так, при концентрации 1,9 мг/мл образовывались scIgG, и при концентрации 7,5 мг/мл образовывались фрагменты F(ab')₂ (табл. 6).

Краткое описание графических материалов примера 4.

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

фиг. 13 - кривые титрования при расщеплении IgG2 (XGEVA) различными полипептидами IgG-

цистеиновой протеазы;

фиг. 14 - анализ расщепления IgG способом SDS-PAGE с использованием титруемых (разбавление 1:3, начиная с концентрации 3300 нг/мл) количеств pCART207, 217, 219 и 226 и с использованием BX1001865 и pCART124 (исходный IdeS) в качестве контрольных веществ в том же эксперименте по расщеплению. А: расщепление Humira (IgG1) и В: расщепление XGEVA (IgG2). Вертикальными линиями отмечены концентрации IdeS (BX1001865 и pCART124), необходимые для расщепления первой и второй тяжелых цепей IgG (при котором количество расщепленного продукта превышает количество нерасщепленного продукта). Звездочкой (*) на фигурах отмечено приблизительное значение EC50 в этом эксперименте;

фиг. 15 - анализ расщепления IgG способом SDS-PAGE с использованием титруемых (разбавление 1:3, начиная с концентрации 3300 нг/мл) количеств pCART229 с использованием BX1001865 и pCART124 (исходный IdeS) в качестве контрольных веществ в том же эксперименте по расщеплению. А: расщепление Humira (IgG1) и В: расщепление XGEVA (IgG2). Вертикальными линиями отмечены концентрации IdeS (BX1001865 и pCART124), необходимые для расщепления первой и второй тяжелых цепей IgG (при котором количество расщепленного продукта превышает количество нерасщепленного продукта);

фиг. 16 - анализ расщепления IVIg способом SDS-PAGE с использованием титруемых (разбавление 1:2, начиная с концентрации 6 мг/мл) количеств испытуемых полипептидов IgG-цистеиновой протеазы и IdeS (BX1001865) в качестве контроля в том же эксперименте по расщеплению;

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

фиг. 18 - схематичное представление расщепления иммуноглобулинов полипептидами согласно изобретению. Ферментативное расщепление IgG проводят в два этапа. Сначала проводят расщепление тяжелой цепи интактного IgG, получая однократно расщепленный IgG (scIgG). Затем расщепляется следующая тяжелая цепь, и высвобождается Fc-часть. Fc-часть все еще связана с Fab-частью молекулы scIgG, и поскольку в анализе активности ELISA идентифицирующее антитело распознает Fc-часть молекулы IgG, то в этом анализе невозможно отличить целый IgG от scIgG.

Обсуждение и заключение.

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

В анализе ELISA определения активности с использованием XGEVA было показано, что все испытуемые полипептиды pCART207, 217, 219 и 226 имеют более низкую активность по сравнению с IdeS (pCART124) в процессе расщепления обеих IgG тяжелых цепей IgG2. Однако, при визуальном представлении расщепления на геле становится ясно, что pCART207 имеет приблизительно такую же активность, что и IdeS (BX1001865 и pCART124) в процессе расщепления первой тяжелой цепи IgG, но при этом он приблизительно в 3 раза менее эффективен (один этап титрования), чем IdeS, в процессе расщепления второй тяжелой цепи. Такая же картина была обнаружена при действии pCART229, который проявлял высокую эффективность при расщеплении IgG1, сравнимую с активностью IdeS, но при этом обладал меньшей эффективностью в расщеплении IgG2, то есть в разрезании второй тяжелой цепи IgG. При анализе расщепления IgG на геле хорошо прослеживается расщепление первой тяжелой цепи (от IgG до scIgG), но расщепление не отслеживается в анализе ELISA для определения активности с использованием Fc-специфичного идентифицирующего антитела. Большая часть воздействий, которые опосредует Fc, недоступна для IgG после однократного расщепления молекулы (данные не показаны), что чрезвычайно важно для клинической ситуации, где главной задачей становится нейтрализация патогенных молекул IgG.

IVIg представляет собой объединенный человеческий IgG, содержащий приблизительно 65-70% IgG1, 35-30% IgG2 и суммарное количество IgG3/IgG4 приблизительно 1%. Природный человеческий IVIg также содержит анти-IdeS антитела, выработанные в результате предыдущего воздействия S.pyogenes на донора IgG, и некоторые из этих антител являются нейтрализующими, т.е. связывание этих IdeS-специфичных антител с IdeS будет снижать или полностью исключать активность IgG протеазы в IdeS. Таким образом, результаты расщепления IVIg под действием различных полипептидных IgG цистеиновых протеаз показывают общее расщепление всех четырех подклассов человеческого IgG приблизительно в соотношениях, обычно наблюдаемых в сыворотке крови человека, а также в присутствии нейтрализующих анти-IdeS антител.

В общем, все протестированные полипептидные IgG цистеиновые протеазы проявляли более низкую эффективность в процессе расщепления IgG2, чем при расщеплении IgG1. pCART207, 217 и 219 более эффективны, чем IdeS, в расщеплении IgG1, но менее эффективны, главным образом, в расщеплении

второй тяжелой цепи IgG2. Полосы scIgG, видимые на фиг. 16 при самой высокой дозировке (6 мг/мл) pCART207, 217, 219 и 226 и на фиг. 17 для pCART229 вероятнее всего представляют молекулы IgG2 в объединенном препарате IgG, IVIg (ср. фиг. 14А с 14В и фиг. 15А с 15В).

Таблица 1. Величины EC50 (нг/мл), определенные в анализе активности ELISA и отношение активностей по сравнению с исходным IdeS (pCART124)

	EC50 (нг/мл) при расщеплении IgG1 (Humira)	Отношение активностей	EC50 (нг/мл) при расщеплении IgG2 (XGEVA)	Отношение активностей
PCART124	258	1	225	1
PCART207	64	4,0	444	0,5
pCART217	82	3,2	486	0,5
pCART219	183	1,4	1508	0,15
pCART226	433	0,6	3156	0,07

Таблица 2. Данные расщепления IgG1 (Humira), полученные на геле (фиг. 14А). Концентрация (нг/мл) полипептида, необходимая для осуществления первого и второго расщепления IgG, таким образом, чтобы количество расщепленных продуктов превышало количество нерасщепленных продуктов. Приблизительное значение EC50 (* на фиг. 14А)

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

Таблица 3. Данные расщепления IgG2 (XGEVA), полученные на геле (фиг. 14В). Концентрация (нг/мл) полипептида, необходимая для осуществления первого и второго расщепления IgG, таким образом, чтобы количество расщепленных продуктов превышало количество нерасщепленных продуктов. Приблизительное значение EC50 (* на фиг. 14В)

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

Таблица 4. Данные расщепления IgG1 (Humira) и IgG2 (XGEVA) под действием pCART229, полученные на геле (фиг. 15). Концентрация (нг/мл) полипептида, необходимая для осуществления первого и второго расщепления IgG (таким образом, чтобы количество расщепленных продуктов превышало количество нерасщепленных продуктов)

ID	Первая тяжелая цепь IgG (Humira) IgG до sclgG Конц. фермента (нг/мл)	Вторая тяжелая цепь IgG (Humira) sclgG до F(ab') ₂ Конц. фермента (нг/мл)	Первая тяжелая цепь IgG (XGEVA) IgG до sclgG Конц. фермента (нг/мл)	Вторая тяжелая цепь IgG (XGEVA) sclgG до F(ab') ₂ Конц. фермента (нг/мл)
BX1001865	4,6	370	14	1100
PCART124	4,6	370	14	1100
pCART229	4,6	370	122	3300

Таблица 5. Данные расщепления IVIg под действием pCART207, 217, 219 и 226, полученные на геле (фиг. 16). Концентрация (нг/мл) полипептида, необходимая для осуществления первого и второго расщепления IgG таким образом, чтобы количество расщепленных продуктов превышало количество нерасщепленных продуктов

ID	Первая тяжелая цепь IgG IgG до sclgG Конц. фермента (нг/мл)	Вторая тяжелая цепь IgG sclgG до F(ab') ₂ Конц. фермента (нг/мл)
BX1001865	1500	6000
PCART124	1500	6000
PCART207	750	3000
pCART217	750	3000
pCART219	750	6000
pCART226	750	6000

Таблица 6. Данные расщепления IVIg под действием pCART229, полученные на геле (фиг. 17).

Концентрация (нг/мл) полипептида, необходимая для осуществления первого и второго расщепления тяжелой цепи IgG, таким образом, чтобы количество расщепленных продуктов превышало количество нерасщепленных продуктов

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

Пример 5.

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

Конкуренцию за центры связывания между антителами к лекарственному средству (ADA) и IdeS определяли для "ADA"-модифицированных полипептидов согласно изобретению (pCART207, 217, 219 и 226) с помощью анализа на основе ELISA, Meso Scale Discovery (MSD). Принцип ELISA состоит в нанесении на лунки планшета для множественного титрования исходного IdeS, меченого his (pCART124). Сыворотка крови большинства людей содержит антитела к IdeS, выработанные благодаря перенесенным ранее инфекциям, вызываемым *S.pyogenes*. В настоящем исследовании в качестве стандартов для обнаружения ADA были применены две различные клинические объединенные сыворотки человеческой крови. Первая объединенная сыворотка представляла собой нормальную сыворотку человеческой крови, полученную из объединенной сыворотки крови 100 человек; ее называли Объединенной человеческой сывороткой 1191807, и вторая представляла собой объединенную сыворотку крови, полученную от пациентов, находящихся в фазе II исследования 13-HMedIdeS-02; ее называли Объединенной сывороткой-2 фазы II. Этим пациентам производили однократное введение IdeS в дозировке от 0,24 до 0,5 мг/кг массы тела, в результате чего в их сыворотке крови содержались повышенные уровни (приблизительно в 50

раз) анти-IdeS ADA.

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

Концентрация обоих стандартов, при которой достигается приблизительно 80% связывание на линейном участке стандартной кривой, составляла приблизительно 200 нг ADA (IdeS)/мл. При проведении предварительной конкурентной инкубации эта концентрация была выбрана для каждого из стандартов, и концентрация полипептидных IgG цистеиновых протеаз в 100 раз превышала концентрацию ADA, с учетом разности в молярных массах между антителом, масса которого составляет 150 кДа, и IdeZ, масса которого составляет приблизительно 35 кДа, то есть меньше в 4,2 раза; таким образом, 100 умножаем на 200 нг/мл и делим на 4,2, получая приблизительно 5 мг/мл испытуемых полипептидов. Стандартную сыворотку, содержащую 200 нг/мл ADA и IdeS (pCART124) или испытуемые полипептиды, подвергали предварительной инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре (КТ). В качестве контроля для максимального связывания ADA, такие же концентрации стандартов подвергали предварительной инкубации в отсутствие IdeS (pCART124) или любой другой IgG цистеиновой протеазы, и полученную величину принимали за 80% от максимальной величины связывания. За нижние предельные значения диапазона расчета конкурентного связывания принимали самые низкие значения кривой стандартов. Из средних показателей стандартов, предварительно инкубированных с IdeS (pCART124) или испытуемыми полипептидами, вычитали 80% величины связывания стандартов, деленной на 80% величины связывания стандартов, из которой вычитали нижние предельные значения, получая выраженную в % величину конкурентного связывания. Если для полипептидной IgG цистеиновой протеазы было получено наименьшее % значение конкурентного связывания, то это означало, что большинство эпитопов, связывающих ADA, были удалены из полипептида по сравнению с исходным IdeS (pCART124).

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

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

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

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

Результаты и выводы.

Процентные доли (%) блокированных центров связывания IdeS-ADA в PCART207, 217, 219 и 226 представлены на фиг. 19 и 20; исходный IdeS pCART124 применяют в качестве положительного контроля 100% сходства.

Все испытуемые полипептидные IgG цистеиновые протеазы, pCART207, 217, 219 и 226, занимают меньшее количество центров связывания ADA в сыворотке крови человека по сравнению с исходным IdeS (pCART124). У пациентов, которым один раз вводили IdeS (Объединенная сыворотка-2 фазы II), вырабатывалось большее количество IdeS-специфичных ADA и наблюдалось минимальное распознава-

ние pCART207, 217 и 219 (на фиг. 20) по сравнению с объединенной сывороткой крови здоровых добровольцев (Объединенная человеческая сыворотка 1191807) (фиг. 19).

Пример 6.

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

В этом исследовании мышам BALB/c интраперитонеально (i.p.) вводили человеческий IVIg (Octagam). Концентрацию вводимого человеческого IVIg подбирали таким образом, чтобы дозировка составляла 900 мг/кг, т.е. коррелировала с концентрацией IgG в человеческой плазме (10 мг/мл).

Человеческий IVIg вводили i.p. в сутки 0. Спустя двадцать четыре часа (сутки 1) после инъекции человеческого IVIg мышам внутривенно (i.v.) в дозировке 1 мг/кг вводили ФСБ, контрольные IdeS (BX1001865 и pCART124) или испытуемые IgG протеазы, pCART207, pCART217, pCART219 и pCART226. Спустя два часа отбирали образцы сыворотки крови и мышей умерщвляли.

Анализ эффективности ELISA.

Принцип анализа состоял в нанесении на лунки планшета для множественного титрования F(ab')₂-фрагмента, нацеленного на человеческие IgG антитела, специфического для области Fab. Затем сыворотку крови мышей обрабатывали IVIg и добавляли контрольные IdeS (BX1001865 и pCART124) или испытуемые полипептиды IgG-цистеиновой протеазы. Количество интактного или однократно расщепленного человеческого IgG (IVIg), иммобилизованного на лунках, измеряли с помощью идентифицирующего антитела к человеческому IgG (IVIg), специфического для участка Fc антитела. Чем ниже обнаруживаемая концентрация интактного человеческого IgG антитела (IVIg), тем большей эффективностью должен обладать полипептид IgG-цистеиновой протеазы.

Краткое описание лабораторного протокола. На лунки планшета для множественного титрования наносили и выдерживали в течение ночи (от +2 до 8°C) козье антитело к человеческому F(ab')₂-специфическому фрагменту F(ab')₂ (0,5 мг/мл) (Jackson #109-006-097), затем промывали ФСБ плюс 0,05% Tween 20 (ФСБ-Т) и производили блокировку выдерживанием в 2% BSA в ФСБ-Т (блокирующий буфер) в течение 45-120 мин при КТ (при комнатной температуре). В качестве стандарта применяли калибратор белка человеческой сыворотки (DAKO #X0908), который добавляли в концентрации от 0,5 до 300 нг/мл. Образцы сыворотки крови, отобранные у мышей, обрабатывали IVIg; различные полипептидные IgG-цистеиновые протеазы размораживали и разбавляли блокирующим буфером в 100000 раз, после чего добавляли в аналитический планшет для множественного титрования. Планшет инкубировали 2 ч при встряхивании при КТ и затем промывали ФСБ-Т. Биотинилированное мышинное антитело, специфическое к человеческому Fc IgG (600 нг/мл) (Jackson #109-066-098), смешивали со Strep-sulfo (стрептавидин-сульфо) (200 нг/мл) (MSD #R32AD-1) и добавляли в планшет для множественного титрования. Планшет герметизировали алюминиевой пленкой и инкубировали при КТ в течение 1 ч при встряхивании. Затем планшет промывали ФСБ-Т, и в каждую лунку добавляли 150 мкл разбавленного в 2 раза буфера Т для считывания (MSD #R92TC-2). Планшет непосредственно анализировали на считывателе планшетов MSD (Meso Scale Discovery) QuickPlex SQ 120, Модель 1300.

Визуальное представление эффективности на геле.

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

Результаты и выводы.

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

Введение IVIg мышам IdeS (BX1001865 и pCART124) и различных IgG цистеиновых протеаз pCART207, pCART217, pCART219 и pCART226 ясно показывает расщепление человеческого IgG *in vivo* в организме мышей (табл. 7 и фиг. 21).

Наблюдали полное расщепление контрольного IdeS (BX1001865), pCART207 и pCART217 при отсутствии на геле видимых полос scIgG и наличии значительных полос F(ab')₂ (фиг. 22). В опытах с мышами pCART219 и pCART226 проявляли более низкую эффективность: спустя два часа молекулы scIgG все еще присутствовали в сыворотке крови мышей (фиг. 22С). Однако на геле не наблюдали полос интактного IVIg, что указывает на то, что более высокая концентрация IgG-Fc, обнаруживаемая идентифицирующим антителом (полоса выше) при действии pCART219 и pCART226, имеющаяся на фиг. 21, получена из scIgG, а не интактного IgG. Мыши № 2 в группе, получавшей pCART207, и мыши № 4 в группе, получавшей pCART219, не делали инъекции IVIg (фиг. 22В и С), и, таким образом, на геле не было обнаружено фрагментов расщепления IgG, полученных из организмов этих животных. Расположения

полос белков показывает распределение фоновых белков в сыворотке крови мышей BALB/c. Это свидетельствует о том, что полипептиды согласно изобретению расщепляют IgG в опытах *in vivo*.

Таблица 7. Анализ расщепления *in vivo* человеческого IgG в сыворотке крови мышей, которым вводили IdeS (BX1001865 и pCART124/испытываемые IgG цистеиновые протеазы, проведенный с помощью исследования эффективности ELISA (среднее $\pm$ среднее квадратичное отклонение))

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

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

- (a) по меньшей мере на 85% идентичен SEQ ID NO: 4 или 5;
- (b) имеет цистеин (C) в том положении указанного варианта последовательности, которое соответствует положению 102 в SEQ ID NO: 3; и
- (c) имеет в тех положениях указанного варианта последовательности, которые соответствуют положениям 92, 272, 294 и 296 в SEQ ID NO: 3, лизин (K), гистидин (H), аспарагиновую кислоту (D) и аспарагиновую кислоту (D) соответственно,

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

в котором указанный вариант последовательности SEQ ID NO: 4 или 5:

- (1) имеет положительно заряженную аминокислоту в том положении варианта, которое соответствует положению 138 в SEQ ID NO: 3; и/или
- (2) имеет положительно заряженную аминокислоту в том положении варианта, которое соответствует положению 139 в SEQ ID NO: 3; и/или
- (3) с полностью удаленными первыми двадцатью остатками на N-конце (содержащими непрерывную последовательность DDYQRNATEA YAKEVPHQIT); и/или
- (4) имеет по меньшей мере одну из следующих модификаций:
 - i. удаление остатков лейцина (L) и треонина (T) в тех положениях указанного варианта, которые соответствуют положениям 64 и 65 в SEQ ID NO: 3;
 - ii. треонин (T) вместо аргинина (R) в том положении варианта, которое соответствует положению 70 в SEQ ID NO: 3;
 - iii. удаление тирозина (Y) в том положении варианта, которое соответствует положению 71 в SEQ ID NO: 3;
 - iv. глутамин (Q) вместо аспарагина (N) в том положении варианта, которое соответствует положению 72 в SEQ ID NO: 3;
 - v. глицин (G) вместо аспарагина (N) в том положении варианта, которое соответствует положению 73 в SEQ ID NO: 3;
 - vi. аланин (A) вместо глутаминовой кислоты (E) в том положении варианта, которое соответствует положению 67 в SEQ ID NO: 3;
 - vii. аспарагин (N) вместо глутамина (Q) в том положении варианта, которое соответствует положению 68 в SEQ ID NO: 3.

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

- (a) по меньшей мере на 80% идентичен SEQ ID NO: 4;
- (b) имеет цистеин (C) в том положении указанного варианта последовательности, которое соответствует положению 102 в SEQ ID NO: 3; и
- (c) имеет в тех положениях указанного варианта последовательности, которые соответствуют положениям 92, 272, 294 и 296 в SEQ ID NO: 3, лизин (K), гистидин (H), аспарагиновую кислоту (D) и аспарагиновую кислоту (D) соответственно,

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

в котором указанный вариант последовательности SEQ ID NO: 4:

- (1) имеет положительно заряженную аминокислоту в том положении варианта, которое соответствует положению 138 в SEQ ID NO: 3; и/или

(2) имеет положительно заряженную аминокислоту в том положении варианта, которое соответствует положению 139 в SEQ ID NO: 3; и/или

(3) с полностью удаленными первыми двадцатью остатками на N-конце (содержащими непрерывную последовательность DDYQRNATEA YAKEVPHQIT); и/или

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(a) по меньшей мере на 85% идентичен SEQ ID NO: 5;

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

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

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

4. Полипептид по п.3, в котором указанный вариант последовательности SEQ ID NO: 5:

(1) имеет положительно заряженную аминокислоту в том положении варианта, которое соответствует положению 138 в SEQ ID NO: 3; и/или

(2) имеет положительно заряженную аминокислоту в том положении варианта, которое соответствует положению 139 в SEQ ID NO: 3; и/или

(3) с полностью удаленными первыми двадцатью остатками на N-конце (содержащими непрерывную последовательность DDYQRNATEA YAKEVPHQIT); и/или

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

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

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

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

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

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

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

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

5. Полипептид по любому из пп.1-4, где указанный вариант имеет положительно заряженную аминокислоту в том положении варианта, которое соответствует положению 138 в SEQ ID NO: 3, и положительно заряженная аминокислота представляет собой аргинин (R) или лизин (K), и/или где указанный вариант имеет положительно заряженную аминокислоту в том положении варианта, которое соответствует положению 139 в SEQ ID NO: 3, и положительно заряженная аминокислота представляет собой аргинин (R) или лизин (K).

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

7. Полипептид по любому из пп.1-6, который включает или состоит из любой из последовательно-

стей SEQ ID NO: 6-25, где указанная последовательность необязательно включает дополнительный метионин на N-конце и/или гистидиновую метку на C-конце.

8. Полипептид по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что полипептид по меньшей мере в 2,0 раза более эффективно, чем IdeZ, расщепляет человеческий IgG, причем расщепление оценивают с помощью одного и того же анализа.

9. Полипептид по любому из пп.1-8, который обладает меньшей иммуногенностью, чем IdeS, и предпочтительно иммуногенность указанного полипептида составляет не более 85% от иммуногенности IdeS, определяемой с помощью одного и того же анализа.

10. Полинуклеотид или экспрессионный вектор, который включает последовательность нуклеиновых кислот, кодирующую полипептид по любому из пп.1-9.

11. Клетка-хозяин, включающая полинуклеотид или экспрессионный вектор по п.10, которая предпочтительно представляет собой бактериальную клетку, наиболее предпочтительно клетку *E.coli*.

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

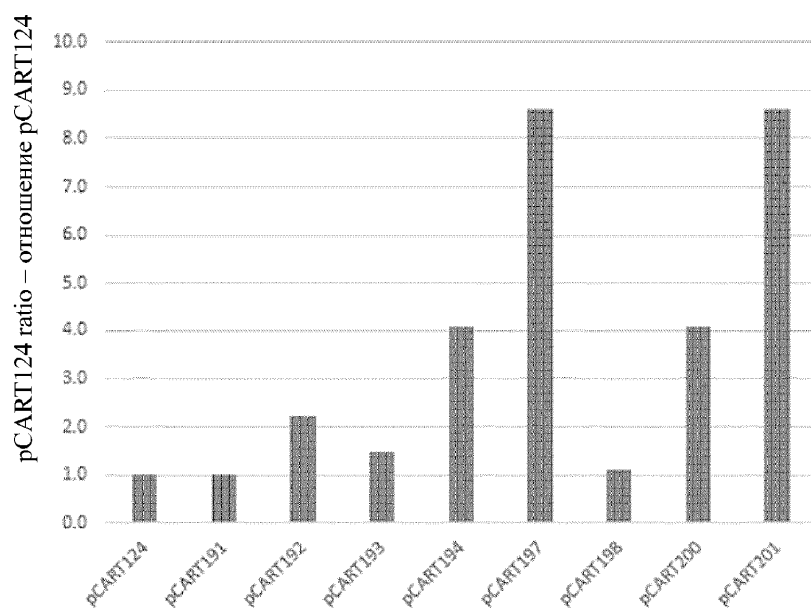
13. Применение полипептида по любому из пп.1-9 для лечения человека или животного.

14. Способ профилактики или лечения заболевания или состояния у субъекта, отличающийся тем, что способ включает введение полипептида по любому из пп.1-9 в профилактически или терапевтически эффективном количестве.

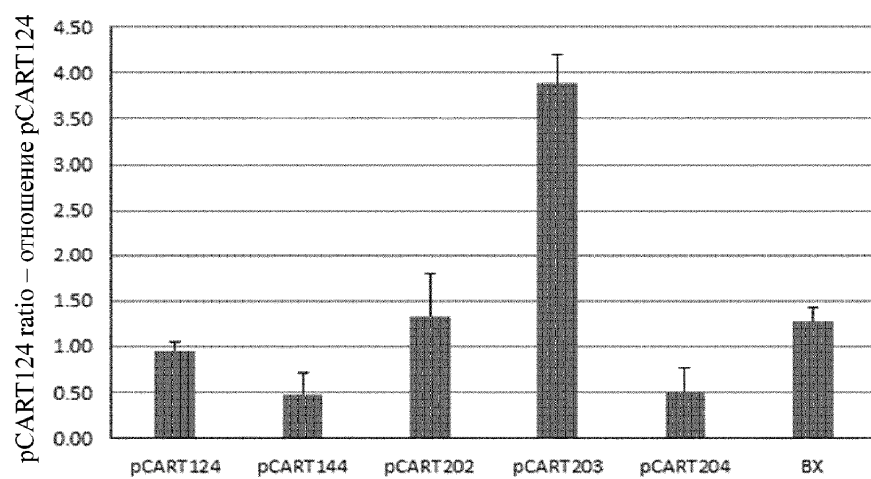
15. Способ по п.14, где указанное заболевание или состояние представляет собой заболевание или состояние, полностью или частично опосредуемое патогенными IgG антителами, и предпочтительно заболевание или состояние упомянуто в табл. D.

16. Способ расщепления IgG, который включает контакт образца, содержащего IgG, с полипептидом по любому из пп.1-9 в условиях, позволяющих проявиться активности IgG-цистеиновой протеазы.

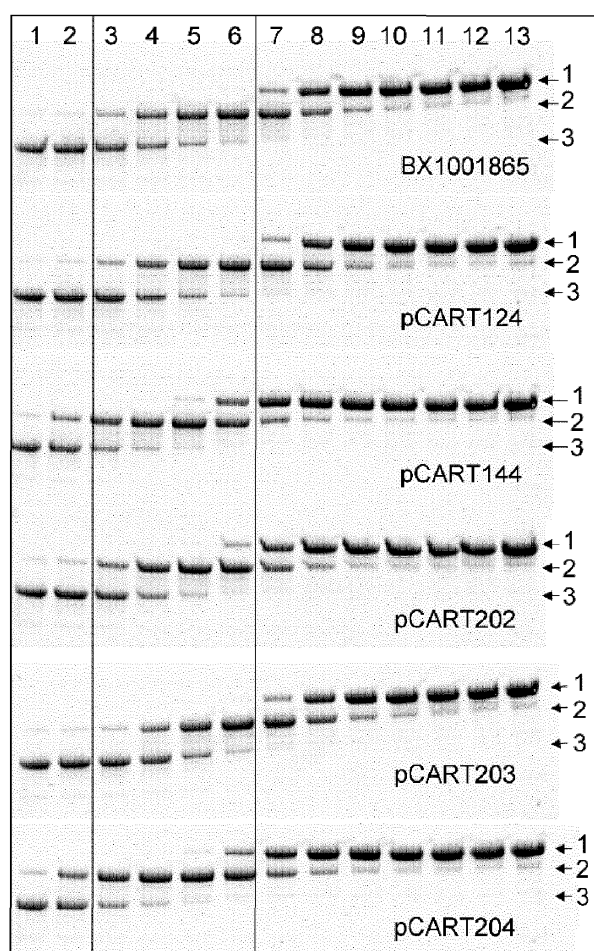
17. Способ по п.16, который выполняют *ex vivo* и/или выполняют для получения Fc и Fab фрагментов и/или в котором образец представляет собой образец крови, отобранный у субъекта, имеющего заболевание или состояние, определенное в п.15.



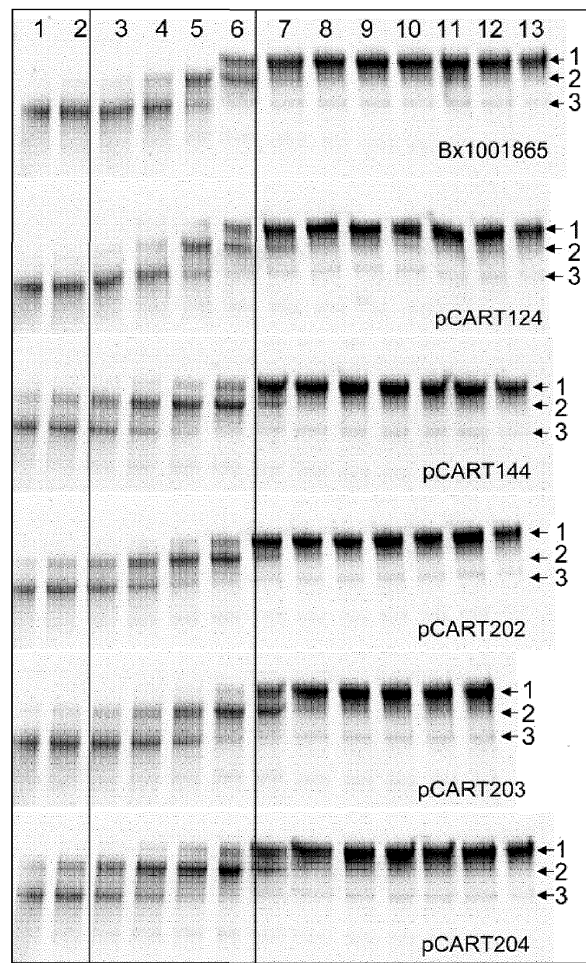
Фиг. 1



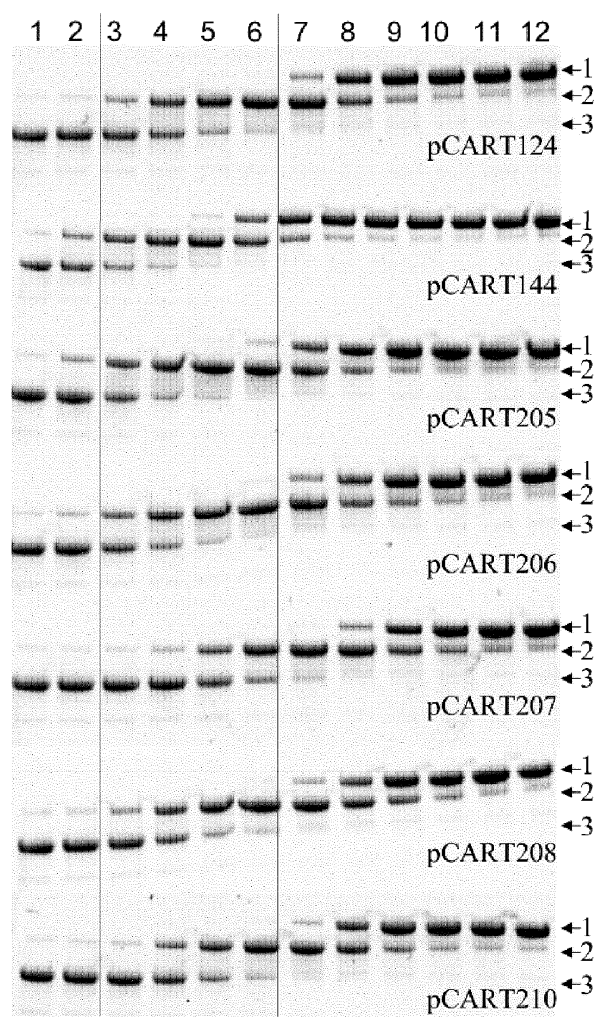
Фиг. 2



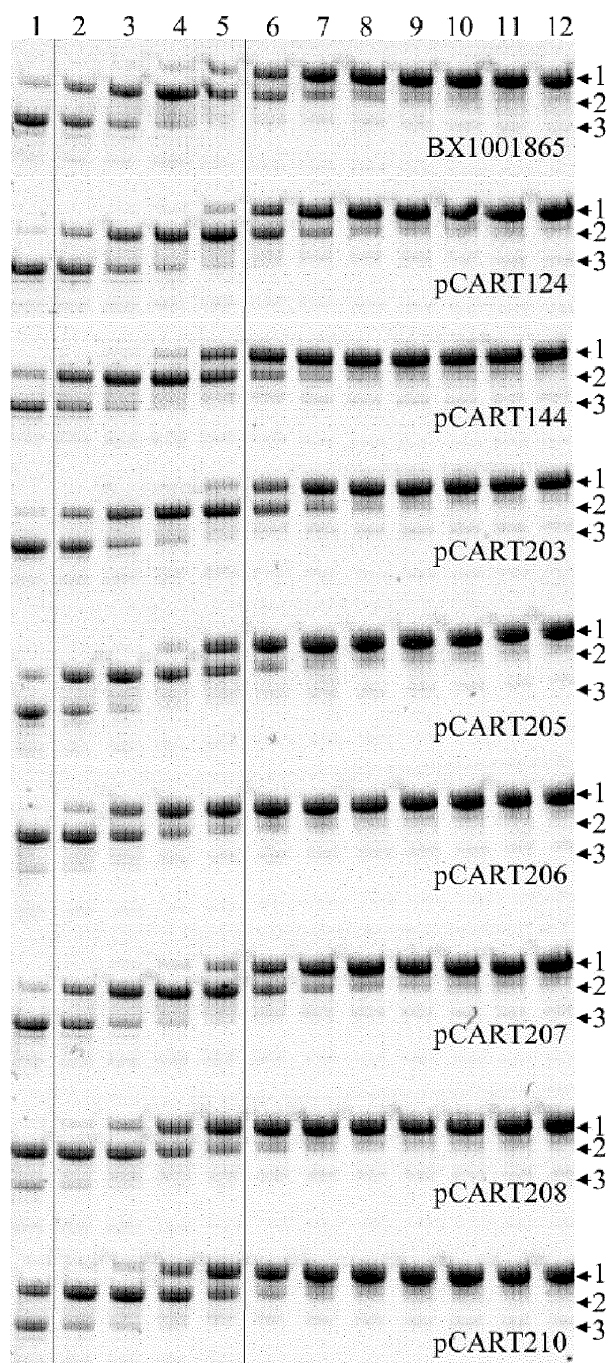
Фиг. 3



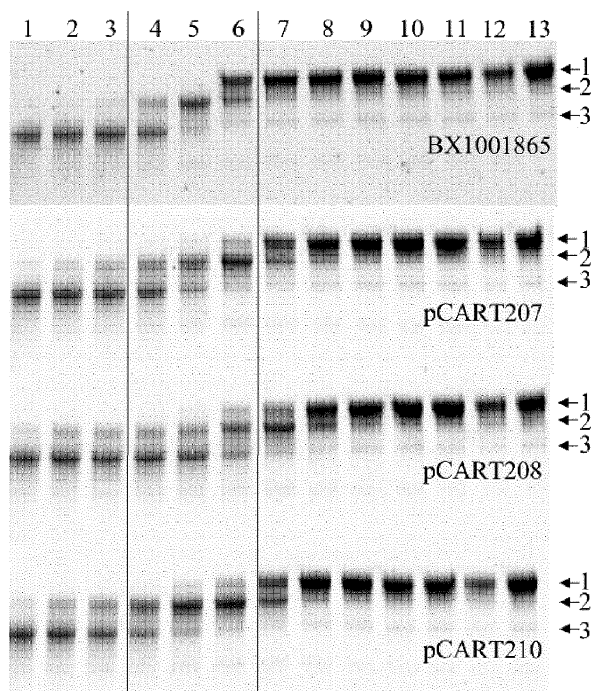
Фиг. 4



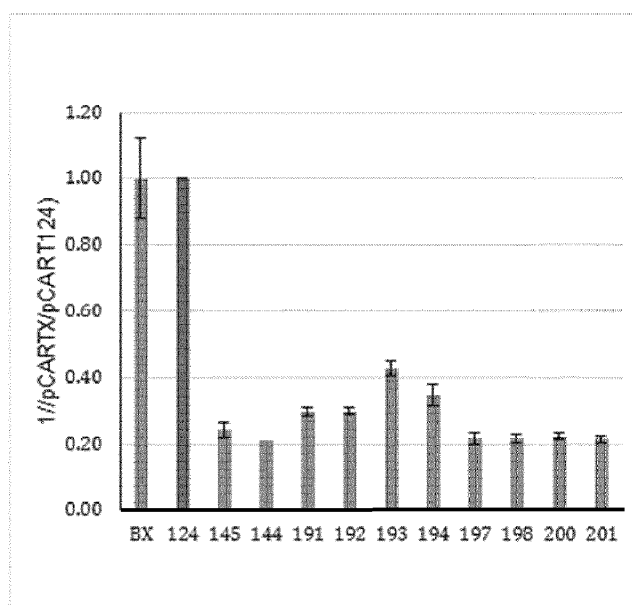
Фиг. 5



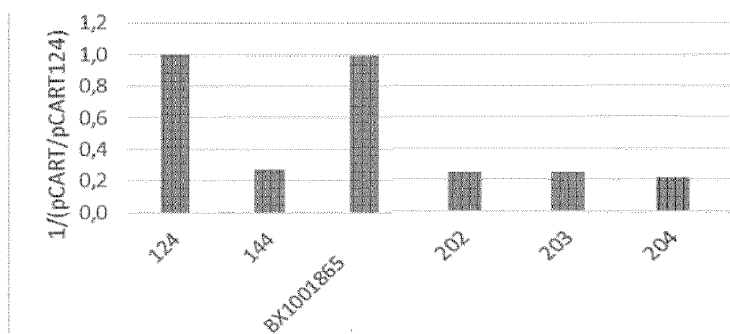
Фиг. 6



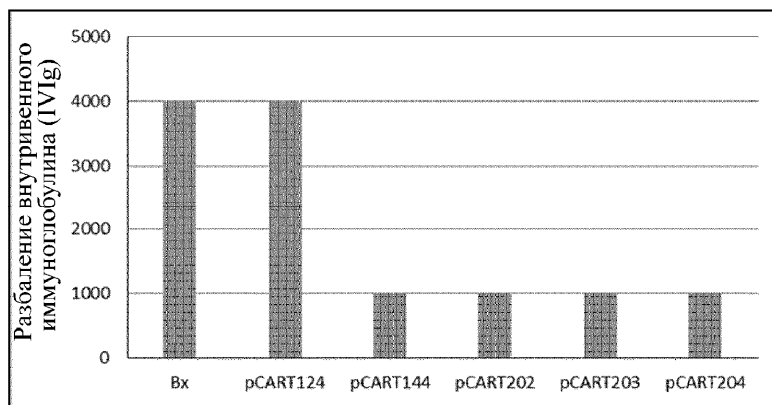
Фиг. 7



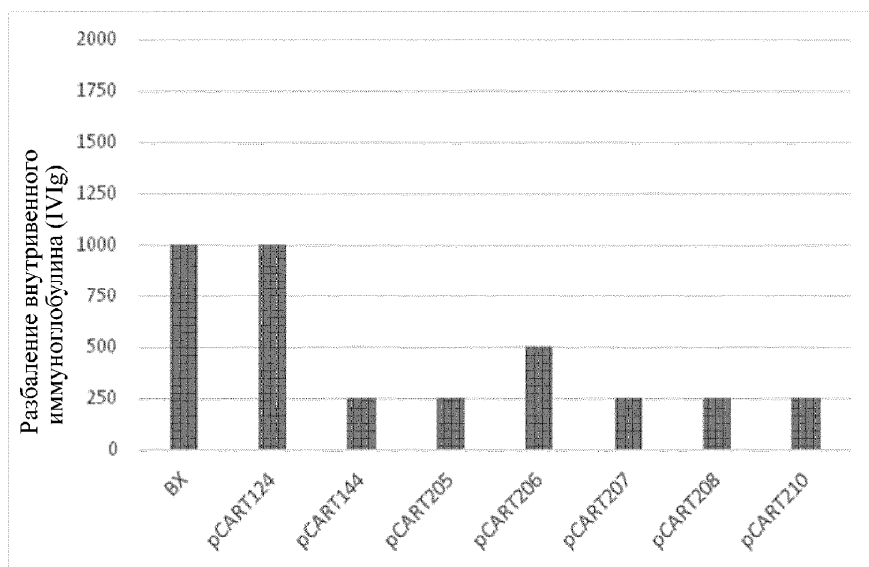
Фиг. 8



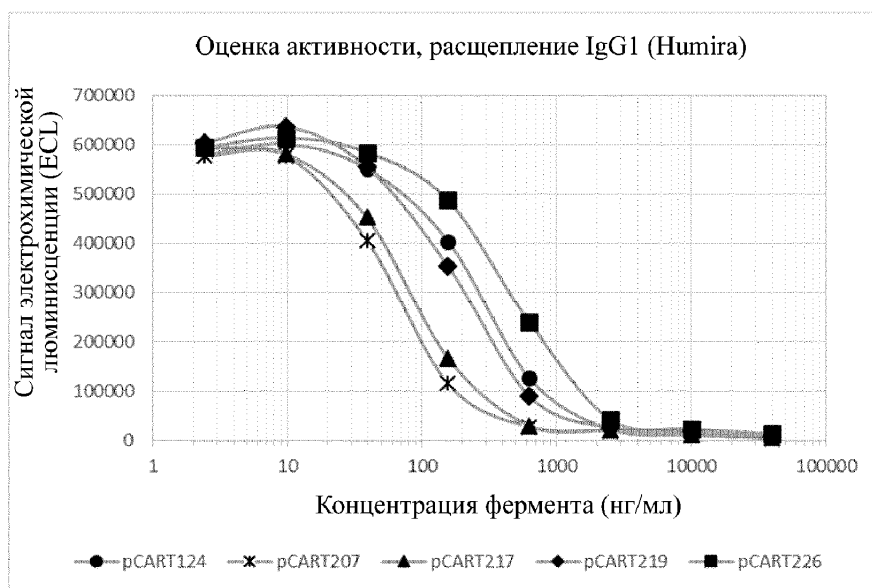
Фиг. 9



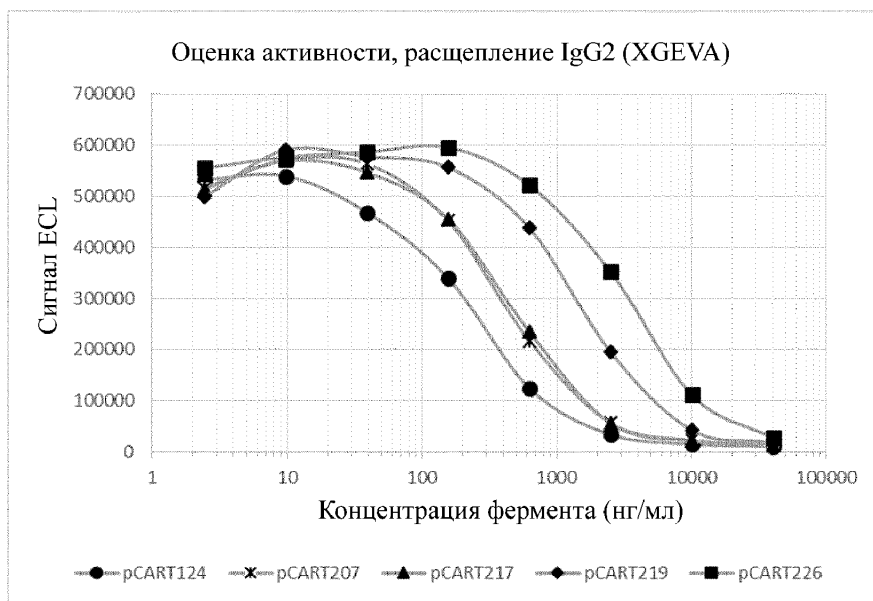
Фиг. 10



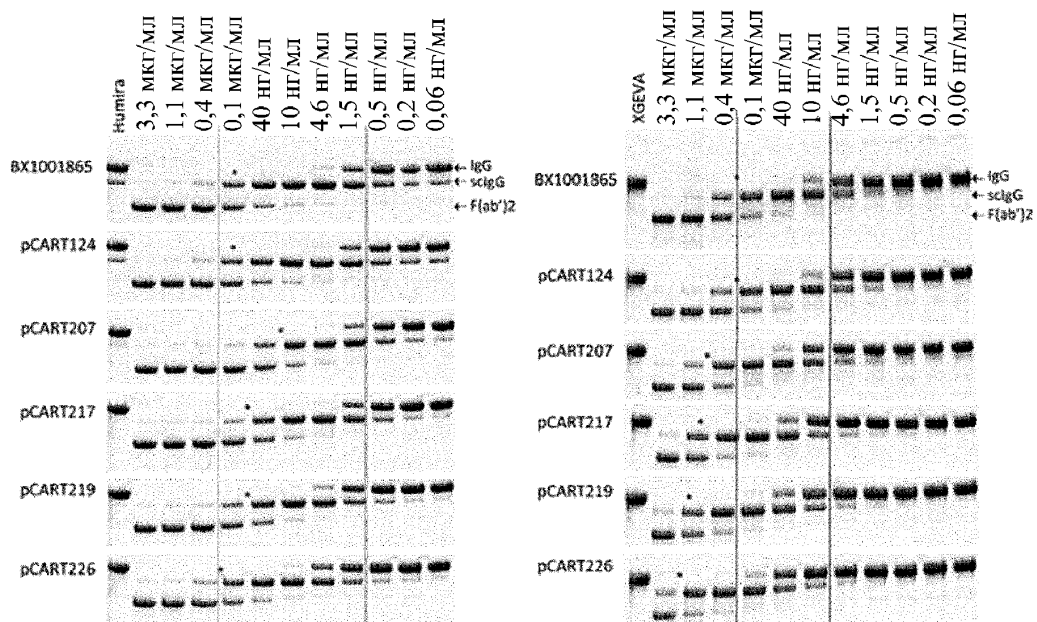
Фиг. 11



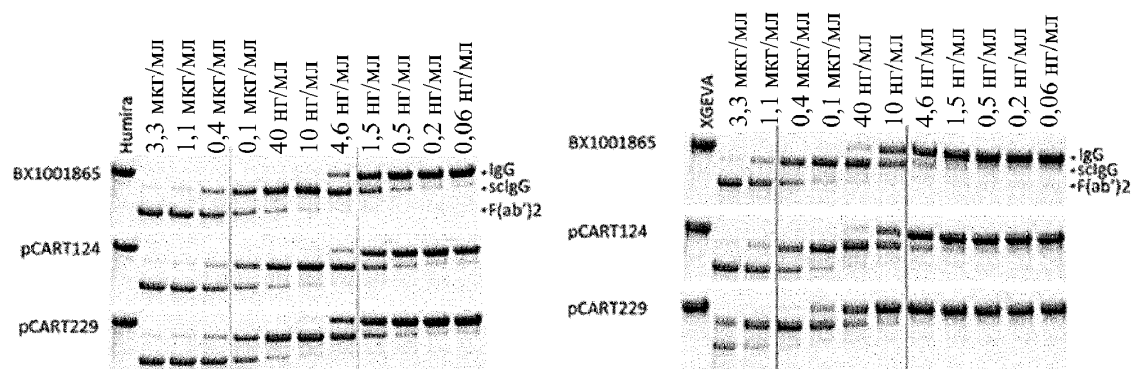
Фиг. 12



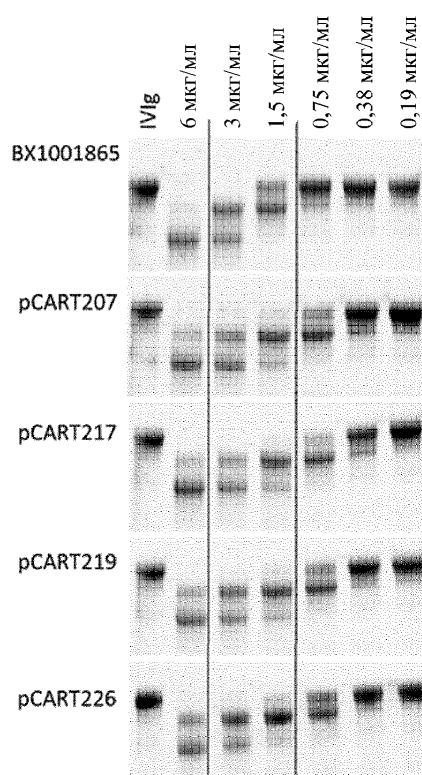
Фиг. 13

*A**B*

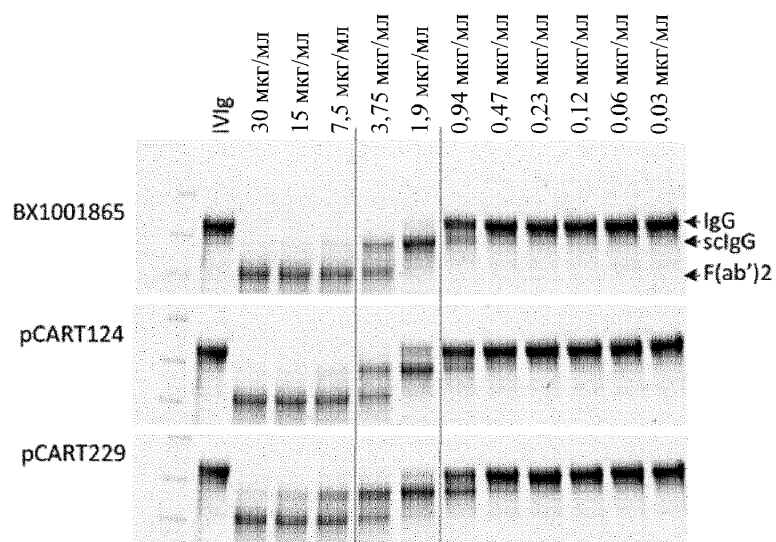
Фиг. 14А-В

*A**B*

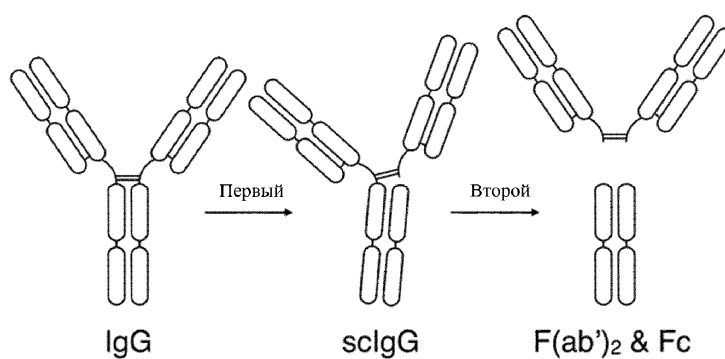
Фиг. 15А-В



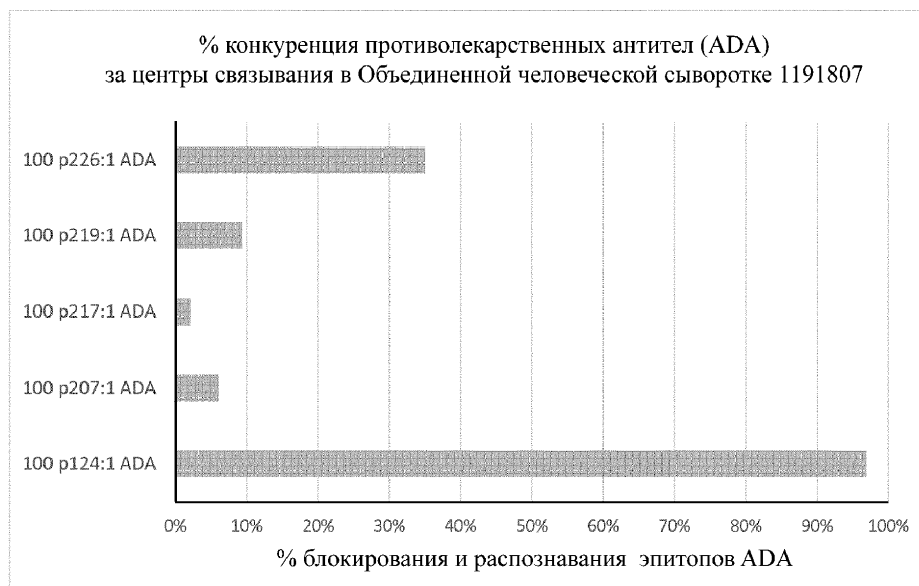
Фиг. 16



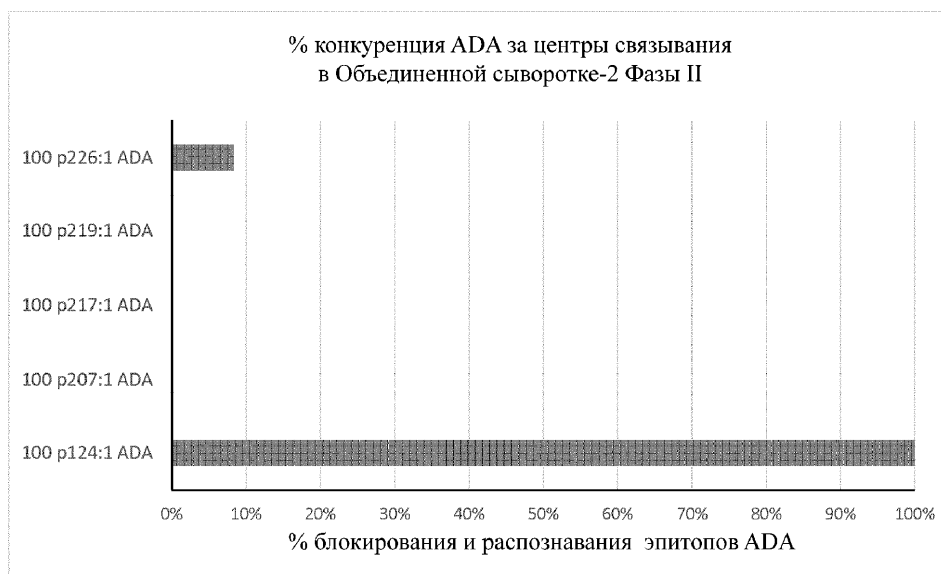
Фиг. 17



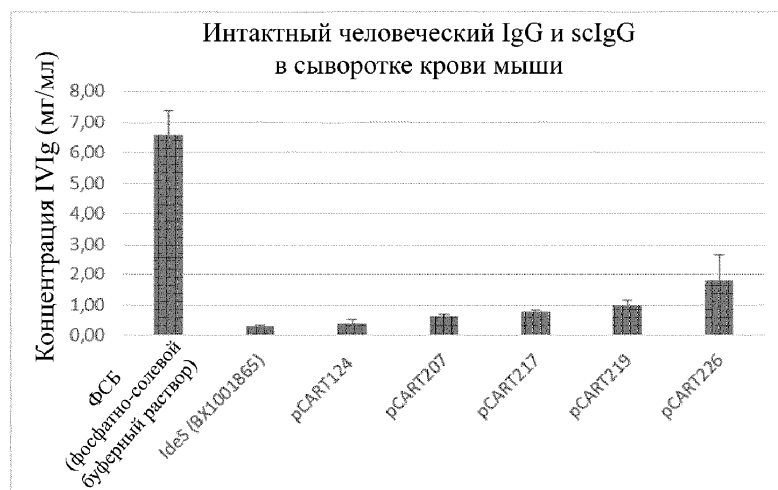
Фиг. 18



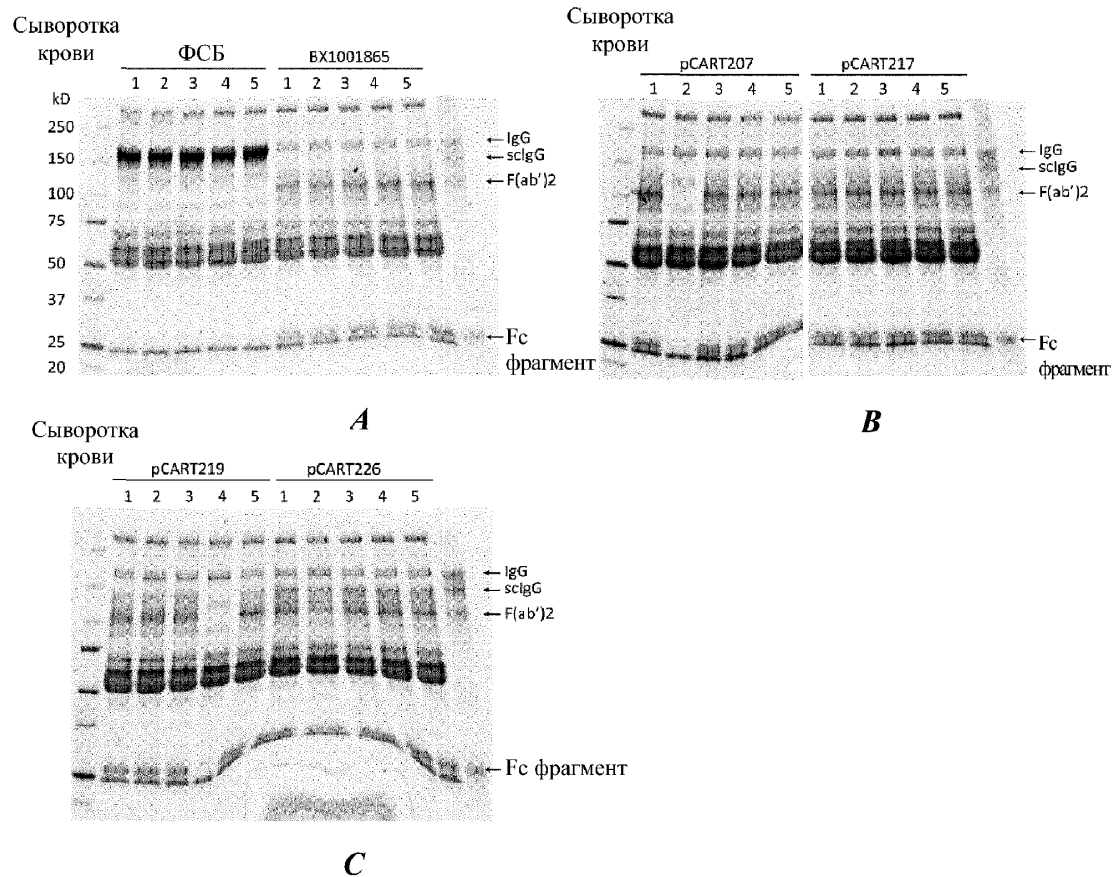
Фиг. 19



Фиг. 20



Фиг. 21



Фиг. 22А-С

