

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **037546**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2021.04.12**

(21) Номер заявки  
**201590928**

(22) Дата подачи заявки  
**2013.11.14**

(51) Int. Cl. **C07K 16/18** (2006.01)  
**C07K 16/42** (2006.01)  
**C12N 15/10** (2006.01)

**(54) РЕКОМБИНАНТНЫЕ ЗАХВАТЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ**(31) **61/726,040**(32) **2012.11.14**(33) **US**(43) **2015.09.30**(86) **PCT/US2013/069993**(87) **WO 2014/078475 2014.05.22**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**РИДЖЕНЕРОН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Дешпанде Дипали, Чэнь Ган, Бураков  
Дарья, Фэнлд Джеймс, Олдрич Томас,  
Камат Вишал (US)**

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

(56) **WO-A2-02057423****EP-A2-0107509****US-A1-2009137416****US-A1-2010331527**

**MENG Y.G. ET AL.:** "Green fluorescent protein as a second selectable marker for selection of high producing clones from transfected CHO cells", GENE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 242, no. 1-2, 1 January 2000 (2000-01-01), pages 201-207, XP004196520, ISSN: 0378-1119, DOI: 10.1016/50378-1119(99)00524-7 abstract Results 3.2, 3.3

**MANZ R. ET AL.:** "Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, US, vol. 92, no. 6, 14 March 1995 (1995-03-14), pages 1921-1925, XP002007404, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/PNAS.92.6.1921, the whole document  
**EP-A1-2522724**

(57) Настоящее изобретение относится к рекомбинантному антигенсвязывающему белку, который связывается с Fc-доменом IgG1 человека, Fc-доменом IgG2 человека или Fc-доменом IgG4 человека, выделенному полинуклеотиду, кодирующему указанный белок, экспрессионному вектору, клетке-хозяину, экспрессирующей указанный белок, и способу детектирования или выделения клетки-хозяина, которая экспрессирует гетеродимерный белок.

**B1****037546****037546****B1**

### Предпосылки создания изобретения

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Эта заявка испрашивает согласно § 119(e) раздела 35 свода законов США приоритет предварительной заявки на патент США № 61/726040, поданной 14 ноября 2012 года, которая при этом включена сюда посредством ссылки в ее полном объеме.

Список последовательностей

Эта заявка включает посредством ссылки список последовательностей, представленный в машиночитаемой форме как файл 8600WO\_ST25.txt, созданный 12 ноября 2013 года (86267 байтов).

### Область техники

Область настоящего изобретения относится к рекомбинантным захватывающим белкам клеточной поверхности и способам идентификации, выделения клеток, продуцирующих секретиремые белки, которые являются гетеродимерами, например биспецифическими белками, и обогащения ими. Конкретнее захватывающие белки клеточной поверхности и способы позволяют быстро и эффективно выделить клеточные линии, продуцирующие рекомбинантные антитела на высоком уровне экспрессии, в том числе быстро и эффективно выделить специфические гибридомы и клетки, секретирующие гетеродимерные белки, например биспецифические антитела, тем самым обогатить гетеродимерным типом молекул (биспецифической молекулой) и преимущественно отделить гетеродимерный тип от гомодимерного типа молекул.

Способы известного уровня техники для экспрессии представляющего интерес гена (GOI) в клетке-хозяине известны. Вкратце, экспрессионный вектор, содержащий GOI, вводят в клетку. После стабильной интеграции стандартные методы выделения клеток с высоким уровнем экспрессии включают сбор пулов клеток, отбор вручную колоний с чашек, выделение отдельных клеток с помощью предельного разведения или другие способы, известные в данной области техники. Пулы или отдельные клоны затем размножают и подвергают скринингу в отношении продукции представляющего интерес белка (POI) путем прямого измерения активности POI, путем иммунологического детектирования POI или с помощью других подходящих методов. Эти процедуры являются трудоемкими, неэффективными, дорогостоящими, и число клонов, которое можно проанализировать, обычно ограничивается несколькими сотнями.

Большая степень неоднородности в экспрессии белков клетками после стабильной интеграции предписывает скрининг множества отдельных клонов, чтобы идентифицировать редкое событие интеграции, которое приводит к стабильной линии клеток с высоким уровнем экспрессии - продукции. Это предписание вызывает необходимость в способах, которые позволяют быстро идентифицировать и выделить клетки, показывающие самый высокий уровень продукции белка. Кроме того, при сборе пулов клонов или отобранных вручную колоний возникает угроза потери клеток с высокими уровнями экспрессии, которые часто растут более медленно по отношению к более быстро растущим клеткам с низким уровнем экспрессии. Таким образом, существует потребность в способах, которые позволяют быстро скринировать и выделить отдельные клетки, способные к экспрессии на высоком уровне секретиремого POI. Если POI содержит более одной субъединицы, необходимо осуществить отбор преимущественно в пользу желаемого гетеродимерного типа относительно гомодимерного типа.

Включение проточной цитометрии в способы, используемые для выделения стабильных экспрессирующих линий клеток, увеличило возможность скрининга большого числа отдельных клонов, однако имеющиеся в распоряжении в настоящее время способы остаются несоответствующими по различным причинам. Диффузия POI между клетками с различными характеристиками также была проблемой.

### Краткое изложение сущности изобретения

Настоящее изобретение описывает способ скрининга с высокой пропускной способностью для быстрого выделения тех клеток, которые секретируют белок, посредством прямого скрининга в отношении представляющего интерес белка (POI). Это изобретение также обеспечивает возможность удобного слежения за экспрессией POI на основе одной клетки в ходе процесса производства. Кроме того, эта технология может быть непосредственно применена к скринингу продуцирующих биспецифические антитела клеток или любой клетки, продуцирующей гетеродимерный белок. Эта технология также может быть непосредственно применена к скринингу клеток, продуцирующих модифицированные Т-клеточные рецепторы, таких как, например, клетки, которые продуцируют растворимые формы Т-клеточных рецепторов.

В одном аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному антигенсвязывающему белку, который связывается с Fc-доменом IgG1 человека, Fc-доменом IgG2 человека или Fc-доменом IgG4 человека, где рекомбинантный антигенсвязывающий белок связывается с Fc-доменом и не связывается с Fc\*-доменом, где Fc-домен содержит His95 и Tyr96, а Fc\*-домен содержит Arg95 и Phe96 в соответствии с системой нумерации экзонов IMGT, и содержит

(i) антитело или ScFv, содержащие CDR-1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, HCDR-2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, HCDR-3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, CDR-1 легкой цепи (LCDR-1), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и LCDR-2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31;

(ii) мембранный якорный домен, в частности, где

а) антигенсвязывающий белок содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 15, и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 16, или

б) антигенсвязывающий белок содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

В одном из вариантов осуществления изобретения рекомбинантный антигенсвязывающий белок представляет собой слитый с ScFv белок, включающий

а) (i) переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 15,

(ii) переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 16, и

(iii) мембранный якорный домен, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 21; или

б) (i) переменный домен тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 15,

(ii) переменный домен легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 16, и

(iii) мембранный якорный домен, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 21.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, включающему последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует

а) антигенсвязывающий белок по изобретению; или

б) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к экспрессионному вектору в виде нуклеиновой кислоты, включающему

(а) полинуклеотид по изобретению;

(б) промотор, который функционально связан с полинуклеотидом; и

(с) последовательность полиаденилирования, предпочтительно к вектору, дополнительно включающему последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей

а) селективируемый маркер, или

б) используемый для переноса энергии белок, содержащий зеленый флуоресцентный белок или желтый флуоресцентный белок ("YFP"), более предпочтительно, к вектору, где:

а) промотор представляет собой промотор CMV;

б) селективируемый маркер придает устойчивость к неомицину;

с) используемым для переноса энергии белком является зеленый флуоресцентный белок или желтый флуоресцентный белок ("YFP"), еще более предпочтительно к вектору, замкнутому в круг или линейному.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, экспрессирующему антигенсвязывающий белок по изобретению, предпочтительно где клеткой является клетка CHO.

В следующем аспекте настоящее изобретение относится к способу детектирования или выделения клетки-хозяина, которая экспрессирует гетеродимерный белок, включающий стадии

(а) экспрессии в клетке-хозяине захватывающего белка клеточной поверхности (CSCP), содержащего антигенсвязывающий белок по изобретению, и гетеродимерного белка,

где (i) CSCP связывается с первым сайтом в гетеродимерном белке с образованием комплекса CSCP-гетеродимерный белок внутри клетки-хозяина, (ii) комплекс CSCP-гетеродимерный белок переносится через клетку-хозяина и (iii) затем представляется на поверхности клетки-хозяина;

(б) приведения клетки-хозяина в контакт с детекторной молекулой, причем детекторная молекула связывается со вторым сайтом в гетеродимерном белке;

(с) отбора клетки-хозяина, которая связывается с детекторной молекулой, где в гетеродимерном белке

(i) первый сайт находится в тяжелой цепи, которая имеет CH3-домен, содержащий остаток гистидина в положении 95 и остаток тирозина в положении 96 в соответствии с системой нумерации экзонов IMGT (Fc); и

(ii) второй сайт находится в тяжелой цепи, которая имеет CH3-домен, содержащий остаток аргинина в положении 95 и остаток фенилаланина в положении 96 в соответствии с системой нумерации экзонов IMGT (Fc\*).

В одном из вариантов осуществления изобретения способ включает стадию приведения клетки-хозяина в контакт с блокирующей молекулой до отбора клетки-хозяина на стадии (с), причем блокирующая молекула связывается с CSCP, который не связан с гетеродимерным белком, но не связывается с комплексом CSCP-гетеродимерный белок, предпочтительно где стадию отбора (с) выполняют с помощью сортировки клеток с возбуждением флуоресценции.

В другом варианте осуществления изобретения в способе по изобретению гетеродимерный белок

включает антитело, и первый сайт находится в антителе и расположен в тяжелой цепи, включающей СН3-домен дикого типа.

В другом варианте осуществления изобретения в способе по изобретению детекторная молекула (DM) включает

(а) антигенсвязывающий белок, включающий варибельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 38, и варибельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 39, или

(б) антигенсвязывающий белок, включающий тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 40, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 41, предпочтительно где блокирующей молекулой является нечеловеческий IgG или Fc-молекула человека.

Другие цели и преимущества станут очевидными в результате рассмотрения последующего подробного описания.

### **Подробное описание настоящего изобретения**

Прежде чем способы настоящего изобретения будут описаны, следует понимать, что это изобретение не ограничивается конкретными способами и экспериментальными условиями, которые описаны, поскольку такие способы и условия могут изменяться. Также следует понимать, что используемая здесь терминология предназначена лишь для описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

Используемые в этом описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Таким образом, например, ссылка на "способ" включает один или более способов и/или стадий типа, который описан здесь и/или который станет очевидным квалифицированным в данной области техники специалистам после прочтения этого описания, и так далее.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют значение, одинаковое со значением, в котором они обычно понимаются специалистом со средним уровнем компетентности в области техники, к которой относится это изобретение. Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые здесь описаны, могут использоваться при осуществлении на практике или проверке настоящего изобретения, предпочтительные способы и материалы описаны ниже. Все публикации, упомянутые здесь, включены сюда посредством ссылки в их полном объеме.

#### **Общее описание**

Способ настоящего изобретения обеспечивает значительные преимущества по сравнению с существующими способами выделения и идентификации секретирующих белки клеток. Например, клетки, которые секретируют антитела, можно быстро и удобно выделить на основе желаемой специфичности, авидности или изотипа. Кроме того, количество секретируемого белка, который продуцируется, можно определить непосредственно, в отличие от многих способов в предшествующем уровне техники, в которых количество продукции секретируемого белка определяют косвенно.

В последнее время два дополнительных способа, в которых используется проточная цитометрия, были разработаны для выделения с высокой пропускной способностью стабильных линий клеток с высоким уровнем экспрессии. Первый способ включает модификацию экспрессионной плазмиды с включением транскрипционного считывания мРНК с GOI. Это чаще всего осуществляется путем вставки участка внутренней посадки рибосом (IRES) и гена, белковый продукт которого легко контролировать с помощью проточной цитометрии, чаще всего зеленый флуоресцентный белок (GFP), между стоп-кодоном в GOI и концевым сайтом полиА (Meng et al. (2000) Gene 242: 201). Присутствие IRES позволяет POI и GFP транслироваться с одной и той же мРНК. Таким образом, уровень экспрессии гена GFP косвенно связан с уровнем мРНК с GOI. Клоны, которые накапливают в GFP на высоких уровнях, выделяют с помощью проточной цитометрии, а затем подвергают скринингу на предмет продукции POI. Поскольку этот способ зависит от сочетания экспрессии GOI с геном-репортером путем использования IRES в рекомбинантной конструкции, он не применим к выделению гибридом.

Использование проточной цитометрии при выделении экспрессирующих клонов создает возможность для быстрого анализа большого числа клонов в формате высокой пропускной способности. Кроме того, использование проточной цитометрии значительно снижает прямое манипулирование клетками. К сожалению, уровень продукции GFP не является прямым показателем уровня продукции POI. Различные механизмы могут разъединять продукцию секретируемого POI от накопления GFP. Различия в продукции POI и репортера GFP могут возникнуть в результате различий в эффективности трансляции двух генов, эффективности секреции POI или стабильности полицистронной мРНК.

Другой способ, в котором используется проточная цитометрия для выделения экспрессирующих клонов, включает инкапсуляцию клеток в агарозное микродряже (Weaver et al. (1990) Methods Enzymol. 2: 234). В этом способе биотинилированные антитела, специфические для POI, связывают с биотинили-

рованной агарозой с помощью стрептавидина, так что секретируемый POI захватывается и удерживается в микродраже (Gray et al., (1995) *J. Immunol. Methods* 182: 155). Захваченный POI детектируют с помощью иммуоокрашивания с использованием антитела, специфического для POI. Чтобы уменьшить поглощение POI, секретируемого из соседних клеток, инкапсулирующей агарозой, клетки помещают в среду с низким уровнем проницаемости. Эти клетки с наибольшим окрашиванием антителом POI в инкапсулирующей агарозе идентифицируют и выделяют с помощью проточной цитометрии. В способе с использованием гелевого микродраже клетки скринируются непосредственно в отношении их способности секретировать POI, а не косвенно в отношении экспрессии мРНК с GOI, но для этой процедуры необходимо наличие подходящих антител для захвата и окрашивания секретируемого POI, и для нее необходимо специальное оборудование для образования агарозного гелевого микродраже. Кроме того, некоторые клетки могут быть чувствительными к процессу инкапсуляции.

Один из вариантов этого способа позволяет обойти требование встраивать клетки в матрицу за счет непосредственного связывания антитела, специфического для POI, с клеточной поверхностью (Manz et al. (1995) *PNAS* 92: 1921-1925). В этом способе за неспецифическим биотинилированием белков клеточной поверхности с использованием биотин-гидроксисукцинимидного эфира следует контактирование с конъюгированным со стрептовидином антителом, способным связываться с POI. Клетки, секретирующие POI, становятся "декорированными" POI, который затем детектируют с помощью соответствующего меченого второго антитела. Однако диффузия POI между соседними клетками является проблематичной, и для этого способа также необходима среда с высокой вязкостью, чтобы уменьшить диффузию POI от экспрессирующих клеток. Поскольку эти среды с высокой вязкостью необходимы для различения клетки, клетки должны быть промыты и помещены в среду, подходящую для сортировки клеток, если это желательно.

Проблемы, связанные с идентификацией и выделением линий рекомбинантных клеток с высоким уровнем экспрессии, особенно распространяются на выделение гибридом, которые экспрессируют представляющее интерес антитело. Однако идентификация полезных гибридом включает несколько дополнительных проблем; их необходимо сначала скринировать в отношении антигенсвязывающей активности, затем в отношении изотипа иммуноглобулина. Кроме того, способы на основе GFP не применимы к идентификации и выделению гибридом, поскольку создание гибридом не включает рекомбинантный компонент, чтобы экспрессию генов антител можно было связать с транскрипцией репортера, такого как GFP. Скрининг гибридом является медленным, трудоемким предприятием, в котором скринируемое количество клонов ограничено существующими технологиями.

Настоящее изобретение описывает новый и ранее неизвестный способ идентификации и выделения клеток, которые продуцируют секретируемые белки. Настоящее изобретение основано на получении линии клеток, которая экспрессирует молекулу, располагаемую на поверхности клетки, которая связывается с POI. Представленный на клеточной поверхности POI можно затем детектировать посредством меченых различными детекторными молекулами. Количество POI, представленного на поверхности клеток, в определенных условиях является прямым показателем общего количества секретируемого POI. Продукты POI могут быть затем отделены от непродуцентов, и уровни продукции или характеристики POI могут быть дифференцированы. Преимущество настоящего изобретения заключается в том, что в нем непосредственно определяется количество секретируемого POI, а не косвенно измеряется мРНК.

Это изобретение относится к созданию и использованию клеток, которые экспрессируют захватывающие молекулы клеточной поверхности, которые связываются с различными секретируемыми POI в той же клетке, которая продуцирует POI. По мере секреции клеткой POI эти захватывающие молекулы клеточной поверхности связывают его, или комплексы POI и захватывающих молекул клеточной поверхности могут образовываться внутриклеточно, а затем секретироваться. Связывание может происходить аутокринным образом или при секреции. Клетки, которые продуцируют секретируемый POI, можно затем идентифицировать и выделить. Такая идентификация и выделение могут быть основаны на характеристиках POI, продукции POI или отсутствии таковых, или согласно конкретным уровням продукции. Захватывающую молекулу клеточной поверхности и/или POI может продуцировать клетка в ее природном состоянии, или захватывающие молекулы клеточной поверхности и/или POI могут быть продуцированы рекомбинантно. Посредством создания или использования такой клетки любой секретируемый белок может быть захвачен захватывающей молекулой клеточной поверхности при наличии соответствующего сродства между ними. Как объясняется далее, можно осуществлять манипулирование любой молекулой таким образом, чтобы ее можно было использовать в качестве захватывающей молекулы клеточной поверхности. Следовательно, это изобретение может использоваться для выделения любой клетки, которая секретирует белок.

Почти любой белок обладает способностью функционировать в качестве захватывающей молекулы клеточной поверхности, как описано в настоящем изобретении. Что необходимо - это способность желаемого белка к прикреплению к клеточной мембране и выставлению во внеклеточное пространство. Если желаемая клетка имеет сигнальную последовательность, то только мембранный якорь, в том числе, но без ограничения, трансмембранный якорь или сигнал сцепления GPI, нужно добавить к захватывающей молекуле клеточной поверхности, чтобы он оставался прикрепленным к клеточной мембране с об-

ращением наружу от клетки. Кроме того, если в желаемом белке отсутствует сигнальная последовательность, сигнальная последовательность может быть добавлена к аминоконцу желаемого белка, чтобы он переносился к поверхности клетки. Сигнальная последовательность и мембранный якорь могут быть природными по отношению к клетке, рекомбинантными или синтетическими.

Клетки часто секретируют широкий ряд белков, эндогенно или после введения рекомбинантной ДНК. Любой секретируемый белок можно идентифицировать, и клетку, продуцирующую его, можно выделить в соответствии со способом этого изобретения. Такие секретируемые белки включают, но без ограничения, факторы роста, рецепторы факторов роста, лиганды, растворимые компоненты рецепторов, антитела, биспецифические антитела, рекомбинантные молекулы Тгаp (-ловушки), Fc-содержащие слитые белки, sTCR, TCR-Fc и пептидные гормоны. Такие секретируемые белки могут быть или могут не быть рекомбинантными. Т.е. для секреции некоторых представляющих интерес белков из желаемой клетки может не требоваться введение дополнительных нуклеотидных последовательностей. Например, секреция антител из В-клеток или плазматических клеток не является результатом введения рекомбинантных нуклеотидных последовательностей в В-клетку или плазматическую клетку. Рекомбинантные секретируемые белки могут быть получены с помощью стандартных методов молекулярной биологии, хорошо известных квалифицированному специалисту (см., например, Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Vols 1, 2, and 3, 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, Eds. Ausubel et al., Greene Publ. Assoc, Wiley Interscience, NY). Эти секретируемые белки полезны для многих коммерческих и научных целей. Это изобретение охватывает продукцию таких секретируемых белков благодаря методологии настоящего изобретения. Детектирование клеток с представленным на поверхности POI может быть достигнуто за счет использования любой молекулы, способной прямо или косвенно связываться с представленным на поверхности POI. Такие детекторные молекулы могут способствовать детектированию и/или выделению клеток, представляющих POI на поверхности.

Настоящее изобретение применимо к выделению, в частности, а) лиганд-продуцирующих клеток, используя лиганд-специфический рецептор в качестве захватывающей молекулы клеточной поверхности, б) продуцирующих растворимые рецепторы клеток, используя специфический для связанного с поверхностью рецептора лиганд в качестве захватывающей молекулы клеточной поверхности, в) продуцирующих антитела клеток, используя связывающийся с антителом белок в качестве захватывающей молекулы клеточной поверхности, г) sTCR, используя s-TCR-связывающий белок (например, антиген, распознаваемый TCR) в качестве захватывающей молекулы клеточной поверхности, д) TCR-Fc, используя Fc-связывающий белок в качестве захватывающей молекулы клеточной поверхности, или е) биспецифических антител, которые содержат мутацию в одном из своих СН3-доменов, которая аннулирует связывание с белком А, используя захватывающую молекулу в виде слитого белка, который включает ScFv-домен, слитый с трансмембранным и цитоплазматическим доменом FcγR.

В соответствии с методологией этого изобретения клетку сначала трансфицируют вектором, содержащим нуклеотидную последовательность, которая кодирует захватывающую молекулу клеточной поверхности, которая способна связывать секретируемый POI, в условиях, когда такая захватывающая молекула клеточной поверхности экспрессируется. Трансфицированные клетки, которые являются подходящими продуцентами таких захватывающих молекул клеточной поверхности, затем детектируют и выделяют, и такие клетки подвергают культивированию. Эти клетки или могут по своей природе продуцировать POI, или POI может продуцироваться рекомбинантно. Если клетки по своей природе продуцируют POI, они готовы к детектированию и выделению. Если POI необходимо продуцировать рекомбинантно, то выделенные и подвергнутые культивированию клетки, экспрессирующие определенную захватывающую молекулу клеточной поверхности, трансфицируют второй нуклеотидной последовательностью, кодирующей секретируемый POI, в условиях, когда секретируемый POI экспрессируется. При экспрессии секретируемый POI связывается с захватывающими молекулами клеточной поверхности, и клетки, представляющие связанный POI на поверхности, детектируют и выделяют.

Если клетка продуцирует POI природно, клетку не будут трансфицировать нуклеотидной последовательностью, кодирующей POI. Следовательно, этот аспект настоящего изобретения применим к любым и всяким клеткам, продуцирующим POI. Кроме того, если клетка продуцирует природно захватывающую молекулу клеточной поверхности, клетку не нужно трансфицировать нуклеотидными последовательностями, кодирующими захватывающую молекулу клеточной поверхности. Следовательно, этот аспект настоящего изобретения применим к любым и всяким клеткам, продуцирующим захватывающую молекулу клеточной поверхности.

Широкий ряд клеток-хозяев может быть трансфицирован. Эти клетки могут иметь или эукариотическое, или прокариотическое происхождение. Часто клетки будут иммортализованными эукариотическими клетками, и в частности клетками млекопитающих, например клетками почки обезьян (COS), клетками яичника китайского хомячка (CHO), клетками HeLa, клетками почки детеныша хомячка (BHK), клетками почки эмбриона человека (HEK293), лейкоцитами, миеломами, линиями клеток, трансфицированных генами аденовируса, например AD5 E1, включая, но без ограничения, иммортализованные клет-

ки сетчатки человека, трансфицированные геном аденовируса, например клетки PER.C6™, и эмбриональными стволовыми клетками. Эти клетки могут быть также клетками не млекопитающих, включая бактериальные клетки, клетки грибов, дрожжей и насекомых, в том числе, но без ограничения, например, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, виды *Aspergillus*, *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*. Все клетки могут быть выращены в среде для планшетов для культивирования в соответствующих условиях или в синергическом хозяине. Наиболее желательными клетками будут клетки млекопитающих, которые можно культивировать.

Секретируемый POI, связанный с захватывающей молекулой клеточной поверхности, можно детектировать и выделить с помощью различных методов, известных в данной области техники. Клетки в культурах, представляющие секретируемый POI на своей поверхности, можно привести в контакт с (а) молекулой(ми), способной прямо или косвенно связываться с секретируемым POI, причем такая детекторная молекула(ы) может содержать метку детектирования, такую как, например, хромогенная, флуорогенная, имеющая окраску, флуоресцентная или магнитная метка. Метку, связанную с детекторной молекулой, можно детектировать и клетки выделить, используя различные методы. Наиболее предпочтительно, когда в популяции клеток будут детектировать метку, а клетку выделять, используя проточную цитометрию. Альтернативно детекторную молекулу можно использовать для непосредственно выделения клеток, представляющих POI на своей поверхности. Это может быть достигнуто путем конъюгации детекторной молекулы с планшетом для культивирования, парамагнитными молекулами или любой другой частицей или твердой подложкой. Кроме того, представленный на поверхности POI можно детектировать непосредственно по свойствам детекторной молекулы или POI.

В одном варианте осуществления две детекторные молекулы, которые связываются друг с другом и по-разному помечены, используются для детектирования представленного на поверхности, секретируемого POI, который блокирует это взаимодействие. Если клетка представляет на своей поверхности секретируемый POI, который связывается с первой детекторной молекулой и блокирует взаимодействие между первой и второй детекторной молекулой, то клетку можно выделить на основе присутствия только первой детекторной молекулы на ее поверхности. С другой стороны, если клетка представляет на своей поверхности секретируемый POI, который связывается с первой детекторной молекулой, но не блокирует взаимодействие между первой и второй детекторной молекулой, то клетку можно выделить на основе присутствия обеих детекторных молекул на ее поверхности. Например, продуцирующие антитела клетки, экспрессирующие антитела, которые специфически блокируют, или не блокируют, образование комплекса рецептор-лиганд, могут быть идентифицированы. Если детекторными молекулами являются рецептор и его лиганд, которые по-разному помечены, то продуцирующую антитело клетку, которая экспрессирует антитела, которые блокируют образование комплекса рецептор-лиганд, можно детектировать по присутствию одной метки на ее поверхности, тогда как продуцирующую антитела клетку, которая экспрессирует антитела, которые не блокируют образование комплекса рецептор-лиганд, можно детектировать по присутствию обеих меток на ее поверхности.

В любом из вариантов осуществления и в отношении отделения экспрессирующих клеток от не экспрессирующих клеток или в меньшей степени экспрессирующих клеток одним из основных препятствий, когда POI является секретируемым белком, является диффузия POI между соседними клетками. Следовательно, очень важно, что любая система, которая предназначена для захвата секретируемого POI на клеточную поверхность, должна предотвратить диффузию POI из экспрессирующей клетки в соседнюю клетку и ее плотное прилегание к этой клетке. Если диффузии разрешено иметь место и соседние клетки становятся "декорированными" секретируемым POI, то разделение клеток на основе степени декорирования POI не сможет дифференцировать клетки с высоким уровнем экспрессии от клеток с низким уровнем экспрессии и может не эффективно отделять экспрессирующие от не экспрессирующих клеток.

Следовательно, одним из вариантов осуществления настоящего изобретения является блокирование диффузии секретируемого POI между соседними клетками. Это может быть достигнуто путем добавления блокирующей молекулы, которая связывается или с захватывающей молекулой клеточной поверхности захвата, или POI, и предотвращает связывание секретируемого POI с захватывающей молекулой клеточной поверхности. В этом аспекте детекторные молекулы не связываются с блокирующей молекулой. Например, если рецептором клеточной поверхности является hFcγRI, а секретируемый POI имеет Fc-фрагмент IgG человека, то диффузия секретируемого POI между соседними клетками может быть заблокирована добавлением экзогенного IgG крысы в культуральные среды. Детектирование клеток, представляющих секретируемый POI на своей поверхности, но не связанный IgG крысы, достигается за счет использования антител, специфических в отношении Fc IgG человека, которые не распознают IgG крысы. В другом варианте осуществления связывание секретируемого POI между соседними клетками уменьшают посредством увеличения вязкости сред.

В одном варианте осуществления этого изобретения не допускается накапливание секретируемого POI в средах. Это может быть достигнуто путем регуляции экспрессии секретируемого POI и/или захватывающей молекулы клеточной поверхности так, чтобы недолгая экспрессия POI приводила к достаточ-

ному количеству POI для связывания с захватывающей молекулой клеточной поверхности, но недостаточным количеством для диффузии. В другом варианте осуществления клетки могут быть удалены из сред, содержащих накопленный POI, связанный с клетками POI снимают и допускают продолжение экспрессии POI в течение ограниченного периода времени, так что секретируемый POI не накапливается в средах. Белки могут быть сняты с помощью способов, известных в данной области техники, например, промывки клеток буфером с низким pH.

В соответствии с этим изобретением те клетки в клеточной популяции, которые связываются больше всего с детекторными молекулами, также экспрессируют больше всего секретируемый POI. В самом деле, чем большее количество POI секретирует отдельная клетка, тем большее количество POI представлено на поверхности клеток. Эта корреляция между количеством представленного на поверхности POI и уровнем экспрессии POI в этой клетке позволяет быстро идентифицировать клетки с желаемым относительным уровнем экспрессии из популяции клеток.

В одном варианте осуществления библиотека ДНК может быть использована для экспрессии секретируемого белка, который может быть представлен на поверхности клетки с помощью захватывающей молекулы клеточной поверхности. Например, библиотеку ДНК можно также создать из кодирующих областей переменных доменов антител из В-клеток, выделенных из иммунизированных животных. Библиотеку ДНК можно затем экспрессировать в клетке, которая экспрессирует захватывающую молекулу клеточной поверхности, специфическую для антител так, что клоны желаемой специфичности, изотипа или авидности могут быть идентифицированы и выделены с помощью способа настоящего изобретения. В другом варианте осуществления библиотеку ДНК можно создать из кодирующих областей переменных доменов Т-клеточных рецепторов из Т-клеток, и слить, например, с Fc, способным связываться с Fc-связывающим белком. Библиотеку ДНК можно затем экспрессировать в клетке, которая экспрессирует Fc-связывающий белок, так что клоны нужной специфичности, изотипа или авидности могут быть идентифицированы и выделены, как здесь описано.

В другом варианте осуществления могут быть созданы трансгенные млекопитающие, которые экспрессируют конкретную захватывающую молекулу клеточной поверхности в одном или более типов клеток. Клетки из таких трансгенных млекопитающих могут быть затем подвергнуты скринингу непосредственно в отношении продукции POI. Например, может быть желательной экспрессия захватывающей молекулы клеточной поверхности, специфической в отношении антител, в плазматических клетках. Соответственно плазматические клетки из иммунизированных мышей могут быть получены, и эти клетки, продуцирующие антитела, специфические в отношении желаемого антигена, могут быть выделены с помощью способа настоящего изобретения.

В дальнейшем варианте осуществления настоящего изобретения продукцию антител измеряют посредством использования линии клеток CHO, которые экспрессируют рецептор Fc $\gamma$ R1 (Fc $\gamma$ RI) человека, который связывает конкретное антитело или TCR-Fc, которое представляет собой POI.

В другом аспекте настоящего изобретения представляющий интерес белок включает один или более переменных доменов Т-клеточных рецепторов или растворимый Т-клеточный рецептор. Один или более переменных доменов Т-клеточного рецептора могут быть ковалентно связаны с составляющей, которая может связываться с захватывающим белком клеточной поверхности. В конкретном варианте осуществления один или более переменных доменов Т-клеточного рецептора слиты с последовательностью Fc, например последовательностью Fc человека, и захватывающим белком клеточной поверхности является Fc-рецептор, например Fc $\gamma$ R.

Общие структуры переменных доменов TCR известны (см., например, Lefranc and Lefranc (2001) *The T Cell Receptor FactsBook*, Academic Press, который включен сюда посредством ссылки; см., например, с 17-20; см. также Lefranc et al. (2003) *IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains*, *Developmental and Comparative Immunology* 27: 55-77, и Lefranc et al. (2005) *IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor constant domains and Ig superfamily C-like domains*, *Developmental and Comparative Immunology* 29: 185-203, каждый из которых включен сюда посредством ссылки). В одном варианте осуществления переменный домен TCR из TCR-Fc включает N-концевую область, содержащую переменный домен из 104-125 аминокислот. В другом варианте осуществления TCR-Fc, кроме того, включает константную область TCR, включающую 91-129 аминокислот. В другом варианте осуществления TCR-Fc, кроме того, включает соединяющий пептид, включающий 21-62 аминокислот.

В одном варианте осуществления последовательность Fc сливают непосредственно или через линкер с переменным доменом TCR. В другом варианте осуществления TCR-Fc включает переменную область TCR и константную область TCR, и последовательность Fc сливают непосредственно или через линкер с константной областью TCR. В другом варианте осуществления TCR-Fc включает переменную область TCR, константную область TCR и соединяющий пептид, и последовательность Fc сливают непосредственно или через линкер с соединяющим пептидом.

sTCR, TCR-Fc или слитый белок, включающий один или более переменных доменов Т-клеточного рецептора, может быть выбран, чтобы специфически связываться с представляющим интерес

антигеном, например веществом, продуцируемым опухолевой клеткой, например веществом опухолевой клетки, которое способно вызывать иммунный ответ у хозяина. В конкретном варианте осуществления антиген представляет собой антиген, который присутствует на поверхности опухолевой клетки (т.е. опухолевый антиген) и распознается Т-клеткой и который вызывает иммунный ответ у хозяина. Опухолевые антигены включают, например, альфафетопротейн (AFP), карциноэмбриональный антиген (CEA), MUC-1, эпителиальный опухолевый антиген (ETA), тирозиназу (например, в случае злокачественной меланомы), связанный с меланомой антиген (MAGE) и мутантные или аномальные формы других белков, таких как, например, *ras*, *p53* и т.д.

В одном варианте осуществления POI представляет собой TCR-Fc, и TCR-Fc включает переменную область  $\alpha$ -цепи TCR, слитую с последовательностью Fc, и  $\beta$ -цепь TCR, слитую с последовательностью Fc (каждая из которых слита непосредственно или через линкер), причем слияние  $\alpha$ -цепи TCR-Fc и слияние  $\beta$ -цепи TCR-Fc объединяются с образованием  $\alpha\beta$  TCR-Fc. В конкретном варианте осуществления  $\alpha\beta$  TCR-Fc включает следующие два полипептида: (1) переменную область  $\alpha$ -цепи TCR, слитую с константной областью  $\alpha$ -цепи TCR, слитой с последовательностью Fc, и (2) переменную область  $\beta$ -цепи TCR, слитую с константной областью  $\beta$ -цепи TCR, слитой с последовательностью Fc.

В другом варианте осуществления POI представляет собой TCR-Fc, содержащий переменную область  $\alpha$ -цепи TCR, переменную область  $\beta$ -цепи TCR и необязательно константную область  $\alpha$ -цепи TCR и/или константную область  $\beta$ -цепи TCR. В конкретном варианте осуществления TCR-Fc кодируется нуклеиновой кислотой, включающей (5'→3') последовательность переменной области  $\alpha$ -цепи TCR, за которой необязательно следует последовательность константной области  $\alpha$ -цепи TCR, последовательность переменной области  $\beta$ -цепи TCR, за которой необязательно следует последовательность константной области  $\beta$ -цепи TCR, необязательно линкер, а затем последовательность Fc. В конкретном варианте осуществления TCR-Fc кодируется нуклеиновой кислотой, включающей (5'→3') последовательность переменной области  $\beta$ -цепи TCR, за которой необязательно следует последовательность константной области  $\beta$ -цепи TCR, последовательность переменной области  $\alpha$ -цепи TCR, за которой необязательно следует последовательность константной области  $\alpha$ -цепи TCR, необязательно линкер, а затем последовательность Fc. В различных вариантах осуществления конструкциям, кодирующим TCR-Fc, предшествуют сигнальные последовательности, например сигнальные последовательности секреции, что делает их секретруемыми.

В другом варианте осуществления POI представляет собой TCR-Fc, и TCR-Fc включает TCR-Fc, включающий  $\gamma$ -цепь TCR, слитую с последовательностью Fc, и переменную область  $\delta$ -цепи TCR, слитую с последовательностью Fc, с образованием  $\gamma\delta$  TCR-Fc. В конкретном варианте осуществления  $\gamma\delta$  TCR-Fc включает следующие два полипептида: переменную область  $\gamma$ -цепи TCR, слитую с константной областью  $\gamma$ -цепи TCR, слитой с последовательностью Fc, и (2) переменную область  $\delta$ -цепи TCR, слитую с константной областью  $\delta$ -цепи TCR, слитой с последовательностью Fc.

Переменные области Т-клеточного рецептора можно идентифицировать и/или клонировать любым способом, известным в данной области техники. Переменные области Т-клеточного рецептора из представляющего интерес белка могут быть получены, например, путем экспрессии в клетке реаранжированной ДНК переменной области Т-клеточного рецептора, например, слитой с последовательностью Fc человека. Реаранжированные переменные области Т-клеточного рецептора, специфические в отношении конкретного антигена, могут быть получены любым подходящим способом, известным в данной области (см. ссылки ниже), например путем подвергания мыши воздействию антигена и выделения Т-клеток из мыши, создания гибридом Т-клетки мыши и скрининга гибридом с использованием представляющего интерес антигена для получения представляющей интерес гибридомы. Реаранжированные переменные области Т-клеточного рецептора, специфические в отношении представляющего интерес антигена, могут быть клонированы, исходя из представляющих интерес гибридом(ы). Переменные области Т-клеточного рецептора, специфические в отношении антигена, можно также идентифицировать, используя технологию фагового дисплея, например, как это предусмотрено в ссылках ниже. Переменные области можно затем клонировать и слить, например, с Fc человека для получения представляющего интерес белка, который может связываться с захватывающей молекулой клеточной поверхности, которая представляет собой Fc $\gamma$ R.

Методы идентификации и/или клонирования переменных областей Т-клеточного рецептора описаны, например, в патенте США № 5635354 (праймеры и методы клонирования); Genevee et al. (1992) An experimentally validated panel of subfamily-specific oligonucleotide primers (V $\alpha$ 1-w29/V $\beta$ 1-w24) for the study of human T cell receptor variable V gene segment usage by polymerase chain reaction, *Eur. J. Immunol.* 22: 1261-1269 (праймеры и методы клонирования); Gorski et al. (1994) Circulating T Cell Repertoire Complexity in Normal Individuals and Bone Marrow Recipients Analyzed by CDR3 Size Spectratyping, *J. Immunol.* 152: 5109-5119 (праймеры и методы клонирования); Johnston, S. et al. (1995) A novel method for sequencing members of multi-gene families, *Nucleic Acids Res.* 23/15: 3074-3075 (праймеры и методы клонирования); Pannetier et al. (1995) T-cell repertoire diversity and clonal expansions in normal and clinical samples, *Immu-*

nology Today 16/4:176-181 (методы клонирования); Hinz, T. and Kabelitz, D. (2000) Identification of the T-cell receptor alpha variable (TRAV) gene(s) in T-cell malignancies, *J. Immunol. Methods* 246: 145-148 (методы клонирования); van Dongen et al. (2002) Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: патент США № 6623957 (способы клонирования и праймеры); Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936, *Leukemia* 17: 2257-2317 (праймеры и методы клонирования); Hodges et al. (2002) Diagnostic role of tests for T cell receptor (TCR) genes, *J. Clin. Pathol.* 56: 1-11 (методы клонирования); Moyses, R. et al. (2004) Amplification and one-step expression cloning of human T cell receptor genes, *Anal. Biochem.* 326: 284-286 (методы клонирования); Fernandes et al. (2005) Simplified Fluorescent Multiplex PCR Method for Evaluation of the T-Cell Receptor V $\beta$ -Chain Repertoire, *Clin. Diag. Lab. Immunol.* 12/4: 477-483 (праймеры и методы клонирования); Li, Y. et al. (2005) Directed evolution of human T-cell receptors with picomolar affinities by phage display, *Nature Biotech.* 23/3: 349-354 (праймеры и методы клонирования); Wlodarski et al. (2005) Pathologic clonal cytotoxic T-cell responses: nonrandom nature of the T-cell receptor restriction in large granular lymphocyte leukemia, *Blood* 106/8: 2769-2780 (методы клонирования); Wlodarski et al. (2006) Molecular strategies for detection and quantitation of clonal cytotoxic T-cell responses in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome, *Blood* 108/8: 2632-2641 (праймеры и методы клонирования); Boria et al. (2008) Primer sets for cloning the human repertoire of T cell Receptor Variable regions, *BMC Immunology* 9:50 (праймеры и методы клонирования); Richman, S. and Kranz, D. (2007) Display, engineering, and applications of antigen-specific T cell receptors, *Biomolecular Engineering* 24: 361-373 (методы клонирования). Примеры sTCR представлены, например, в патентах США № 6080840 и 7329731; и Laugel, B et al. (2005) Design of Soluble Recombinant T Cell Receptors for Antigen Targeting and T Cell Inhibition, *J. Biol. Chem.* 280: 1882-1892; которые включены сюда посредством ссылки. Fc-последовательности описаны здесь; примеры Fc-последовательностей и их использование в слитых белках представлены, например, в патенте США № 6927044, выданном Stahl и др. Все из вышеприведенных ссылок включены сюда посредством ссылки.

В дальнейшем варианте осуществления настоящего изобретения захватывающая молекула клеточной поверхности предназначена для взаимодействия с теми представляющими интерес белками, которые обычно не способны связываться с достаточным сродством и связываются с низким сродством с захватывающей молекулой Fc $\gamma$ R, и представления их на поверхности. Эти представляющие интерес белки включают молекулы IgG4 и IgG2. Соответственно модульная захватывающая молекула была разработана и создана на основе ScFv-домена, слитого с трансмембранным (ТМ) и цитоплазматическим доменом Fc $\gamma$ R. ScFv-домен был получен из антитела против Fc человека с высоким сродством и содержит переменный домен тяжелой цепи, слитый с переменным доменом легкой цепи. Трансмембранный-цитоплазматический домен Fc $\gamma$ R был использован, чтобы обеспечить надлежащую вставку и ориентацию в плазматической мембране. Слитый белок ScFv-Fc $\gamma$ R-ТМ-сyto способен связываться с IgG4 и другими Fc-содержащими молекулами, а также подтипами IgG2 и IgG1 и такими гетеродимерными молекулами (например, биспецифическими антителами), которые включают по меньшей мере один СН3-домен дикого типа, причем другой СН3-домен может содержать замену Fc\*-типа.

В другом варианте осуществления настоящего изобретения захватывающая молекула клеточной поверхности предназначена для взаимодействия с теми представляющими интерес белками, которые содержат модифицированный СН3-домен, например полипептид Fc\*, который включает аминокислотные замены Н95R и Y96F (нумерация основана на системе нумерации IMGT), например SEQ ID NO: 42, и представления их на поверхности. Эти представляющие интерес белки включают биспецифические антитела, например антитела в виде гетеротетрамеров, которые полезны при получении биспецифических антител, в общем описаны в публикации заявки на патент США № US 2010/0331527 A1, 30 декабря 2010, которая включена сюда в ее полном объеме посредством ссылки. Соответственно модульная захватывающая молекула была разработана и создана на основе ScFv\*-домена, слитого с трансмембранным (ТМ) и цитоплазматическим доменом Fc $\gamma$ R. ScFv\*-домен был получен из антитела против Fc\* с высоким сродством и содержит переменный домен тяжелой цепи, слитый с переменным доменом легкой цепи. Трансмембранный-цитоплазматический домен Fc $\gamma$ R был использован, чтобы обеспечить надлежащую вставку и ориентацию в плазматической мембране. Слитый белок ScFv\*-Fc $\gamma$ R-ТМ-сyto связывается с любой Fc\*-содержащей молекулой, например IgG3 дикого типа и гетеродимерами IgG4, IgG2 и IgG1, которые содержат по меньшей мере одну последовательность полипептида Fc\*.

### Примеры

Следующие примеры предлагаются для предоставления специалистам в данной области техники полного раскрытия и описания того, как изготовить и использовать способы и композиции настоящего изобретения, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы считают своим изобретением. Были предприняты усилия, чтобы обеспечить точность в отношении используемых чисел (например, количеств, температуры и т.д.), но некоторые экспериментальные ошибки и отклонения должны учитываться. Если не указано иное, части являются весовыми частями, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура представлена в градусах Цельсия и давление равно или близко к атмосферному.

## Пример 1.

Конструирование рТЕ084. рТЕ084 конструировали посредством лигирования XbaI-фрагмента размером 1436 п.о. из рСА100, которая кодирует Fc $\gamma$ RI человека (hFc $\gamma$ RI; номер доступа в GenBank: M21091) в сайт для XbaI в рRG821. Ориентацию hFc $\gamma$ RI в желательных плаزمиде в результате лигирования исследовали с помощью рестрикционного картирования с использованием NotI, PstI, EcoRI и StuI. рТЕ084 была разработана для экспрессии на высоком уровне hFc $\gamma$ RI, рецептора клеточной поверхности с высоким сродством к Fc-домену IgG человека. Она содержит две независимые экспрессионные кассеты. Одной кассетой является ген hFc $\gamma$ RI под контролем промотора CMV-MIE, а второй кассетой является ген неомидин-фосфотрансферазы II (NPT), который придает устойчивость к G418, под контролем позднего промотора SV40.

Конструирование производного CHO K1, которое экспрессирует hFc $\gamma$ RI. Клетки CHO K1 ( $4 \times 10^6$ ) трансфицировали рТЕ084, используя Lipofectamine™ (Life Technologies; Rockville, MD), следуя указаниям производителя. Клетки помещали в культуральную среду (10% фетальной бычьей сыворотки, 90% F-12 Хэма, 2 мМ L-глутамин, все реагенты были от Life Technologies, Rockville, MD), содержащую 500 мкг/мл G418 (Life Technologies), на 15 дней. Клетки, которые переживали отбор с использованием G418, обрабатывали трипсином, объединяли и окрашивали конъюгированным с FITC Fc-фрагментом IgG человека (FITC-hFc; Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Вкратце, клетки, выращенные на 10-см чашках для культивирования, промывали один раз забуференным фосфатом солевым раствором Дульбекко (PBS) без хлорида кальция и хлорида магния (Life Technologies). Три миллилитра 0,25% трипсина (Life Technologies) добавляли в каждую чашку. Чашки вращали до отсоединения клеток от чашки. Десять миллилитров культуральной среды сразу же добавляли в каждую чашку с отсоединенными клетками. Затем клетки собирали путем центрифугирования при  $1000 \times g$  в течение 4 мин. После удаления супернатанта клетки ресуспендировали в 4 мл 2 мкг/мл FITC-hFc, разведенного в культуральной среде. Затем клетки помещали на платформу шейкера и окрашивали в течение 1 ч при комнатной температуре. Для удаления не связавшегося FITC-hFc клетки дважды промывали 20 мл PBS. Уровень метки FITC-hFc на клетках измеряли с помощью проточной цитометрии в клеточном сортере MOFLO™ (Cytomation; Fort Collins, CO). FITC-hFc не окрашивал ложнотрансфицированные родительские клетки CHO K1, но вызывал распределение флуоресценции в устойчивом к G418, рТЕ084-трансфицированном пуле. Первый 1% больше всего флуоресцирующих клеток из отобранного пула помещали в 96-луночные планшеты в количестве 1 клетка/лунку с использованием проточной цитометрии. Через девять дней 88 клеточных клонов в 96-луночных планшетах размножали в 24-луночных планшетах. Спустя 3 дня клетки в отдельных лунках промывали один раз 1 мл PBS, окрашивали 0,5 мл 2 мкг/мл FITC-hFc в течение 1 ч, дважды промывали 1 мл PBS и исследовали на окрашивание клеточной поверхности под флуоресцентным микроскопом. Тридцать три самых флуоресцирующих клонов были отобраны, размножены, затем подвергнуты скринингу с помощью проточной цитометрии.

Диффузия секретируемого белка между экспрессирующими клетками и не экспрессирующими клетками среди клеток была заблокирована путем добавления IgG: Поскольку все клетки в hFc $\gamma$ RI клональной клеточной линии экспрессируют hFc $\gamma$ RI клеточной поверхности, все они обладают способностью связывать IgG или слитые белки, состоящие из Fc-домена IgG. Поскольку hFc $\gamma$ RI связывает IgG различных видов (van de Winkel and Anderson, 1991), набор IgG животных был проверен на способность блокировать связывание белка, содержащего Fc IgG1 человека (hIgG1)-метку (4SC622) с hFc $\gamma$ RI-экспрессирующими клетками. 4SC622 является химерной молекулой, состоящей из экстраклеточного домена IL-2R $\gamma$ , слитого с экстраклеточным доменом hIL-4R $\gamma$ , который затем слит с Fc-доменом hIgG1. В этом эксперименте культуры RGC1 линию hFc $\gamma$ RI-экспрессирующих клеток, выбранную исходя из клеток CHO K1, которые были стабильно трансфицированы рТЕ084, инкубировали с 1 мкг/мл 4SC622 в течение 18 ч в присутствии или в отсутствие 1 мг/мл IgG различных видов в термостате для культур тканей при 37°C.

Связывание 4SC622 с клеточной поверхностью определяли с помощью проточной цитометрии после того, как промытые клетки были окрашены конъюгированным с фикоэритрином, направленным против IgG1 мыши моноклональным антителом AG184 (PE-AG184), специфическим для компонента hIL-2R $\gamma$  из 4SC622 (BD Pharmingen, San Diego, CA), следуя процедуре, изложенной для окрашивания клеток FITC-hFc.

Было установлено, что hIgG полностью блокирует связывание 4SC622 с hFc $\gamma$ RI, представленным на поверхности RGC1. Полученный от крысы, кролика и собаки IgG также эффективно блокировал связывание, тогда как полученный от коров и овец IgG не блокировал такое связывание. Способность добавляемого извне IgG крысы к блокированию связывания добавляемого извне Fc hIgG1-меченного белка (4SC622) с hFc $\gamma$ RI клеточной поверхности предполагает, что IgG крысы также может блокировать перенос между клетками, экспрессирующими Fc hIgG1-меченный белок на различных уровнях. Для проверки этого две линии клеток, которые можно различить по присутствию или отсутствию зеленого флуоресцентного белка (EGFP), были созданы, исходя из RGC1. Вкратце, для EGFP-мечения клеток RGC1,  $2 \times 10^6$

клеток RGC1 котрансфицировали 0,5 мг PTE073, которая кодирует ген гигромицин В-фосфотрансферазы под контролем промотора фосфоглицераткиназы, и 5 мг pRG816-EGFP, которая кодирует ген EGFP под контролем промотора CMV-MIE. Трансфицированные клетки отбирали с использованием 200 мкг/мл гигромицина В (Sigma, St. Louis, MO) в течение двух недель. Зеленые флуоресцирующие клетки выделяли с помощью проточной цитометрии. Один экспрессирующий EGFP и hFcγRI клон, RGC2, был использован в экспериментах по смешиванию клеток. Другая линия клеток, используемая в этих экспериментах, RGC4, была создана с помощью стабильной трансфекции RGC1 плазмидой pEE14.1-622. pEE14.1-622 представляет собой плазмиду, в которой экспрессия 4SC622 находится под контролем промотора CMV-MIE и включает миниген глутаминсинтетазы, который придает устойчивость к аналогу метионинсульфоксимины (MSX), и обеспечивает отбор событий стабильной интеграции. Клетки RGC4 экспрессируют hFcγRI на поверхности клеток и секретируют Fc hIgG1-меченный белок 4SC622. Один планшет со смешанными клетками, содержащими 50% клеток RGC2 и 50% RGC4, инкубировали с 1 мг/мл IgG крысы в течение 18 ч до окрашивания PE-AG184, затем исследовали с помощью проточной цитометрии. Обусловленная EGFP флуоресценция клеток RGC2 свидетельствует о том, что клетки RGC2 также связываются с добавленным извне 4SC622 (1 мкг/мл), на что указывает увеличение флуоресценции PE-AG184. RGC4 не светятся в дискриминационном окне для EGFP. Примечательно, что добавляемый извне IgG крысы не уменьшал процент клеток RGC4, которые были позитивными при окрашивании по 4SC622 на клеточной поверхности, предполагая, что связывание 4SC622 в hFcγRI произошло в то время, когда белки были в пути к поверхности клетки. При смешивании клеток RGC2 и RGC4 белок 4SC622, секретируемый из клеток RGC4, накапливался в среде и связывался больше всего с клетками RGC2. Однако добавление 1 мг/мл IgG крысы значительно уменьшало процент клеток RGC2, которые связывались с 4SC622, демонстрируя, что IgG крысы блокировал перенос секретируемого Fc hIgG1-меченного белка из экспрессирующих клеток в не экспрессирующие клетки.

Пример 2. Флуоресценция с клеточной поверхности коррелирует с уровнем экспрессии 4SC622.

Клетки RGC1 ( $4 \times 10^6$ ) трансфицировали pEE14.1-622, и пул стабильных трансфектантов был получен после отбора в течение 2 недель в среде, состоящей из 10% диализованной фетальной бычьей сыворотки, 90% модифицированной Дульбекко среды Игла (DMEM) без глутамина, 1×GS добавки и 25 мкМ MSX (все реагенты были от JRH Biosciences, Lenexa, KS). IgG крысы добавляли в культуральную среду до 1 мг/мл за 18 ч до иммуноокрашивания. Клетки обрабатывали трипсином, промывали PBS и окрашивали 1,5 мкг/мл FITC-конъюгированного F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента поликлонального антитела против IgG (H+L) человека (Jackson ImmunoResearch Laboratories) в течение 1 ч при комнатной температуре, следуя процедурам, описанным для окрашивания FITC-hFc в примере 1. Окрашивание клеток затем анализировали с помощью проточной цитометрии. Распределение флуоресценции предполагало, что выбранный пул содержит клетки с широким диапазоном уровней экспрессии 4SC622. Клетки первых 3% (группы R3), 7-11% (группы R5) и 15-19% (группы R7) с точки зрения их иммунофлуоресценции, разделяли на три пула и размножали в течение 9 дней. Среднюю продукцию 4SC622 в каждой клетке для пулов определяли путем измерения количества клеток и уровней 4SC622 в средах после выращивания в течение 3 дней с помощью иммуноанализа Pandex (Idexx; Westbrook, ME), следуя рекомендациям производителя. В анализе Pandex полистироловые частицы для анализа Fluoricon, покрытые козьим антителом против IgG человека, специфическим в отношении γ-цепи (Sigma), использовали для захвата 4SC622 из среды, и конъюгированное с FITC козье антитело против IgG человека, Fc-специфическое (Sigma), использовали для детектирования связанного с частицами 4SC622. Известные количества очищенного 4SC622 включали в анализ для калибровки. Клетки первых 3%, 7-11% и 15-19% пула, как было установлено, продуцируют 4SC622 на уровне, составляющем 1,42, 0,36 и 0,22 пг/клетку/день соответственно. Таким образом, существовала корреляция между окрашиванием 4SC622 клеточной поверхности и конкретной продукцией белка. Этот результат позволяет предположить, что отдельные клетки, которые экспрессируют 4SC622 на высоких уровнях, можно получить путем выделения клеток, которые были окрашены наиболее ярко FITC-конъюгированным F(ab')<sub>2</sub>-фрагментом поликлонального антитела против IgG (H+L) человека.

Пример 3. Выделение экспрессирующих клонов в RGC1: IL-4 Trap.

Для непосредственной демонстрации эффективности создания клональных клеточных линий с высоким уровнем продукции секретируемого белка с помощью методики авторов настоящего изобретения были созданы клональные, 4SC622-продуцирующие клеточные линии, исходя из RGC1. Клетки RGC1 ( $4 \times 10^6$ ) трансфицировали pEE14.1-622 и отбирали в течение двух недель с использованием 25 мкМ MSX для получения пула стабильных трансфектантов. MSX-резистентные клетки объединяли и инкубировали с 1 мг/мл IgG человека в течение 18 ч до окрашивания PE-AG184. Шесть клеток из первых 5% окна, как определено с помощью анализа с использованием проточной цитометрии окрашивания 4SC622 клеточной поверхности, были выделены и размножены. Продукцию 4SC622 из шести клональных линий определяли и сравнивали с продукцией 4SC622 из клонов, полученных с помощью отбора вручную, с последующим клонированием методом разведений и амплификацией отобранных колоний. Один происходящий от RGC1 клон, RGC4, продуцировал 4SC622 на уровне 12 пг/клетка/день. Этот уровень соответствует таковому наилучшего продуцента 4SC622, выделенного с помощью отбора вручную и анализа 2700

клонов. Таким образом, по сравнению с колониями ручного отбора, методология, описанная в этом изобретении, оказывается гораздо более эффективной при скрининге и клонировании сильных продуцентов.

VEGF Trap. Плазмиды pTE080 и pTE081 кодируют гены для VEGF Trap, hVEGF-R1R2 и hVEGF-R1R3. hVEGF-R1R2 представляет собой химерную молекулу, состоящую из первого Ig домена hVEGFRI, слитого со вторым Ig доменом hVEGFR2, который затем слит с hIg1FC-доменом. hVEGF-R1R3 представляет собой химерную молекулу, состоящую из первого Ig домена hVEGFRI, слитого со вторым Ig доменом hVEGFR3 который затем слит с hIgG1FC-доменом. В этих плазидах ген для VEGF Trap находится под контролем промотора CMV-MIE, и миниген глутаминсинтетазы, который придает устойчивость к MSX, экспрессируют для отбора событий стабильной интеграции. Клетки RGC1 трансфицировали одной из двух этих плазмид и выращивали в среде, содержащей 25 мкМ MSX, в течение 2 недель, чтобы отобрать клетки, в которых плазида была стабильно интегрирована. MSX-резистентные клетки инкубировали с 0,1 мкг/мл IgG2a и IgG3 мыши в течение 18 ч до окрашивания 1,5 мкг/мл FITC-конъюгированного F(ab')<sub>2</sub>-фрагмента поликлонального антитела против IgG (H+L) человека. Клетки окрашивали в течение 1 ч, затем дважды промывали PBS перед проточной цитометрией. Отдельные клетки были распределены по 96-луночным планшетах для культивирования тканей из пула клеток, флуоресценция которых была одной из самых высоких, в первом 1%. Клетки в отдельных лунках размножали и их продуктивность определяли с помощью анализов Pandex. Происходящие от RGC клоны, экспрессирующие как hVEGF-R1R2, так и hVEGF-R1R3, имели более высокую удельную продуктивность и были выделены путем скрининга меньшего количества клонов по сравнению с экспрессирующими на самом высоком уровне, отобранными вручную, MSX-устойчивыми колониями. См. табл. 1.

Таблица 1

Сравнение удельной продуктивности					
Белок	Транзиент (мкг/мл)	Стабильные линии клеток CHO K1, отобранные вручную		Стабильные линии клеток, происходящие от RGC1	
		Удельная продуктивность (пг/клетку/день)	# скринированных клонов	Удельная продуктивность (пг/клетку/день)	# скринированных клонов
4SC622	1, 1	12	2700	12	6
hVEGF-R1R2	33	68	190	77	62
hVEGF-R1R3	27	5	100	22, 6	42

Пример 4. Связанный с клеточной поверхностью Fc hIgG1-меченный белок интернализуется RGC1.

hFcγRI, как известно, индуцирует интернализацию связанного с клеточной поверхностью его лиганда. Для анализа того, могли ли клетки RGC1 интернализировать связанный с клеточной поверхностью 4SC622, 1 мкг/мл 4SC622 добавляли к клеткам RGC1 на 1 ч, а затем клетки сразу же обрабатывали для иммуноокрашивания 4SC622 с использованием PE-AG184 и анализа с помощью проточной цитометрии. Девяносто три процента клеток были положительными при окрашивании по 4SC622 клеточной поверхности. В качестве альтернативы 1 мкг/мл 4SC622 добавляли к клеткам RGC1 на 1 ч, затем клетки промывали и инкубировали в культуральной среде без 4SC622 с PE-AG184 в течение 18 ч. Анализ с помощью проточной цитометрии после иммуноокрашивания на 4SC622 показал, что 9% клеток сохраняли 4SC622 на клеточной поверхности. Для дополнительной характеристики потерь связанного с поверхностью 4SC622, очищенный белок 4SC622 добавляли в среды для RGC1 и родительских клеток CHO K1, затем уровни 4SC622 в средах измеряли в динамике по времени. Уровень 4SC622, добавленного до 2 мкг/мл в культуральную среду в 10-см чашке, был значительно ниже в RGC1-кондиционированной среде после инкубации в течение 3 дней по сравнению с контролем CHO K1. Эти результаты показывают, что концентрация 4SC622 в культуральной среде уменьшается в присутствии hFcγRI на клеточной поверхности. Полученные результаты свидетельствуют о том, что истощение 4SC622 из среды было результатом интернализации комплекса hFcγRI-4SC622. Эта интернализация комплексов рецептор-лиганд может облегчить эффективное удаление всех 4SC622 из не экспрессирующих клеток в присутствии блокирующего IgG в течение 18-часовой стадии блокирования.

Пример 5. Создание линий клеток CHO K1 с индуцируемой экспрессией hFcγRI.

Основанные на проточной цитометрии методы захвата аутологичной секреции (FASTR™), в кото-

рых используется hFcγRI, позволяют быстро выделить клоны с высоким уровнем экспрессии. Однако, если hFcγRI опосредует кругооборот Fc-меченных белков, то осуществляемая продукция секретируемого белка сконструированными, экспрессирующими hFcγRI клетками была бы выше, если экспрессию hFcγRI можно было бы подавить во время периода продукции. С этой целью была создана линия клеток CHO K1, в которой экспрессия hFcγRI индуцируется с помощью тетрациклина или аналога доксициклина. В этой системе клетки CHO K1, которые экспрессируют белок-тетрациклиновый репрессор (TetR), сначала были созданы, и hFcγRI был помещен под транскрипционный контроль промотора, активность которого регулировалась TetR. Два tandemных TetR-оператора (TetO) были размещены непосредственно после (3') промотора/усилителя CMV-MIE в pTE084 для создания pTE158. TetR блокировал транскрипцию hFcγRI с промотора CMV-MIE в pTE158 в отсутствие тетрациклина или какого-либо другого подходящего индуктора. В присутствии индуктора белок TetR был неспособен к связыванию TetO, и происходила транскрипция hFcγRI.

Клетки CHO K1 трансфицировали pcDNA6/TR, плазмидой, которая придает устойчивость к бластицидину, в которой экспрессия TetR происходит с промотора CMV-MIE (Invitrogen; Carlsbad, CA). После отбора в течение двух недель с использованием 2,5 мкг/мл бластицидина (Invitrogen) стабильные трансфектанты были объединены. Этот пул затем трансфицировали pTE158, плазмидой, которая придает устойчивость к G418, в которой экспрессия hFcγRI зависит от гибридного промотора CMV-MIE/TetO. Клетки, последовательно трансфицированные pcDNA6/TR и pTE158, отбирали с использованием 400 мкг/мл G418 и 2,5 мкг/мл бластицидина в течение 12 дней, затем объединяли. Пул индуцировали в течение двух дней путем добавления 1 мкг/мл доксициклина, затем окрашивали FITC-hFc для идентификации клеток, которые экспрессируют hFcγRI. Первые 5% клеток, экспрессирующих hFcγRI, собирали в пул, размножали в течение 6 дней в отсутствие доксициклина и снова окрашивали FITC-hFc на присутствие hFcγRI. Клетки, которые не были положительными при окрашивании по hFcγRI, собирали и размножали в культуральной среде, содержащей 1 мкг/мл доксициклина, в течение трех дней. Затем пул окрашивали на присутствие hFcγRI и выделяли с помощью проточной цитометрии. Клетки, которые экспрессировали hFcγRI на высоком уровне, (первый 1%) распределяли по 96-луночным планшетам в количестве одна клетка на лунку. Эти клетки предположительно содержали клетку, которая характеризовалась низкими уровнями не индуцированной экспрессии FcγRI и высокими уровнями индуцируемой экспрессии FcγRI. После размножения подтверждали индукцию hFcγRI доксициклином в 20 клонах с помощью иммуноокрашивания с использованием FITC-hFc и проточной цитометрии. Один клон был выбран для дальнейшего исследования и назван RGC10.

В отсутствие доксициклина RGC10 не экспрессировал hFcγRI на выявляемых уровнях, тогда как высокие уровни hFcγRI отмечались в клетках, которые были подвергнуты индукции с помощью 1 мкг/мл доксициклина в течение трех дней. Средняя флуоресценция клеток RGC10 увеличивалась более чем в 1000 раз после индукции доксициклином.

Пример 6. Выделение 4SC622-продуцирующих клеточных линий, исходя из RGC10.

Клетки RGC10 трансфицировали pEE14.1-622 и MSX-резистентные клетки объединяли после отбора с использованием 25 mM MSX в течение двух недель. Экспрессию hFcγRI индуцировали добавлением 1 мкг/мл доксициклина в культуральную среду на три дня. IgG крысы (1 мг/мл) добавляли в культуральную среду, содержащую доксициклин, за 18 ч до окрашивания FITC-конъюгированным F(ab')<sub>2</sub>-фрагментом поликлонального антитела против IgG (H+L) человека и анализа с помощью проточной цитометрии. Клетки, которые экспрессировали 4SC622 на самых высоких уровнях (первый 1%), распределяли по 96-луночным планшетам в количестве одна клетка на лунку. Без индукции экспрессии hFcγRI доксициклином, с помощью окрашивания FITC-конъюгированным F(ab')<sub>2</sub>-фрагментом поликлонального антитела против IgG (H+L) человека не удается детектировать связанный с клеточной поверхностью 4SC622. Шестьдесят клонов были размножены в отсутствие доксициклина. Удельную продуктивность 13 самых лучших продуцентов определяли с помощью анализа Pandex. Удельная продуктивность клона 1C2 составляла 17,8 пг/клетку/день, что значительно выше составляющей 12 пг/клетку/день продуктивности, отмечаемой в случае лучшей линии клеток 4SC622, ранее выделенной, используя линию клеток с регулируемым hFcγRI-RGC1.

Пример 7. Могут быть созданы клетки миеломы SP2/0, которые экспрессируют захватывающий белок клеточной поверхности.

В этом примере была создана линия миеломных клеток Sp2/0-Ag14, которая стабильно экспрессирует hFcγRI, для демонстрации того, что способ захвата аутологичной секреции применим к клеточным линиям, отличным от CHO. Ген hFcγRI вводили в клетки миеломы с помощью инфицирования ретровирусами. Плазмиду pLXRN (Clontech; Palo Alto, CA), ретровирусный ДНК-вектор, в котором представляющий интерес ген может быть экспрессирован с расположенного 5' промотора длинного конечного повтора вируса саркомы у мыши Молони (LTR MoMuSV), использовали для создания ретровируса, кодирующего ген hFcγRI. XhoI-фрагмент размером 1363 п.о. из pTE084, кодирующий ген hFcγRI человека, клонировали в сайт для XhoI pLXRN. Плазида, в которой экспрессия кДНК для hFcγRI зависит от LTR

MoMuSV, была выбрана и названа рТЕ255.

Политропный ретровирус для экспрессии hFcγRI был создан, по существу, следуя предписаниям производителя. Линию пакующих клеток GP-293, линию клеток на основе НЕК 293, которая стабильно экспрессирует вирусные белки gag и pol (Clontech; Palo Alto, CA), котрансфицировали 10 мг каждой из рVSV-G и рТЕ255. Плазмида рVSV-G позволяет экспрессировать вирусный белок оболочки VSV-G, который закрепляет за инфекционными частицами широкий ряд хозяев.

Конструирование Sp2-hFcγRI-4. Политропный ретровирус для экспрессии hFcγRI использовали для инфицирования  $1 \times 10^7$  миеломных клеток Sp2/0-Ag14 (American Type Culture Collection; Manassas, VA) с множественностью, составляющей приблизительно 10 инфекционных частиц на клетку. Через три дня после инфицирования клетки окрашивали в течение 1 ч, затем дважды промывали PBS перед анализом с помощью проточной цитометрии. Эти клетки, экспрессирующие hFcγRI, на что указывал связанный FITC-hFc, собирали в пул с помощью проточной цитометрии. Пул размножали в течение 13 дней, после чего снова окрашивали FITC-hFc, и клетки, экспрессирующие hFcγRI, собирали в пул с помощью проточной цитометрии. Эти отсортированные клетки культивировали в 10% фетальной бычьей сыворотке+90% модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM) с 4,5 г/л глюкозы и 4 мМ глутамин в течение 3 недель, окрашивали FITC-hFc и клетки со средним уровнем флуоресценции в первом 1% популяции клонировали методом разбивки до одной клетки. После размножения 24 клон исследовали с помощью проточной цитометрии в отношении экспрессии hFcγRI, как описано выше, и один клон, SP2-hFcγRI-4, был выбран для определения дополнительных характеристик.

Выделение клеток Sp2-hFcγRI, экспрессирующих белок 4SC622.

Клетки SP2-hFcγRI-4 ( $1 \times 10^7$ ) трансфицировали рТЕ209, плазмидой, которая позволяет конститутивно экспрессировать 4SC622 с промотора CMV-MIE и придает устойчивость к гигромицину. Трансфицированные клетки помещали в среду, содержащую 10% FCS, 90% D-MEM и 400 мкг/мл гигромицина, на 14 дней. Устойчивые к гигромицину клетки инкубировали с 1 мг/мл IgG кролика в течение 18 ч до окрашивания FITC-конъюгированным F(ab')<sub>2</sub>-фрагментом поликлонального антитела против IgG (H+L) человека. Клетки окрашивали в течение 1 ч, затем дважды промывали PBS перед анализом с помощью проточной цитометрии. Меченые клетки собирали в пул с помощью проточной цитометрии, затем культивировали в течение 5 дней и сортировали, как описано выше. Клетки из размноженного пула, которые связывались больше всего с FITC-конъюгированным F(ab')<sub>2</sub>-фрагментом поликлонального антитела против IgG (H+L) человека, первый 1% популяции, затем клонировали методом разбивки до одной клетки. Продукцию 4SC622 из десяти клонов анализировали с помощью ELISA, и было установлено, что все 10 клонов экспрессируют 4SC622; клон 5H11 продуцировал 4SC622 на уровне 0,5 пг на клетку в день. Эти данные показали, что клоны, секретирующие 4SC622, были эффективно выделены с помощью метода захвата аутологичной секреции из гетерогенного пула клеток, полученного в результате стабильной трансфекции клеток Sp2-hFcγRI-4 рТЕ209.

Для подтверждения того, что 4SC622 был аутологично представлен на поверхности миеломных клеток, экспрессирующих как 4SC622, так и hFcγRI, клон 5H11 инкубировали с 1 мг/мл IgG кролика в течение 18 ч, затем окрашивали FITC-конъюгированным F(ab')<sub>2</sub>-фрагментом антитела против IgG (H+L) человека и, как было установлено, представляет 4SC622 на клеточной поверхности. Секретируемый белок представлялся в условиях, когда перекрестная подача была заблокирована с помощью IgG кролика, что свидетельствует об аутологичном представлении 4SC622. Эти данные свидетельствовали о том, что способ захвата аутологичной секреции, описанный выше, не ограничивался клетками СНО, а также может быть распространен на миеломные и другие типы клеток.

Пример 8. Включающий белок G химерный белок может функционировать в качестве захватывающего белка клеточной поверхности.

Чтобы продемонстрировать применимость способа захвата аутологичной секреции к захватывающему белку клеточной поверхности, отличному от hFcγRI, была создана линия клеток, экспрессирующая белок G. Белок G, из Streptococcus штамма G148, связывается со всеми подклассами IgG человека и мыши и как таковой применим для выделения рекомбинантных клеток, экспрессирующих антитела или слитые с Fc IgG белки. Чтобы продемонстрировать, что Fc IgG-связывающий домен белка G может использоваться в качестве захватывающего белка клеточной поверхности, способного связываться со всеми подклассами IgG мыши и человека, авторы настоящего изобретения создали линию клеток СНО, экспрессирующую химерный белок, состоящий из Fc-связывающего домена белка G, слитого с трансмембранным и внутриклеточным доменом hFcγRI. Fc-связывающий домен белка G содержит три гомологичных повтора длиной 55 аминокислот (Guss et al., (1986) EMBO 5: 1567 и Sjobring et al. (1991) J. Biol. Chem. 266: 399), и каждый повтор способен связывать один Fc IgG. Для увеличения экспрессии этого химерного белка в клетках СНО, авторы настоящего изобретения сконструировали синтетическую ДНК, в которой сигнальная последовательность из гена ROR1 мыши была слита с Fc-связывающим доменом, аминокислотами 303-497 белка G (# доступа X06173) (SEQ ID NO: 1). Эта синтетическая ДНК была получена путем сочетания отжига олигонуклеотидов, заполнения пробелов и ПЦР-амплификации. Синтетическую ДНК затем сливали, с помощью ПЦР, с ДНК, кодирующей трансмембранный и внутриклеточ-

ный домены, аминокислотами 279-374 (SEQ ID NO: 2), hFcγRI (№ доступа -M21091). Полученную ДНК, кодирующую химерный белок белок G/hFcγRI, клонировали в рTE158 ниже (3') промотора CMV-MIE, заменяя ген, кодирующий hFcγRI, с получением плазмиды рTE300.

Линию клеток CHO K1, адаптированную к росту в бессывороточной среде, RGC14, трансфицировали рTE300, и через три дня добавляли 400 мкг/мл G418 в культуральную среду для отбора стабильной интеграции рTE300. Через две недели после начала отбора клетки окрашивали FITC-hFc для идентификации клеток, экспрессирующих hFcγRI. Эти клетки анализировали с помощью проточной цитометрии, и клетки, экспрессирующие hFcγRI, собирали в пул. Клетки размножали в течение 10 дней, и популяцию клеток, экспрессирующих hFcγRI, снова выделяли с помощью проточной цитометрии. Клетки снова размножали, окрашивали FITC-hFc, и отдельные клетки, экспрессирующие химерный белок белок G/hFcγRI на высоком уровне, выделяли с помощью проточной цитометрии. Отдельные клетки, которые были позитивными при окрашивании по связыванию с FITC-hFc, были отобраны в среде, состоящей из 10% фетальной бычьей сыворотки, 90% F12 Хэма и 400 мкг/мл G418. После инкубации в течение двух недель 48 клонов исследовали на связывание с бычьим IgG, присутствующим в культуральной среде, посредством окрашивания FITC-конъюгированным F(ab')<sub>2</sub>-фрагментом антитела против бычьего IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Один клон, RGC18, который был позитивным при окрашивании этим антителом, был выбран для дальнейшей характеристики.

Выделение экспрессирующих клонов в RGC18.

Клетки RGC18 ( $6 \times 10^6$ ) трансфицировали рTE209 и отбирали в отношении интеграции плазмиды с помощью выращивания в 400 мкг/мл гигромицина в течение 18 дней. Устойчивые к гигромицину клетки инкубировали с 1 мг/мл IgG кролика в течение 18 ч до окрашивания FITC-конъюгированным F(ab')<sub>2</sub>-фрагментом поликлонального антитела против IgG (H+L) человека. Клетки окрашивали в течение 1 ч, затем дважды промывали PBS перед анализом с помощью проточной цитометрии. Самые флуоресцирующие клетки (первые 5%) были выделены методом разбивки до одной клетки и размножены в течение 3 недель. Десять клонов исследовали на секрецию 4SC622. Все исследованные клоны секретируют 4SC622 на высоком уровне, и самый лучший клон, RGC19, имел удельную продуктивность, составляющую 6,4 пг/клетку день. Этот результат показал, что 4SC622-экспрессирующие клетки эффективно выделены из гетерогенного пула клеток, полученного в результате стабильной трансфекции RGC18 рTE209, с помощью способа захвата аутологичной секреции. Кроме того, эти данные ясно показали, что может быть сконструирован фрагмент белка G, который включает сигнальную последовательность и трансмембранный домен и функционирует в качестве захватывающего белка клеточной поверхности.

Для подтверждения того, что 4SC622 был аутологично представлен на поверхности клеток RGC19, экспрессирующих как химерный белок белок G/hFcγRI, так и 4SC622, RGC19 инкубировали с 1 мг/мл IgG кролика в течение 18 ч, затем окрашивали FITC-конъюгированным F(ab')<sub>2</sub>-фрагментом антитела против IgG (H+L) человека и анализировали с помощью проточной цитометрии. Клетки RGC19, как было установлено, имеют 4SC622 на клеточной поверхности в этих условиях, когда перекрестная подача была заблокирована с помощью IgG кролика, что свидетельствует об аутологичном представлении 4SC622. IgG кролика эффективно блокировал связывание экзогенного белка 4SC622 с клетками RGC18, но не блокировал представление 4SC622 на клеточной поверхности клеток, экспрессирующих 4SC622. Эти данные показали, что свойства химерного белка белок G/hFcγRI были схожими с таковыми hFcγRI в качестве захватывающего белка клеточной поверхности, и свидетельствовали о том, что в способе захвата аутологичной секреции могут использоваться другие белки в качестве захватывающих белков клеточной поверхности.

Пример 9. Выделение продуцирующих антитела клеток из RGC10.

Чтобы продемонстрировать эффективность способа захвата аутологичной секреции для выделения линий клеток CHO, которые экспрессируют рекомбинантные антитела, авторы настоящего изобретения клонировали ДНК, кодирующую гены переменных областей легкой и тяжелой цепей, из гибридомы KD5. KD5 является гибридомой, которая экспрессирует моноклональное антитело, специфическое для Tie2-рецептора человека.

В последовательности генов константных областей IgG мыши были клонированы, исходя из 500 нг полиА<sup>+</sup> РНК селезенки мыши (Clontech, Palo Alto, CA). Одноцепочечную кДНК синтезировали, используя систему Superscript First-Strand Synthesis System для ОТ-ПЦР, с использованием в качестве затравок случайных гексамеров в количестве 50 нг (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Последовательность ДНК для константной области легкой цепи каппа мыши (# доступа Z37499) амплифицировали, исходя из этой кДНК, с помощью ПЦР, используя праймеры 5' mCLK1

(Z37499) (5'-CGGGCTGATG CTGCACCAAC TGTATCCATC TTC-3') (SEQ ID NO: 3) и 3' mCLK1 (Z37499) (5'-ACACTCTCCC CTGTTGAAGC TCTTGACAAT GGG-3') (SEQ ID NO: 4). Последовательность ДНК для константной области IgG2a мыши (# доступа AJ294738) также амплифицировали, исходя из этой кДНК, с помощью ПЦР, используя праймеры 5' mCH2a

(AJ294738) (5'-GCCAAAACAA CAGCCCCATC GGTCTATCCA C-3') (SEQ ID NO: 5) и 3' mCH2a (AJ294738) (5'-TCATTTACCC GGAGTCCGGG AGAAGCTCTT AGTCG-3') (SEQ ID NO: 6). Продукты

ПЦР клонировали в pCR2.1-ТОПО, используя набор для клонирования ТОПО TA Cloning Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), и подтверждали последовательность константных областей.

Гены варибельных областей KD5 амплифицировали с помощью ОТ-ПЦР, исходя из мРНК гибридомы KD5, и клонировали в pCR2.1-ТОПО, используя смеси праймеров для варибельных областей тяжелой и легкой цепей от Amersham-Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ). Ген варибельной области тяжелой цепи подвергали ПЦР-амплификации, используя клонированную в pCR2.1-ТОПО варибельную область в качестве матрицы, с использованием праймеров 5' BspMI/KD5VH N-конец (5'-GAGAGTACCT GCGTCATGCA GATGTGAAAC TGCAGGAGTC TGGCCCT-3') (SEQ ID NO: 7) и 3' BspMI/KD5VH C-конец (5'-GAGAGACCTG CGTCAGCTGA GGAGACGGTG ACCGTGGT-3') (SEQ ID NO: 8), расщепляли BspMI и лигировали с расщепленным BsaI фрагментом гена константной области тяжелой цепи IgG2a, амплифицированным с помощью ПЦР с использованием праймеров 5' BsaI/CH2a N-конец (5'-GAGAGGGTCT CACAGCCAAA ACAACAGCCC CATCG-3') (SEQ ID NO: 9) и 3' BsaI/CH2a C-конец (5'-GAGAGGGTCT CCGGCCGCTC ATTTACCCGG AGTCCGGG AGAA-3') (SEQ ID NO: 10). Затем этот фрагмент лигировали в сайты для BspMI и NotI pRG882. Полученная в результате плаزمиды, pTE317, была способна экспрессировать рекомбинантный ген тяжелой цепи KD5, слитый с сигнальной последовательностью mROR1, с промотора CMV-MIE. Ген варибельной области легкой цепи амплифицировали с помощью ПЦР, используя клонированную в pCR2.1-ТОПО варибельную область в качестве матрицы, с использованием праймеров 5' BsmBI/KD5VL N-конец (5'-GAGAGCGTCT CATGCAGACA TCCAGATGAC CCAGTCTCCA-3') (SEQ ID NO: 11) и 3' BsmBI/KD5VL C-конец (5'-GAGAGCGTCT CACAGCCCGT TTTATTTCCA GCTTGGTCCC-3') (SEQ ID NO: 12) расщепляли BsmBI и лигировали с расщепленным BsaI фрагментом гена константной области легкой цепи каппа, амплифицированным с помощью ПЦР с использованием праймеров 5' BsaI/CLK N-конец (5'-GAGAGGGTCT CAGCTGATGC TGCACCAACT GTATCC-3') (SEQ ID NO: 13) и 3' BsaI/CLK C-конец (5'-GAGAGGGTCT CAGGCCGCTC AACACTCTCC CCTGTTGAAG CTCTTGAC-3') (SEQ ID NO: 14). Затем этот фрагмент лигировали в сайты для BspMI и NotI pRG882. Полученная в результате плазмиды pTE316 была способна экспрессировать рекомбинантный ген легкой цепи KD5, слитый с сигнальной последовательностью mROR1, с промотора CMV-MIE.

EcoRI-NotI-фрагмент размером 1450 п.о. из pTE317, кодирующий ген тяжелой цепи KD5, клонировали в сайты для EcoRI и NotI pRG980, вектора, который придает устойчивость к гиромоцину и позволяет экспрессировать рекомбинантные гены с промотора UbC, с получением плазмиды pTE322. Аналогично EcoRI-NotI-фрагмент размером 750 п.н. из pTE316, кодирующий ген легкой цепи KD5, клонировали в сайты для EcoRI и NotI pRG985, вектора, который придает устойчивость к пуромицину и позволяет экспрессировать рекомбинантные гены с промотора UbC, с получением плазмиды pTE324. Клетки RGC10 ( $5 \times 10^6$ ) трансфицировали 3 мкг pTE322 и 3 мкг pTE322 и подвергали отбору в отношении интеграции плазмид посредством выращивания в среде F12, дополненной 10% фетальной телячьей сыворотки с 20 мкг пуромицина и 400 мкг/мл гиромоцина в течение 14 дней. Экспрессию hFcγRI индуцировали добавлением 1 мкг/мл доксицилина в культуральную среду на три дня. Дважды резистентные клетки инкубировали с 1 мг/мл IgG кролика в течение 18 ч до окрашивания FITC-конъюгированным F(ab')<sub>2</sub>-фрагментом козьего поликлонального антитела против IgG (Fcγ) мыши (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA). Клетки окрашивали в течение 1 ч, затем дважды промывали PBS перед анализом с помощью проточной цитометрии. Самые флуоресцирующие клетки (первые 5%) выделяли в виде пула и размножали в течение 10 дней, после чего протокол повторяли, но первый 1% самых флуоресцирующих клеток выделяли в виде пула. Этот пул размножали в течение 10 дней, после чего первые 0,1% самых флуоресцирующих клеток выделяли в виде отдельных клеток в 96-луночных планшетах. Клоны анализировали с помощью ELISA в отношении экспрессии антитела, и семь клонов были выбраны из 53 проанализированных клонов. Средняя удельная продуктивность этих клонов составляла 35 пг/клетку/день, и лучший клон экспрессировал рекомбинантное моноклональное антитело KD5 на уровне 54 пг/клетку/день.

Пример 10. Скрининги FASTR™, на которые не влияет уровень экспрессии CSCP.

Для демонстрации того, что уровень экспрессии CSCP не влияет существенно на возможность выделения клеток, экспрессирующих связанный sPOI, сравнивали скрининги FASTR™ в отношении одного и того же sPOI в двух различных линиях клеток-хозяев, каждая из которых экспрессирует один и тот же CSCP, но или на высоком уровне, или на низком уровне.

Линия клеток-хозяев для FASTR™ RGC10 была выбрана для экспрессии белка hFcγRI на высоком уровне в результате стабильной интеграции pTE158 и, как было уставлено, содержит 40 интегрированных копий гена hFcγRI. Новую линию клеток, RS527, которая экспрессировала белок hFcγRI на более низком уровне, получали из CHO K1 после стабильной трансфекции и отбора в отношении интеграции одной копии гена. Клетки RS527 экспрессировали заметно меньше белка hFcγRI, чем клетки RGC10, как определено с помощью анализа с использованием Вестерн-блоттинга лизатов целых клеток линий клеток для FASTR™.

Вкратце, клетки RGC10 и RS527 трансфицировали pTE462, плазмидой, способной экспрессировать

секретируемый слитый с hFc белок Rc1-hFc и придающей устойчивость к гигромицину. Трансфицированные культуры отбирали с помощью гигромицина в течение двух недель. Устойчивые к гигромицину клетки индуцировали с помощью 1 мкг/мл доксициклина (Dox) и блокировали с помощью IgG кролика в течение ночи, в соответствии со способом FASTR™, описанным здесь. На следующий день культуры RGC10/pTE462 и RS527/pTE462 окрашивали с использованием FITC-конъюгированного антитела, специфического в отношении hFc, а затем анализировали с помощью проточной цитометрии. Три ячейки R4, R5 и R6 с клетками, характеризующимися низким, средним и высоким уровнем флуоресценции соответственно были выбраны из каждой линии хозяина и размножены в культуре ткани.

Для сравнения уровня продукции белка Rc1-hFc из шести ячеек с клетками, шесть культур были иницированы, используя равное количество клеток в случае каждой ячейки. Спустя три дня собирали кондиционированные среды. Титры белков Rc1-hFc в кондиционированных средах определяли с помощью ELISA и наносили на график в зависимости от средней флуоресценции в соответствующих ячейках с клетками. В случае обеих линий клеток RGC10 и RS527 отмечалась схожая корреляция между средней флуоресценцией (количеством Rc1-hFc, представленным на клеточной поверхности) и уровнями продукции белка sPOI выделенных пулов клеток. Самое главное, что титры sPOI в двух ячейках R6 с высоким уровнем флуоресценции, происходящих от RGC10 и RS527, были схожими. Эти данные показывают, что уровень экспрессии CSCP в линии клеток-хозяев для FASTR™ не влияет существенно на использование этого хозяина для выделения трансфицированных клеток на основе уровня экспрессии в sPOI.

Пример 11. Рецептор Tie2 в качестве захватывающего белка клеточной поверхности.

Захватывающие белки клеточной поверхности (CSCP), отличные от FcγRI, могут использоваться в описываемых здесь способах. В этом примере рецептор Tie2 функционирует в качестве CSCP и используется для выделения клеток, экспрессирующих Tie-специфический слитый белок ScFv<sub>C1b</sub>-Fc, полученный из моноклонального антитела C1b, которое специфически связывается с экстраклеточным доменом рецептора Tie2. Хотя CSCP в случае ScFv<sub>C1b</sub>-Fc может быть hFcγRI, этот пример показывает, что Tie2 может также использоваться в качестве CSCP в случае ScFv<sub>C1b</sub>-Fc.

Для создания линии клеток с индуцируемой экспрессией Tie2 в качестве CSCP, CHO K1 сначала стабильно трансфицировали содержащей TetR плазмидой pcDNA6/TR. Пул устойчивых к бластицидину клеток затем стабильно трансфицировали pTE259, плазмидой, которая делает возможной индуцируемую экспрессию белка, состоящего из экстраклеточного домена и трансмембранного домена Tie2. Индуцируемые клеточные клоны выделяли с помощью проточной цитометрии после окрашивания антителом, специфическим в отношении Tie2. Клон RGC54 был выбран для изучения годности FASTR™ для экспрессии ScFv<sub>C1b</sub>-Fc.

Клетки RGC54 стабильно трансфицировали pTE988, плазмидой, способной экспрессировать секретруемый слитый с hFc белок ScFv<sub>C1b</sub>-Fc и придающей устойчивость к гигромицину.

Трансфицированную культуру отбирали с помощью гигромицина в течение двух недель. Устойчивые к гигромицину клетки индуцировали с помощью Dox и блокировали с использованием 1 мг/мл очищенного mAb C1b. Моноклональное антитело C1b было источником переменных областей в ScFv<sub>C1b</sub>-Fc. На следующий день пул клеток окрашивали FITC-конъюгированным антителом, специфическим для hFc, а затем анализировали с помощью проточной цитометрии. Три ячейки R6, R7 и R8 с клетками, характеризующимися низким, средним и высоким уровнем флуоресценции соответственно, были выделены из каждой линии хозяина и размножены в культуре ткани. Три культуры были иницированы, используя равное количество клеток в случае каждой ячейки для определения продукции белка ScFv<sub>C1b</sub>-Fc, как определено с помощью ELISA. Существовала корреляция между средней флуоресценцией (количеством ScFv<sub>C1b</sub>-Fc, связывающегося с Tie2 на клеточной поверхности) и уровнями продукции белка ScFv<sub>C1b</sub>-Fc в выделенных пулах клеток.

Эти данные показывают, что CSCP, отличные от hFcγRI, может служить в качестве CSCP, а также предполагают, что любой рецептор может быть преобразован в CSCP посредством удаления его цитоплазматического домена. Эти данные также показывают, что антиген может быть превращен в CSCP и использоваться для скрининга FASTR™ клеток, экспрессирующих антигенспецифическую, относящуюся к антителу молекулу.

Пример 12. Эффективные скрининги FASTR™ с использованием пар CSCP: sPOI с низким сродством.

Ангиопоэтин-1 представляет собой лиганд для рецептора Tie2. Химерный белок, содержащий рецептор-связывающий домен ангиопоэтина-1 и hFc (FD1-hFc), связывается с Tie2 с константой связывания по сродству, составляющей 174 нМ, как определено с помощью BIAcore™. FD1-hFc и Tie2 были выбраны в качестве sPOI и CSCP соответственно для определения того, требуется ли минимальное сродство между CSCP и sPOI для скринингов FASTR™.

В экспериментах по "декорированию" клеток добавляемый извне FD1-hFc специфически связывался с клетками RGC54 через Tie2. Для определения того, является ли сродство между Tie2 и FD1-hFc достаточным для допуска скрининга FASTR™, клетки RGC54 стабильно трансфицировали pTE942, плазмидой, способной экспрессировать секретруемый слитый с hFc белок FD1-hFc и придающей устойчивость к гигромицину. Трансфицированные культуры отбирали с помощью гигромицина в течение

двух недель. Устойчивые к гигромицину клетки индуцировали с помощью Dox и блокировали с использованием 1 мг/мл очищенного FD1-mFc, включающего Fc IgG1 мыши. На следующий день пул клеток окрашивали FITC-конъюгированным антителом, специфическим для hFc, а затем анализировали с помощью проточной цитометрии. Три ячейки R6, R7 и R8 с клетками, характеризующимися высоким, средним и низким уровнем флуоресценции соответственно, были выделены. Культуры были иницированы, используя равное количество клеток в случае каждой ячейки для определения уровней продукции белка FD1-hFc в кондиционированной среде, как определено с помощью ELISA. Существовала корреляция между средней флуоресценцией (связыванием FD1-Fc со связанным с клеточной поверхностью Tie2) и уровнями продукции белка FD1-hFc в выделенных пулах клеток. В ячейке с самым высоким уровнем флуоресценции продуцировалось больше всего FD1-hFc.

Эти данные показывают, что пара CSCP:sPOI с низким сродством ( $KD=174$  нМ) может использоваться для эффективных скринингов FASTR™. Важно отметить, что  $t_{1/2}$  диссоциации для связывания FD1-Fc:Tie2 составляет менее 2 мин, предполагая, что любая пара CSCP:sPOI с измеримым сродством может работать при скринингах FASTR™. Кроме того, этот эксперимент также показывает, что не являющийся FcγRI рецептор может использоваться в качестве CSCP для выделения клеток, экспрессирующих лиганд для него.

Пример 12. Слияние трансмембранного домена с ScFv создает функциональный CSCP.

CSCP может быть любым связанным с поверхностью клетки белком, который обладает определяемым сродством к sPOI. Чтобы продемонстрировать это, полностью синтетический CSCP был сконструирован посредством слияния трансмембранного домена рецептора PDGF с ScFv, содержащим переменные области из мышиного, специфического в отношении каппа-цепи моноклонального антитела HB58. Хозяин для FASTR™, который экспрессирует этот химерный белок (ScFv<sub>HB58</sub>-TM<sub>PDGFR</sub>), был создан и использован для выделения клеток, экспрессирующих специфическое в отношении FD-домена антиоптина-2 антитело P12.

Линия клеток RS655, происходящая от CHO K1, конструктивно экспрессирует ScFv<sub>HB58</sub>-TM<sub>PDGFR</sub>. Клетки, экспрессирующие ScFv<sub>HB58</sub>-TM<sub>PDGFR</sub>, могут быть окрашены путем последовательной инкубации с mAb P12, FD2-hFc, и FITC-конъюгированное антитело против hFc -P12, захваченное на клеточной поверхности с помощью ScFv HB58, детектировали по его сродству к FD2, которое, в свою очередь, определяли с помощью распознавания hFc-метки. Клетки RS656 были получены из клеток RS655 после стабильной трансфекции плазмидой, кодирующей ген eYFP. Почти 100% клеток RS656 были eYFP-положительными, и у большинства (76%) сохранялась экспрессия ScFv<sub>HB58</sub>-TM<sub>PDGFR</sub>, как определено по связыванию с FD2-hFc.

Клетки RS655 стабильно трансфицировали pTE693, плазмидой, способной экспрессировать тяжелые и легкие цепи антитела P12 и придающей устойчивость к пурамицину. Трансфицированную культуру отбирали с использованием пурамицина в течение двух недель с получением пула клеток, которые были неоднородными в отношении экспрессии mAb P12 (RS655/pTE693).

Для определения того, может ли ScFv<sub>HB58</sub>-TM<sub>PDGFR</sub> функционировать в качестве CSCP и способствовать отделению клеток, продуцирующих антитела, от непродуцентов, равные количества клеток RS656 и клеток RS655/pTE693 были смешаны и подвергнуты сокультивированию. Когда P12, экспрессируемое в клетках RS655/pTE693, предоставляли возможность диффундировать и связываться с ScFv<sub>HB58</sub> на поверхности клеток RS656, большая популяция желтых клеток была также положительной по связыванию FD2-hFc. Однако, если ScFv<sub>HB58</sub> на поверхности RS656 был связан с избыточным количеством IgG мыши, то только не являющиеся желтыми клетки были положительными по связыванию FD2-hFc демонстрируя, что экспрессирующие клетки эффективно отделяются от не экспрессирующих клеток.

Эти данные показывают, что ScFv может быть превращен в функциональной CSCP посредством ориентации его на клеточную мембрану. Эти данные также показывают, что FASTR™ позволяет детектировать клетки, экспрессирующие секретируемое антитело, с помощью антигена, соответствующего антителу.

Пример 13. Представляющий интерес белок, включающий переменную область T-клеточного рецептора.

Основанный на проточной цитометрии способ захвата аутологичной секреции (FASTR™) для выделения экспрессирующих на высоком уровне клонов линии клеток, экспрессирующей представляющий интерес белок, которым является TCR-Fc, подготавливают аналогично приготовлению линии клеток, экспрессирующих представляющее интерес антитело. Клоны с высоким уровнем экспрессии идентифицируют посредством скрининга клеток, которые представляют на своей поверхности представляющий интерес TCR-Fc, связанный с hFcγR.

В этих примерах используют линию клеток CHO K1 RGC10, содержащих индуцируемый hFcγR1 в качестве захватывающей молекулы клеточной поверхности. Создают линию RGC10, которая экспрессирует рекомбинантные TCR-Fc, путем клонирования переменных областей TCR в рамке с Fc-областью человека, или непосредственно в рамке или с использованием линкерной последовательности между переменными областями TCR и Fc-областью человека.

Для создания представляющего интерес белка, который представляет собой димер, включающий связанный с Fc варибельный домен  $\alpha$  TCR и связанный с Fc варибельный домен  $\beta$  TCR, RGC10 трансфицируют двумя векторами: первым вектором, способным экспрессировать слияние варибельного домена  $\alpha$  TCR с последовательностью Fc человека, и вторым вектором, способным экспрессировать слияние домена  $\beta$  TCR с той же последовательностью Fc человека. Каждый вектор включает лидерную последовательность (например, сигнальную последовательность секретиции) 5' по отношению к варибельной области TCR и селектируемый маркер, который представляет собой ген резистентности к лекарственному средству. После трансфекции каждым вектором клетки, содержащие вектор, отбирают путем отбора с использованием соответствующего лекарственного средства. Отбор приводит к линии клеток RGC10, содержащей как первый, и второй векторы. Клетки, экспрессирующие представляющие интерес белки, можно детектировать с помощью одного или более из антитела против варибельного домена  $\beta$ , антитела против варибельного домена  $\alpha$  и антитела против Fc-домена.

Для создания представляющего интерес белка, который представляет собой димер, включающий варибельный домен как  $\alpha$ , так и  $\beta$  TCR, слитый с Fc, RGC10 трансфицируют одним вектором, кодирующим представляющий интерес белок, который конструируют следующим образом: лидерная последовательность (например, сигнальная последовательность секретиции), за которой следует варибельный домен  $\beta$  TCR, слитый с линкером, который, в свою очередь, слит с варибельным доменом  $\alpha$  TCR, который, в свою очередь, слит с последовательностью Fc. В качестве альтернативы один вектор может быть сконструирован следующим образом: лидерная последовательность (например, сигнальная последовательность секретиции), за которой следует варибельный домен  $\alpha$  TCR, слитый с линкером, который, в свою очередь, слит с варибельным доменом  $\beta$  TCR, который, в свою очередь, слит с последовательностью Fc. Клетки, экспрессирующие представляющие интерес белки, можно детектировать с помощью одного или более из антитела против варибельного домена  $\beta$ , антитела против варибельного домена  $\alpha$  и антитела против Fc-домена.

Для создания представляющего интерес белка, описанного выше, который также включает константный домен  $\alpha$  TCR и/или  $\beta$  TCR, варибельный домен TCR ( $\alpha$  или  $\beta$ ) сливают с константным доменом TCR (например, варибельный домен  $\alpha$  TCR сливают с константным доменом  $\alpha$  TCR, а варибельный домен  $\beta$  TCR сливают с константным доменом  $\beta$  TCR), и варибельный+константный домен TCR сливают непосредственно или через линкер с Fc-доменом.

Клетки, экспрессирующие представляющие интерес белки, можно детектировать с помощью одного или более из антитела против варибельного домена  $\beta$ , антитела против варибельного домена  $\alpha$  и антитела против Fc-домена.

Клетки, экспрессирующие желаемые количества TCR-Fc, выделяют, используя методику, которая использовалась при выделении описанных здесь 4SC622-продуцирующих клеточных линий, с использованием одного или более из антитела против варибельного домена  $\alpha$ , антитела против варибельного домена  $\beta$ , антитела против константного домена  $\alpha$ , антитела против константного домена  $\beta$  и антитела против Fc-домена. Клетки, экспрессирующие TCR-Fc на самых высоких уровнях, выбирают в качестве TCR-Fc-продуцирующих клеточных линий.

Пример 14. CSCP на основе ScFv для выделения нескольких изоформ IgG и биспецифических антител.

Генетически модифицированных мышей, у которых VDJ-сегмент, кодирующий фрагмент тяжелой цепи иммуноглобулина, и VJ-сегмент, кодирующий фрагмент легкой цепи каппа иммуноглобулина, их геномов были заменены ортологами у человека (т.е. мышей Velocimmune®, см. патент США № 7105348, который включен сюда посредством ссылки в его полном объеме) иммунизировали либо Fc-фрагментом белка IgG4 человека (hFc, или просто Fc; SEQ ID NO: 26), либо полипептидом  $\Delta$ AdpFc человека, содержащим дипептидную мутацию (H95R, Y96F в соответствии с IMGT; также известным как Fc\*; SEQ ID NO: 42). Моноклональные антитела были получены от мышей и подвергнуты скринингу в отношении их способности к связыванию с Fc, Fc\* или антителами, включающими Fc и/или Fc\*. Три антитела, способные связываться с Fc (Ab1, Ab2, Ab3), и три, которые были способны связываться с Fc\* (Ab4, Ab5, Ab6), были проверены на их способность связывать молекулы, имеющие один из следующих форматов: Fc/Fc, Fc/Fc\* (который может быть биспецифическим антителом) и Fc/Fc\*.

Измерения для определения сродства связывания и кинетических констант были сделаны на инструменте Biacore 2000. Антитела (каждое из Ab1-Ab8) были захвачены на поверхность сенсора с антителом против Fc мыши (формат захвата m Ab), и гомодимеры Fc человека (SEQ ID NO: 26), гомодимеры Fc\* человека (SEQ ID NO: 42) или гетеродимеры Fc/Fc\* пропускали по поверхности. Кинетические константы скорости ассоциации ( $k_a$ ) и диссоциации ( $k_d$ ) определяли посредством обработки и подгонки данных к модели связывания в соотношении 1:1, используя программное обеспечение для вычерчивания кривой по точкам Scrubber 2.0. Константы равновесия при диссоциации ( $K_D$ ) и полупериод диссоциации ( $t_{1/2}$ ) рассчитывали, исходя из кинетических констант скорости, как представлено далее:  $K_D (M) = k_d/k_a$ ; и  $t_{1/2} (\text{мин}) = (\ln 2)/(60 \cdot k_d)$ . Как показано в табл. 2, антитела были трех различных категорий: Fc-специфическими, Fc\*-специфическими и теми, которые не демонстрируют различия между Fc и Fc\* (не

специфическими). Fc-специфические антитела были зависимыми от аминокислот His 95 и/или Tyr 96, поскольку эти антитела не связываются с Fc\* человека с дипептидной мутацией (H95R, Y96F) в нем. Напротив, Fc\*-специфические антитела были зависимыми от Arg 95 и/или Phe 96, поскольку эти антитела не связываются с Fc человека дикого типа.

Пример 15. Линии клеток, продуцирующие Ab2 и слитый белок ScFv-FcγR, происходящий от Ab2.

Были секвенированы тяжелая цепь и легкая цепь Fc-специфического Ab2. Для получения рекомбинантного антитела Ab2 был сконструирован экспрессионный вектор в виде плазмиды, кодирующий тяжелую цепь, и был сконструирован экспрессионный вектор в виде плазмиды, кодирующий легкую цепь. Оба вектора допускают экспрессию и секрецию соответствующих субъединиц в клетке CHO. Для экспрессии антитела обе плазмиды трансфицировали в клетку CHO-K1, и были выделены стабильные трансформанты. Экспрессия цепей антител находилась под контролем конститутивного промотора CMV.

Таблица 2. Сродство антител - исследования с использованием поверхностного плазменного резонанса

Антитело	POI-мишень	ka (M <sup>-1</sup> сек <sup>-1</sup> )	kd (сек <sup>-1</sup> )	KD (M)	t ½ (мин)	Специфичность
Ат 1	Fc/Fc	1.07E+05	3.79E-04	3.54E-09	30	Fc
	Fc/Fc*	8.16E+04	3.01E-04	3.69E-09	38	
	Fc*/Fc*	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных	
Ат 2	Fc/Fc	7.86E+04	3.50E-05	4.45E-10	330	Fc
	Fc/Fc*	5.45E+04	1.00E-06	1.84E-11	11550	
	Fc*/Fc*	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных	
Ат 3	Fc/Fc	1.77E+05	4.08E-02	2.30E-07	0.3	Fc
	Fc/Fc*	4.51E+04	2.60E-02	5.77E-07	0.4	
	Fc*/Fc*	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных	
Ат 4	Fc/Fc	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных	Fc*
	Fc/Fc*	6.00E+03	1.00E-06	2.00E-10	11550	
	Fc*/Fc*	2.22E+04	9.56E-06	4.50E-10	1209	
Ат 5	Fc/Fc	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных	Fc*
	Fc/Fc*	3.11E+05	1.00E-06	3.21E-12	11550	
	Fc*/Fc*	5.57E+05	1.00E-06	1.79E-12	11550	
Ат 6	Fc/Fc	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных	Fc*
	Fc/Fc*	4.48E+05	7.43E-04	1.66E-09	16	
	Fc*/Fc*	8.73E+05	5.93E-04	6.79E-10	19	
Ат 7	Fc/Fc	6.02E+05	2.42E-04	4.02E-10	48	Не специфич.
	Fc/Fc*	4.90E+05	2.15E-04	4.39E-10	54	
	Fc*/Fc*	4.46E+05	3.20E-02	7.18E-08	0.4	
Ат 8	Fc/Fc	2.59E+05	4.88E-04	1.88E-09	24	Не специфич.
	Fc/Fc*	1.88E+05	4.02E-04	2.14E-09	29	
	Fc*/Fc*	4.10E+04	3.90E-02	9.60E-07	0.3	

Последовательности тяжелой цепи и легкой цепи были использованы для разработки захватывающей молекулы поверхности, включающей ScFv против Fc. Для получения нуклеиновой кислоты, кодирующей захватывающую молекулу клеточной поверхности ScFv-FcγR против Fc, происходящую от Ab2, аминокислотные последовательности варибельного домена тяжелой цепи иммуноглобулина Ab2 (SEQ ID NO: 15) и варибельного домена легкой цепи иммуноглобулина Ab2 (SEQ ID NO: 16) были обратно переведены в нуклеотидные последовательности и подвергнуты оптимизации в отношении частоты использования кодонов для экспрессии в клетках CHO. Также С-концевая часть FcγRI человека была подвергнута оптимизации в отношении частоты использования кодонов для экспрессии в клетках CHO. Оптимизированные в отношении частоты использования кодонов нуклеотидные последовательности амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции и лигировали с образованием непрерывной последовательности нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 20), которая кодирует слитый белок ScFv-FcγR с SEQ ID NO: 19.

Нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок ScFv-FcγR-TM-cyto, встраивали в экспрессионный вектор, используя стандартную ПЦР и методы клонирования с использованием эндонуклеаз рестрикции. Полученная замкнутая в круг плаزمиды, проиллюстрированная в SEQ ID NO: 23, включает кодирующую бета-лактамазу последовательность нуклеиновой кислоты и два оперона. Первый оперон включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую желтый флуоресцентный белок (YFP), вариант зеленого флуоресцентного белка, в рамке с маркером устойчивости к неомицину, под контролем промотора SV40 (например, SEQ ID NO: 24). Второй оперон, который является наиболее важной частью вектора для целей этого аспекта изобретения, включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую кодон-оптимизированный слитый белок ScFv-FcγR, под контролем промотора hCMV-IE и интрон hCMV (например, SEQ ID NO: 25).

Клетки CHO-K1 трансфицировали плазмидой SEQ ID NO: 23. Были выделены стабильные интегранты, которые интегрировали линейную конструкцию SEQ ID NO: 22 в свои геномы.

Замкнутая в круг плазида содержит два Lox-сайта, фланкирующие первый оперон и второй оперон, чтобы обеспечить интеграцию этих оперонов в виде линейной конструкции в геном клетки-хозяина. Линейная конструкция, простирающаяся от первого Lox-сайта до второго Lox-сайта, иллюстрируется в SEQ ID NO: 22 и включает от 5' к 3': промотор SV40, нуклеиновую кислоту, кодирующую устойчивость к неомицину, IRES, нуклеиновую кислоту, кодирующую eYFP, последовательность полиаденилирования SV40, промотор hCMV-IE, интрон hCMV, последовательность Tet-оператора (для контролируемой экспрессии слитого белка ScFv-FcγR-TM-cyto), кодирующую сигнальную последовательность mROR нуклеиновую кислоту, нуклеиновую кислоту, кодирующую ScFv Ab2, нуклеиновую кислоту, кодирующую трансмембранную и цитоплазматическую часть FcγR (SEQ ID NO: 21), и последовательность полиаденилирования SV40.

Пример 16. Целевые объекты захвата на поверхности с помощью ScFv-FcγR-TM-cyto

Клетки CHO-K1, содержащие интегрированную последовательность SEQ ID NO: 22, трансфицировали плазидами, которые кодируют антитела различных подтипов, например IgG1, IgG2, IgG4, биспецифическое антитело подтипа IgG4, содержащее один CH3-домен с двумя заменами 95R/435R-96F/436F, в то время как другой CH3-домен является доменом дикого типа (Fc/Fc\* IgG4), и биспецифическое антитело подтипа IgG1 формата Fc/Fc\* IgG1. Клетки обрабатывали доксициклином для вызова продукции, захватывающей молекулы вместе с антителом. После коэкспрессии антитела и захватывающей молекулы, клетки в некоторых случаях обрабатывали hFc-блокирующим белком и детекторной молекулой (FITC-меченным антителом против hFab). В табл. 3 суммированы результаты, и в общем показано, что слитый белок для захвата на поверхности ScFv-FcγR связывает молекулы IgG4, IgG2 и IgG1, в то время как включающая FcγR дикого типа захватывающая молекула поверхности связывает IgG1, но не IgG4 или IgG2.

Таблица 3. Анализы конкуренции с использованием блокирующей молекулы

Антитело	Произвольные FITC единицы (с hFc-блокирующей молекулой или без нее) - Способ					Замена hFc?
	Без hFc	hFc (1 ч)	hFc (2 ч)	hFc (20 ч)	Без покрытия	
	Захватывающая молекула = ScFv-FcγR-TM-cyto Детекторная молекула = FITC-меченное антитело против hFab					
IgG1 mAb-3	250	120	80	20	10	Да
IgG4 mAb-4	250	100	55	20	10	Да
IgG4 mAb-5	250	70	40	20	10	Да
IgG2 mAb-6	200 <sup>1</sup>	Нет данных	ND	ND	12 <sup>2</sup>	Да
	Захватывающая молекула = hFcγR Детекторная молекула = FITC-меченное антитело против hFab					
IgG1 mAb-3	300	80	30	9	3,5	Да
IgG4 mAb-4	100	2	2	2	2	Нет
IgG4 mAb-5	35	5	5	5	5	Нет

<sup>1</sup> + Dox

<sup>2</sup> - Dox

Пример 17. Линии клеток, продуцирующие Ab6 и происходящий от Ab6 ScFv\*-FcγR-TM-cyto.

Были секвенированы тяжелая цепь и легкая цепь Fc\*-специфического Ab6. Аминокислотной последовательностью легкой цепи, как установлено, является SEQ ID NO: 41. Аминокислотной последовательностью тяжелой цепи, как установлено, является SEQ ID NO: 40. Для получения рекомбинантного антитела Ab6 был сконструирован экспрессионный вектор в виде плазмиды, кодирующий тяжелую цепь, и был сконструирован экспрессионный вектор в виде плазмиды, кодирующий легкую цепь. Для экспрессии антитела обе плазмиды трансфицировали в клетку CHO-K1, были выделены стабильные трансформанты, и экспрессия находилась под контролем конститутивного промотора CMV.

Для получения нуклеиновой кислоты, кодирующей захватывающую молекулу клеточной поверхности ScFv\*-FcγR, происходящую от Ab6 и специфичную к Fc\*, аминокислотные последовательности варибельного домена тяжелой цепи иммуноглобулина антитела Ab6 (SEQ ID NO: 38) и варибельного

домена легкой цепи иммуноглобулина Ab6 (SEQ ID NO: 39) были обратно переведены в нуклеотидные последовательности и подвергнуты оптимизации в отношении частоты использования кодонов для экспрессии в клетках CHO. Также С-концевая часть FcγRI человека (SEQ ID NO: 21) была подвергнута оптимизации в отношении частоты использования кодонов для экспрессии в клетках CHO. Оптимизированные в отношении частоты использования кодонов нуклеотидные последовательности амплифицировали с помощью полимеразной цепной реакции и лигировали с образованием непрерывной последовательности нуклеиновой кислоты (SEQ ID NO: 45), которая кодирует слитый белок ScFv\*FcγR против Fc\* (SEQ ID NO: 43).

Нуклеиновую кислоту, кодирующую слитый белок ScFv\*FcγR-TM-cyto, встраивали в экспрессионный вектор, используя стандартную ПЦР и методы клонирования с использованием эндонуклеаз рестрикции. Полученная замкнутая в круг плаزمиды, проиллюстрированная в SEQ ID NO: 44, включает кодирующую бета-лактамазу последовательность нуклеиновой кислоты и два оперона. Первый оперон включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую желтый флуоресцентный белок (YFP), вариант зеленого флуоресцентного белка, в рамке с маркером устойчивости к неомицину, под контролем промотора SV40 (например, SEQ ID NO: 46). Второй оперон, который является наиболее важной частью вектора для целей этого аспекта изобретения, включает последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую кодон-оптимизированный слитый белок ScFv-FcγR против Fc\*, под контролем промотора hCMV-IE и интрон hCMV (например, SEQ ID NO: 47).

Клетки CHO-K1 трансфицировали плазмидой SEQ ID NO: 44. Были выделены стабильные интегранты, которые интегрировали линейную конструкцию SEQ ID NO: 48.

Замкнутая в круг плаزمиды содержит два Lox-сайта, фланкирующие первый оперон и второй оперон, чтобы обеспечить интеграцию этих оперонов в виде линейной конструкции в геном клетки-хозяина. Линейная конструкция, простирающаяся от первого Lox-сайта до второго Lox-сайта, иллюстрируется в SEQ ID NO: 48 и включает от 5' к 3': промотор SV40, нуклеиновую кислоту, кодирующую устойчивость к неомицину, IRES, нуклеиновую кислоту, кодирующую eYFP, последовательность полиаденилирования SV40, промотор hCMV-IE, интрон hCMV, последовательность Tet-оператора (для контролируемой экспрессии слитого белка ScFv\* против Fc\*-FcγR), кодирующую сигнальную последовательность mROR нуклеиновую кислоту, нуклеиновую кислоту, кодирующую ScFv\*, происходящий от Ab6 и специфичный к Fc\*, нуклеиновую кислоту, кодирующую трансмембранный и цитоплазматический домен полипептид FcγR (SEQ ID NO: 21), и последовательность полиаденилирования SV40.

Пример 18. Сортировка биспецифических антител.

Захват с использованием направленной против Fc молекулы и детектирование с использованием антитела против Fc\*.

Система захвата на поверхности на основе ScFv-FcγR, происходящего от Ab2 и специфичного к Fc, была проверена на ее способность обнаруживать и обогащать в отношении клетки(ок), которые продуцируют биспецифические антитела. Для оценки способности детектировать биспецифические антитела, которые содержат замену 95R/435R-96F/436F в одном из CH3-доменов (названном Fc\*), были экспрессированы различные антитела в линии клеток с захватывающей молекулой ее поверхности в виде белка ScFv-FcγR, происходящего от Ab2 и специфичного к Fc, используя hFc в качестве блокирующей молекулы, и FITC-меченное антитело против Fc\* Ab6 (например, mAb с HC с SEQ ID NO: 40, и LC с SEQ ID NO: 41) в качестве детекторной молекулы. Линия клеток с захватывающей молекулой на ее поверхности в виде белка ScFv-FcγR, происходящего от Ab2 и специфичного к Fc, была способна детектировать и отличать биспецифическое антитело (Fc/Fc\*) от любых моноспецифических антител Fc\*/Fc\* или Fc/Fc, используя Fc\*-специфическое антитело Ab6 в качестве детекторной молекулы (табл. 4). Линия клеток с захватывающей молекулой на ее поверхности в виде белка FcγR дикого типа не была способна провести различие между видами Fc/Fc\*, Fc\*/Fc\* и Fc/Fc IgG4, поскольку FcγR не может связывать или связывается с очень низким сродством к IgG4.

Захват с использованием направленной против Fc\* молекулы и детектирование с использованием антитела против Fc.

С другой стороны, система захвата на поверхности на основе ScFv\*FcγR, происходящего от Ab6 и специфичного к Fc\*, была проверена на ее способность обнаруживать и обогащать в отношении клетки(ок), которые продуцируют биспецифические антитела. Для оценки способности детектировать биспецифические антитела, которые содержат замену 95R/435R-96F/436F в одном из CH3-доменов (названном Fc\*), были экспрессированы различные антитела в линии клеток с захватывающей молекулой на ее поверхности в виде белка ScFv\*FcγR, происходящего от Ab6 и специфичного к Fc\*, используя hFc в качестве блокирующей молекулы, и Alexa 488-меченное антитело против Fc Ab2, которое распознает не замещенный CH3, в качестве детекторной молекулы. Линия клеток с захватывающей молекулой на ее поверхности в виде белка происходящий от Ab6 анти-Fc\*-специфический ScFv\*FcγR была способна детектировать и отличать биспецифическое антитело (Fc/Fc\*) от любых моноспецифических антител Fc\*/Fc\* или Fc/Fc, используя Fc-специфическое антитело Ab2 в качестве детекторной молекулы (табл. 4). Линия клеток с захватывающей молекулой на ее поверхности в виде FcγR не была способна провести

различие между видами Fc/Fc\*, Fc\*/Fc\* и Fc/Fc IgG4.

Таблица 4. Детектирование биспецифических антител - средняя интенсивность флуоресценции (MFI)

<sup>1</sup> CSCP	<sup>2</sup> DM	IgG1			IgG4			Специфичность в отношении Fc/Fc*
		Fc/Fc*	Fc*/Fc*	Fc/Fc	Fc/Fc*	Fc*/Fc*	Fc/Fc	
FcγR	Ab2	500	Нет данных	350	200	200	200	НЕТ
	Ab6	200	200	200	Нет данных	Нет данных	Нет данных	НЕТ
	Анти-hFc	1800	Нет данных	1000	Нет данных	Нет данных	Нет данных	НЕТ
ScFv-FcγR	Ab6	500	15	15	500	15	15	ДА
	Анти-hFc	Нет данных						
ScFv*-FcγR	Ab2	150	10	10	Нет данных	Нет данных	Нет данных	ДА
	Анти-hFc	200	Нет данных	10	Нет данных	Нет данных	Нет данных	ДА

<sup>1</sup> Захватывающий белок клеточной поверхности

<sup>2</sup> Детекторная молекула

Пример 19. Обогащение в отношении Fc/Fc\* биспецифических антител.

Для оценки способности систем (происходящих от Ab2) ScFv-FcγR в качестве CSCP/антитело против Fc\* (Ab6) в качестве DM (детекторной молекулы) и (происходящий от Ab6) ScFv\*-FcγR в качестве CSCP/антитело против Fc (Ab2) в качестве DM к сортировке и обогащению биспецифических антител, линии клеток, коэкспрессирующие моноклональное антитело Fc/Fc\* IgG4 (IgG4-mAt-2) и слитый белок ScFv-FcγR против Fc, используя hFc в качестве блокирующей молекулы и FITC-меченное антитело против Fc\* (Ab6) в качестве детекторной молекулы, были подвергнуты серийной сортировке клеток с возбуждением флуоресценции и объединению для обогащения в отношении продукции видов Fc/Fc\*. Клетки, вырабатывающие Fc/Fc\*, из пулов пятой и шестой серии были проанализированы на титр антител в целом и титры антител каждого формата: Fc/Fc\*, Fc/Fc и Fc\*/Fc\*. Поскольку клетки кодируют как тяжелую цепь, кодирующую не замещенный CH3-домен ("Fc", т.е. включающий гистидин в положении 95 в соответствии с IMGT и тирозин в положении 96 в соответствии с IMGT), так и тяжелую цепь, кодирующей замещенный CH3-домен ("Fc\*", т.е. включающий аргинин в положении 95 в соответствии с IMGT и фенилаланин в положении 96 в соответствии с IMGT), согласно чисто математическому анализу с использованием решетки Пеннетта, клетка теоретически будет продуцировать 25% Fc/Fc, 50% Fc/Fc\* и 25% Fc\*/Fc\*. Биологически, однако, можно было бы ожидать (предварительное обогащение), что большая часть продуцированного антитела будет Fc/Fc.

Как показано в табл. 5, клетки, отобранные, объединенные и обогащенные в отношении продукции биспецифических антител, продуцировали вплоть до 49% видов Fc/Fc\*, с титрами Fc/Fc\* биспецифических антител, составляющими по меньшей мере приблизительно 3,2 г/л.

Таблица 5. Обогащение в отношении Fc/Fc\* биспецифического антитела IgG4-мАт-2

Пул	Линия клеток	Fc/Fc*		Fc/Fc		Fc*/Fc*	
		Титр (г/л)	%	Титр (г/л)	%	Титр (г/л)	%
5	1	1,2	28	2,2	50	0,99	23
	2	1,9	<b>49</b>	1,3	32	0,73	19
	3	1,5	47	1,2	40	0,40	13
	4	1,6	37	1,3	31	1,3	32
	5	1,5	48	1,1	35	0,58	18
	6	1,8	47	1,3	33	0,75	20
6	7	2,6	44	2,0	34	1,3	23
	8	<b>3,2</b>	42	2,4	31	2,0	27
	9	2,1	45	1,5	33	1,0	22
	10	2,8	43	2,0	31	1,7	28
	11	2,3	44	1,6	31	1,3	24

Хотя предшествующее изобретение было описано довольно подробно с целью иллюстрации и примера, специалистам со средним уровнем компетентности в данной области техники будет очевидно, что определенные изменения и модификации могут быть внесены в идеи изобретения, не отступая от сущности или объема прилагаемой формулы изобретения.

## СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.  
 <120> РЕКОМБИНАНТНЫЕ ЗАХВАТЫВАЮЩИЕ БЕЛКИ КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ  
 <130> 8600-WO  
 <150> US 61/726,040  
 <151> 2012-11-14  
 <160> 51  
 <170> Патент в версии 3.5  
 <210> 1  
 <211> 195  
 <212> Белок  
 <213> Streptococcus  
 <400> 1

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

Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr  
 20 25 30

Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr  
 35 40 45

Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala Ser Glu  
 50 55 60

Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr  
 65 70 75 80

Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu  
 85 90 95

Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp  
 100 105 110

Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu  
 115 120 125

Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu  
 130 135 140

Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Lys Ala Val



<210> 4  
 <211> 33  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетическая

<400> 4  
 acactctccc ctggtgaagc tcttgacaat ggg 33

<210> 5  
 <211> 31  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетическая

<400> 5  
 gccaaaaaaa cagccccatc ggtctatcca c 31

<210> 6  
 <211> 35  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетическая

<400> 6  
 tcatttaccc ggagtcoggg agaagctctt agtcg 35

<210> 7  
 <211> 47  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетическая

<400> 7  
 gagagtacct gcgtcatgca gatgtgaaac tgcaggagtc tggccct 47

<210> 8  
 <211> 38  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетическая

<400> 8  
 gagagacctg cgtcagctga ggagacggtg accgtggt 38

<210> 9  
 <211> 35  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> синтетическая  
  
 <400> 9  
 gagagggtct cacagcсааа асаасаgccc catcg 35

<210> 10  
 <211> 42  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> синтетическая  
  
 <400> 10  
 gagagggtct ccgcccgtc atttaccgg agtccgggag aa 42

<210> 11  
 <211> 40  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> синтетическая  
  
 <400> 11  
 gagagcgtct catgcagaca tccagatgac ccagtctcca 40

<210> 12  
 <211> 40  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> синтетическая  
  
 <400> 12  
 gagagcgtct cacagcccgt tttatttcca gcttggctcc 40

<210> 13  
 <211> 36  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> синтетическая

<400> 13  
gagagggtct cagctgatgc tgcaccaact gtatcc 36

<210> 14  
<211> 48  
<212> ДНК  
<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>  
<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ

<400> 14  
gagagggtct caggccgctc aacactctcc cctggtgaag ctcttgac 48

<210> 15  
<211> 113  
<212> Белок  
<213> Homo sapiens

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

<210> 16  
<211> 112  
<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 16

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

Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His  
20 25 30

Asn Asn Gly Asp Thr Phe Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln  
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val  
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys  
65 70 75 80

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln  
85 90 95

Thr Thr Leu Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
100 105 110

<210> 17

<211> 21

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 17

Val Leu Phe Tyr Leu Ala Val Gly Ile Met Phe Leu Val Asn Thr Val  
1 5 10 15

Leu Trp Val Thr Ile  
20

<210> 18

<211> 61

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 18

Arg Lys Glu Leu Lys Arg Lys Lys Lys Trp Asp Leu Glu Ile Ser Leu  
1 5 10 15

Asp Ser Gly His Glu Lys Lys Val Thr Ser Ser Leu Gln Glu Asp Arg  
 20 25 30

His Leu Glu Glu Glu Leu Lys Cys Gln Glu Gln Lys Glu Glu Gln Leu  
 35 40 45

Gln Glu Gly Val His Arg Lys Glu Pro Gln Gly Ala Thr  
 50 55 60

<210> 19

<211> 334

<212> Белок

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 19

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30

Trp Ile His Trp Glu Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Asn Thr Gly His Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

Ala Arg Thr Tyr Ser Gly Ser Ser His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Thr Leu Ile Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 115 120 125

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Val Ser  
 130 135 140

Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser  
145 150 155 160

Gln Ser Leu Val His Asn Asn Gly Asp Thr Phe Leu His Trp Tyr Leu  
165 170 175

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn  
180 185 190

Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr  
195 200 205

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

Tyr Phe Cys Ser Gln Thr Thr Leu Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly  
225 230 235 240

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Gly Gly Gly Ser Val Leu Phe Tyr  
245 250 255

Leu Ala Val Gly Ile Met Phe Leu Val Asn Thr Val Leu Trp Val Thr  
260 265 270

Ile Arg Lys Glu Leu Lys Arg Lys Lys Lys Trp Asp Leu Glu Ile Ser  
275 280 285

Leu Asp Ser Gly His Glu Lys Lys Val Thr Ser Ser Leu Gln Glu Asp  
290 295 300

Arg His Leu Glu Glu Glu Leu Lys Cys Gln Glu Gln Lys Glu Glu Gln  
305 310 315 320

Leu Gln Glu Gly Val His Arg Lys Glu Pro Gln Gly Ala Thr  
325 330

<210> 20  
<211> 1005  
<212> ДНК  
<213> искусственная последовательность

<220>  
<223> синтетическая

<400> 20  
caagtacaac tgcaacaaaag cggagctgaa ctggcctaac caggcgcttc cgtgaagatg

60

tcttgtaaag ccagcgggta tacatttact aattactgga ttcactggga gaagcaaaga 120  
 cctgaacagg gattggaatg gattggatac attaatocta acaccggaca cacagagtat 180  
 aatcaaaaat tcaaggataa ggccaccctc acagccgaca gatcttcttc aaccgcctat 240  
 atgcaacttt cttccctcac ttctgaagac tccgcagttt acttttgccg acgaacttat 300  
 tctggaagct cccatttcga ctactggggt caaggaacaa cactgatcgt gtctagcggc 360  
 ggcggagggt ccggcggggg cggtagcggg ggcggagggt ctgatattgt catgactcaa 420  
 acacctgtct ctctgcctgt ttcacttggg gatcaagcta gcatttctctg ccgctctagt 480  
 caatctctcg tccacaacaa cggcgatact ttcttgcatt ggtatctgca gaaaccaggt 540  
 cagtcaccta aactgcttat atacaaagtc tctaatagat tctcaggggt gccagatcga 600  
 ttcagtgggt ctgggtcccg tacagatfff aactcaaga tatccagagt agaagcagaa 660  
 gatctgggcg tgtatttctg cagtcaaaca acacttattc ctctactttt tggaggcggg 720  
 acaaaactgg agatcaagcg tggaggcggg gggagtgttt tgttttatct ggcctgtggg 780  
 ataatgtttc tcgtaaacat agtactttgg gtaacaataa ggaaggaact gaagagaaag 840  
 aaaaaatggg atctggaaat atcattggac agtggacacg aaaaaaagt cacatcatca 900  
 ttgcaagaag accggcactt ggaggaggaa ctgaaatgtc aagagcaaaa agaagaacaa 960  
 ctgcaagaag gcgtacatag aaaagaacca caggagcaaa catag 1005

<210> 21

<211> 82

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 21

Val Leu Phe Tyr Leu Ala Val Gly Ile Met Phe Leu Val Asn Thr Val  
1 5 10 15

Leu Trp Val Thr Ile Arg Lys Glu Leu Lys Arg Lys Lys Lys Trp Asp  
20 25 30

Leu Glu Ile Ser Leu Asp Ser Gly His Glu Lys Lys Val Thr Ser Ser  
35 40 45

Leu Gln Glu Asp Arg His Leu Glu Glu Glu Leu Lys Cys Gln Glu Gln  
50 55 60

Lys Glu Glu Gln Leu Gln Glu Gly Val His Arg Lys Glu Pro Gln Gly



tattgocgtc ttttgcaat gtgaggccc ggaaacctgg cctgtcttc ttgacgagca	1320
ttcctagggg ttttcccct ctgccaag gaatgcaagg tctgttgaat gtcgtgaagg	1380
aagcagttcc tctggaagct tcttgaagac aaacaacgtc tgtagcgacc ctttgcaggc	1440
agcggaaacc ccacactggc gacaggtgcc tctgcgcca aaagccacgt gtataagata	1500
cactgcaaaa ggcggcaciaa ccccagtgcc acgttgtgag ttggatagtt gtggaaagag	1560
tcaaatggct ctctcaagc gtattcaaca aggggctgaa ggatgccag aaggtacccc	1620
attgtatggg atctgatctg gggcctcggg gcacatgctt tacatgtgtt tagtcgaggt	1680
taaaaaacgt ctaggcccc cgaaccacgg gacgtggtt ttctttgaa aaacacgatt	1740
gctcgaatca ccatggtag caagggcgag gagctgttca ccggggtggt gcccatcctg	1800
gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac aagtccagcg tgtccggcga gggcgagggc	1860
gatgccacct acggcaagct gacctgaag ttcactgca ccaccggcaa gctgccctg	1920
ccctggcca cctcgtgac cacctcggc tacggcctgc agtgettcgc ccgctacccc	1980
gaccacatga agcagcacga cttctcaag tccgccatgc ccgaaggcta cgtccaggag	2040
cgcaccatct tctcaagga cgcggcaac tacaagacc gcgccaggt gaagtccgag	2100
ggcgacacc tgggaaccg catcgagctg aaggcatcg acttcaagga ggacggcaac	2160
atcctggggc acaagctgga gtacaactac aacagccaca acgtctatat catggccgac	2220
aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc aagatccgcc acaacatcga ggacggcagc	2280
gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac acccccacg gcgacggccc cgtgctgctg	2340
cccgacaacc actacctgag ctaccagtcc gccctgagca aagacccca cgagaagcgc	2400
gatcacatgg tctgctgga gttcgtgacc gccgccgga tcaactctcg catggacgag	2460
ctgtacaagt aatcgccgc taatcagcca taccacattt gtagaggttt tacttgcttt	2520
aaaaaacctc ccacacctc cctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa ttgttgtgt	2580
taacttgctt attgcagctt ataatggtta caaataaagc aatagcatca caaatccac	2640
aaataaagca tttttttcac tgcattctag ttgtggttg tccaaactca tcaatgtatc	2700
ttatcatgtc ggcgcgtga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg	2760
ggtcattagt tcatagcca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg gtaaatggcc	2820
cgctggctg accgcccac gaccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca	2880
tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaacgt	2940
cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gcccctatt gacgtcaatg	3000

acggtaaatg gcccgctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac tttcctactt 3060  
 ggcagtacat ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggg gatgcgggtt tggcagtaca 3120  
 tcaatgggag tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac ccattgacg 3180  
 tcaatgggag tttgttttg caccaaatc aacgggactt tccaaatgt cgtaacaact 3240  
 ccgccccatt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggcttat ataagcagag 3300  
 ctctccctat cagtgataga gatctcccta tcagtgatag agatcgtoga cgtttagtga 3360  
 accgtcagat cgctggaga cccatccac gctgtttga cctccataga agacaccggg 3420  
 accgatccag cctccgoggc cgggaacggg gcattggaac gcggattccc cgtgccaaga 3480  
 gtgacgtaag taccgctat agagtctata ggcccacccc cttggcttct tatgcatgct 3540  
 atactgtttt tggcttggg tctatacacc ccgcttct catgttatag gtgatggtat 3600  
 agcttagcct atagggtgg gttattgacc attattgacc actcccctat tggtgacgat 3660  
 actttccatt actaatccat aacatggctc tttgccaca ctctctttat tggctatatg 3720  
 ccaatacact gtocctcaga gactgacacg gactctgtat ttttacagga tggggctca 3780  
 tttattattt acaaatcac atatacaaca ccaccgtccc cagtgccgc agtttttatt 3840  
 aaacataacg tgggatctcc acggaatct cgggtacgtg ttccggacat ggtctctct 3900  
 ccggtagcgg cggagcttct acatccgagc cctgctcca tgctccagc gactcatggt 3960  
 cgctcggcag ctocctgctc ctaacagtgg aggccagact taggcacagc acgatgcca 4020  
 ccaccaccag tgtccgcac aaggccgtgg cggtagggta tgtgtctgaa aatgagctcg 4080  
 gggagcgggc ttgcaccgct gacgcatttg gaagacttaa ggcagcggca gaagaagatg 4140  
 caggcagctg agttgttggt ttctgataag agtcagaggt aactcccgtt gcggtgctgt 4200  
 taacggtgga ggcagtgta gtctgagcag tactcgttgc tgccgcgcgc gccaccagac 4260  
 ataatagctg acagactaac agactgttcc tttccatggg tctttctg agtcaccgtc 4320  
 cttgacacga agcttatact cgagctctag attggaacc cgggtctctc gaattcgaga 4380  
 totccaccat gcacagacct agacgtcgtg gaactcgtcc acctccactg gactgctcg 4440  
 ctgctctcct cctggctgca cgtggtgctg atgcacaagt acaactgcaa caaagcggag 4500  
 ctgaactggc caaaccaggc gcttccgtga agatgtcttg taaagccagc gggatacat 4560  
 ttactaatta ctggattcac tgggagaagc aaagacctga acagggattg gaatggattg 4620  
 gatacatata tctaaccacc ggacacacag agtataatca aaaattcaag gataaggcca 4680  
 cctcaccagc cgacagatct tcttcaaccg cctatatgca actttcttcc ctcacttctg 4740

aagactccgc agtttacttt tgcgcacgaa cttattctgg aagctcccat ttcgactact 4800  
ggggtcaagg aacaacactg atcgtgtcta gcggcggcgg agggctccgc gggggcggta 4860  
gcggtgccgg aggttctgat attgtcatga ctcaaacacc tgtctctctg cctgtttcac 4920  
ttggagatca agctagcatt tcctgcccgt ctagtcaatc tctcgtccac aacaacggcg 4980  
atactttctt gcattgggat ctgcagaaac caggtcagtc acctaaactg cttatataca 5040  
aagtctctaa tagattctca ggggtgccag atcgattcag tggttctggg tccggtacag 5100  
attttacct caagatatcc agagtagaag cagaagatct gggcgtgtat ttctgcagtc 5160  
aaacaacact tattcctcgt acttttgag gcggtacaaa actggagatc aagcgtggag 5220  
gcggaggggag tgttttggtt tatctggccg ttgggataat gtttctcgt aatacagtac 5280  
tttgggtaac aataaggaag gaactgaaga gaaagaaaa atgggatctg gaaatatcat 5340  
tggacagtgg acacgaaaa aaagtcacat catcattgca agaagaccgg cacttgagg 5400  
aggaactgaa atgtcaagag caaaaagaag acaactgca agaaggcgta catagaaaag 5460  
aaccacaggg agcaacatag gcggccccta atcagccata ccacatttgt agaggtttta 5520  
cttgttttaa aaaacctccc acacctccc ctgaacctga aacataaaat gaatgaatt 5580  
gttgttgta acttgtttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca 5640  
aatttcaca ataaagcatt ttttctactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcatc 5700  
aatgtatctt atcatgtcta ccggtataac ttcgtataat gtatactata cgaagttag 5759

<210> 23  
<211> 7627  
<212> ДНК  
<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>  
<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ

<400> 23  
aagcttatac tcgagctcta gattgggaac ccgggtctct cgaattcgag atctccacca 60  
tgcacagacc tagacgtcgt ggaactcgtc cacctccact ggcactgctc gctgctctcc 120  
tcctggctgc acgtgggtgct gatgcacaag tacaactgca acaaagcggg gctgaactgg 180  
ccaaaccagg cgcttcogtg aagatgtctt gtaaagccag cgggtataca tttactaatt 240  
actggattca ctgggagaag caaagacctg aacagggatt ggaatggatt ggatacatta 300  
atcctaacac cggacacaca gagtataatc aaaaattcaa ggataaggcc accctcacag 360  
ccgacagatc ttcttcaacc gcctatatgc aactttcttc cctcacttct gaagactccg 420

cagtttactt ttgcgcacga acttattctg gaagctccca tttcgactac tggggtaag	480
gaacaacact gatcgtgtct agcggcgcg gagggcccg cggggcggt agcggggcg	540
gaggttctga tattgtcatg actcaaacac ctgtctctct gctgtttca cttggagatc	600
aagctagcat ttctgccc tctagtcatt ctctcgtcca caacaacggc gatactttct	660
tgcatgtgta tctgcagaaa ccaggtcagt cacctaaact gcttatatac aaagtctcta	720
atagattctc aggggtgcca gatcgattca gtggttctgg gtccgggtaca gattttacac	780
tcaagatata cagagtagaa gcagaagatc tgggcgtgta tttctgcagt caaacaacac	840
ttattcctcg tacttttgga ggcggtacaa aactggagat caagcgtgga ggcggaggga	900
gtgttttgtt ttatctggcc gttgggataa tgtttctcgt aaatacagta ctttgggtaa	960
caataaggaa ggaactgaag agaagaaaa aatgggatct ggaatatca ttggacagt	1020
gacacgaaaa aaaagtcaca tcatcattgc aagaagaccg gcaactggag gaggaactga	1080
aatgtcaaga gaaaaagaa gaacaactgc aagaagcgt acatagaaaa gaaccacagg	1140
gagcaacata ggcggcggct aatcagccat accacatttg tagaggtttt acttgcttta	1200
aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa tgaatgcaat tgttgtgtt	1260
aacttgttta ttgcagetta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca	1320
aataaagcat ttttttact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct	1380
tatcatgtct accggtataa ctctgtataa tgtatactat acgaagttag ccggtagggc	1440
ccctctcttc atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg aaccgtaaaa aggcgcggt	1500
gctggcgttt ttccatagge tccgcccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag	1560
tcagaggtgg cgaaaccoga caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc	1620
cctcgtgccc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc	1680
ttcgggaage gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggttaggt	1740
cgttcgtccc aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagcccagacc gctgcccctt	1800
atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc	1860
agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttottgaa	1920
gtgggtggct aactacggct aactagaag aacagtattt ggtatctgcg ctctgctgaa	1980
gccagttacc ttcggaaaaa gagttgtag ctcttgatcc ggcaaaaaa ccaccgctgg	2040
tagcgggtgt ttttttgtt gcaagcagca gattacgccc agaaaaaag gatctcaaga	2100
agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtg aacgaaaact cacgttaagg	2160

gattttggtc atgggcgcgc ctccatactcc tgcaggcatg agattatcaa aaaggatctt	2220
cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatgagta	2280
aaacttggct gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct	2340
atctcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg	2400
cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggtccaga	2460
tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt	2520
atccgcctcc atccagtcta ttaattggtg ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt	2580
taatagtttg cgcaacggtg ttgccattgc tacaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt	2640
tggtatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttacat gatccccat	2700
gttgtgcaaa aaagcgggta gtccttcgg tcctccgac gttgtcagaa gtaagttggc	2760
cgcagtggtt tcactcatgg ttatggcagc actgcataat tctcttactg tcatgccatc	2820
cgtaagatgc ttttctgtga ctgggtgagta ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat	2880
gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc aatacgggat aatactgcgc cacatagcag	2940
aaacttaaaa gtgctcatca ttgaaaaacg ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt	3000
accgctggtg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc	3060
ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcataatg ccgcaaaaaa	3120
gggaataaag gcgacacgga aatggtgaat actcatactc ttctttttc aatattattg	3180
aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata tttgaatgta tttagaaaaa	3240
taaacaaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg tcaggtacac	3300
aaacttcgat agcatacatt atacgaagtt atggtaccaa gcctagcct ccaaaaaagc	3360
ctcctcacta cttctggaat agctcagagg cagaggcggc ctcggcctct gcataaataa	3420
aaaaaattag tcagccatgg ggcggagaat ggcgggaact ggcgggagtt agggcgggga	3480
tgggcggagt tagggcggg actatggttg ctgactaatt gagatgcatg ctttgatac	3540
ttctgcctgc tggggagcct ggggactttc cacacctggt tgctgactaa ttgagatgca	3600
tgctttgcat acttctgcct gctggggagc ctggggactt tccacaccgg atccaccatg	3660
ggttcagcta ttgagcagga tgggttgcat gctggtagtc ccgccgcatg ggtcgaaega	3720
ctgtttggat acgattgggc ccaacagact ataggctggt ccgacgctgc tgtctttcgt	3780
ctttctgcac aaggtcgtcc agttctgttc gtgaaaaccg acttgcctcg agccotcaat	3840
gagttgcaag acgaagctgc acgactgagt tggcttgcca ccaactggtg cccatgtgcc	3900

gcagtacttg acgtcgtcac agaggctggt cgcgattggt tgctccttgg agaagtgcc 3960  
ggccaagatc ttctcagttc ccaccttgcc cctgcccga aagtttcaat aatggctgac 4020  
gctatgagaa ggtgacacac ccttgaccct gccacatgtc cattcgatca ccaagccaaa 4080  
caccgaattg aacgagctag aaccocgatg gaagccggcc tcgttgatca agacgatttg 4140  
gatgaggaac accagggctc cgcaccgct gaactcttcg ctgcctcaa agcacgaatg 4200  
ccagacggag atgacttggc cgtaacccac ggagatgcoct gccttctaa cataatgta 4260  
gagaatggaa gatttagcgg cttcattgat tgtggacgac ttggagttgc agatcggtag 4320  
caagatatcg ctctcgctac cagagatatt gctgaagaat tggcgggaga atgggctgat 4380  
cggtttctcg tactctacgg aattgcccga cctgattccc aacgcattgc tttttaccgt 4440  
cttctggatg agttcttcta aacgcgtccc cctctcctc ccccccccc taacgttact 4500  
ggccgaagcc gcttgaata aggccggtgt gcgtttgtct atatgttatt tccaccata 4560  
ttgccgtctt ttggcaatgt gagggcccgg aaacctggcc ctgtcttctt gacgagcatt 4620  
cctaggggtc tttcccctct cgcctaaagga atgcaaggtc tgtgaaatgt cgtgaaggaa 4680  
gcagttctc tggaagcttc ttgaagacaa acaactctg tagcgcacct ttgcagggag 4740  
cggaaacccc cacctggcga caggtgctc tgcggccaaa agccacgtgt ataagataca 4800  
cctgcaaaag cggcacaacc ccagtgccac gttgtgagtt ggatagttgt ggaagagtc 4860  
aaatggctct cctcaagcgt attcaacaag gggctgaagg atgccagaa ggtaccccat 4920  
tgtatgggat ctgatctggg gcctcgggtc acatgcttta catgtgttta gtcgaggtta 4980  
aaaaacgtct agggcccccg aaccacgggg acgtggtttt cctttgaaaa acacgattgc 5040  
tcgaatcacc atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt 5100  
cgagctggac ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga 5160  
tgccaacctac ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc 5220  
ctggcccacc ctctgacca ccttcggcta cggcctgcag tgcttcgccc gtaaccccga 5280  
ccacatgaag cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg 5340  
caccatcttc ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcagggg 5400  
cgacaccctg gtgaaccgca tcgagctgaa gggcctcgtc ttcaaggagg acggcaacat 5460  
cctggggcac aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa 5520  
gcagaagaac ggcacaaag tgaactcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt 5580  
gcagctcgcc gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc 5640

cgacaaccac tacctgagct accagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcga 5700  
 tcacatggtc ctgctggagt tcgtgaccgc cgcggggtac actctcggca tggacgagct 5760  
 gtacaagtaa tcggccgcta atcagccata ccacatttgt agaggtttta cttgctttaa 5820  
 aaaacctccc acacctcccc ctgaacctga aacataaaat gaatgcaatt gttgttgta 5880  
 acttgtttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa 5940  
 ataaagcatt tttttcactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcadc aatgtatctt 6000  
 atcatgtcgg cgcggtgaca ttgattattg actagttatt aatagtaac aattacgggg 6060  
 tcattagttc atagcccata tatggagtgc cgcggtacat aacttacggt aaatggcccg 6120  
 cctggctgac cgcaccaacga cccccgcca ttgacgtcaa taatgacgta tgttcccata 6180  
 gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg agtatttacg gtaaaactgcc 6240  
 cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtaacg cccctattga cgtcaatgac 6300  
 ggtaaattgc cgcctcggca ttatgcccag tacatgacct tatgggactt tcctacttgg 6360  
 cagtacatct acgtattagt catcgtatatt accatggtga tgcgggtttg gcagtacac 6420  
 aatgggcgtg gatagcgggt tgactcacgg ggatttccaa gtctccacc cattgacgtc 6480  
 aatgggagtt tgttttgca ccaaatcaa cgggacttcc caaatgtcg taacaactcc 6540  
 gccccattga cgcacaatggg cggtaggcgt gtacgggtgg aggtctatat aagcagagct 6600  
 ctccctatac gtgatagaga tctccctac agtgatagag atcgtcgcag tttagtgaac 6660  
 cgtcagatcg cctggagacg ccattccacg tgttttgacc tccatagaag acaccgggac 6720  
 cgatccagcc tccgcggccg ggaacggtgc attggaacgc ggattccccg tgccaagagt 6780  
 gacgtaagta cgcctatag agtctatagg cccaccocct tggcttctta tgcagtctat 6840  
 actgtttttg gcttggggtc tatacacccc cgttctctca tgttataggt gatggtatag 6900  
 cttagcctat aggtgtgggt tattgacctt tattgaccac tcccctattg gtgacgatac 6960  
 tttccattac taatccataa catggctctt tgccacaact ctctttattg gctatatgcc 7020  
 aatacactgt cttcagaga ctgacacgga ctctgtatct ttacaggatg gggctctcatt 7080  
 tattatctac aaattccat atacaacacc accgtcccca gtgcccgcag tttttattaa 7140  
 acataacgtg ggatctccac gcgaatctcg ggtacgtgtt ccggacatgg tctctctcc 7200  
 ggtagcggcg gagctctac atccgagccc tgctcccatg cctccagcga ctcatggtcg 7260  
 ctoggcagct ccttgcctcc aacagtggag gccagactta ggcacagcac gatgccacc 7320  
 accaccagtg tgccgcacaa ggccgtggcg gtagggatag tgtctgaaaa tgagctcggg 7380

gagcgggctt gcaccgctga cgcatttga agacttaagg cagcggcaga agaagatgca 7440  
 ggcagctgag ttgttggtt ctgataagag tcagaggtaa ctcccgttgc ggtgctgtta 7500  
 acggtgagg gcagtgtagt ctgagcagta ctcgttgtg cgcgcgcgc caccagacat 7560  
 aatagctgac agactaacag actgttctt tccatgggtc tttctgcag tcaccgtcct 7620  
 tgacacg 7627

<210> 24  
 <211> 2669  
 <212> ДНК  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>  
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ

<400> 24  
 agcctaggcc tccaaaaaag cctcctcact acttctgga tagctcagag gcagaggcgg 60  
 cctcggcctc tgcataaata aaaaaatta gtcagccatg gggcggagaa tggcgggaac 120  
 tggcgggagt tagggcggg atggcgggag ttagggcgg gactatggtt gctgactaat 180  
 tgagatgcat gctttgcata cttctgctg ctggggagcc tggggacttt ccacacctgg 240  
 ttgctgacta attgagatgc atgctttgca tacttctgcc tgctggggag cctggggact 300  
 ttccacaccg gatccaccat gggttcagct attgagcagg atgggttcca tegtggtagt 360  
 cccgcgcgat gggtcgaacg actgtttga tacgattggg cccaacagac tataggctgt 420  
 tccgacgtg ctgtctttcg tctttctgca caaggctgct cagttctggt cgtgaaaacc 480  
 gacttgtccg gagccctcaa tgagttgcaa gacgaagctg cacgactgag ttggcttgcc 540  
 accactggtg tcccatgtgc cgcagtactt gacgtcgtca cagaggctgg tcgcgattgg 600  
 ttgctccttg gagaagtgcc cggccaagat cttctcagtt ccacacttgc cctgcccga 660  
 aaagttcaa taatggctga cgtatgaga aggctgcaca cccttgacc tgccacatgt 720  
 ccattcgatc accaagccaa acaccgaatt gaacgagcta gaaccgcat ggaagccggc 780  
 ctogttgatc aagacgattt ggatgaggaa caccagggtc tcgcaccgc tgaactcttc 840  
 gctcgcctca aagcacgaat gccagacgga gatgacttgg tcgtaacca cggagatgcc 900  
 tgcttctcta acataatggt agagaatgga agatttagcg gcttcattga ttgtggacga 960  
 cttggagttg cagatcggta ccaagatctc gctctcgcta ccagagatat tgctgaagaa 1020  
 ttggcgggag aatgggtga tcggtttctc gtactctacg gaattgccc acctgattcc 1080  
 caacgcattg ctttttaccg tcttctggat gagttcttct aaacgcgtcc cccctctccc 1140

tcccccccc	ctaacgttac	tggccgaagc	cgcttgaat	aaggccggtg	tgcgtttgtc	1200
tatatgttat	tttccaccat	attgccgtct	tttggcaatg	tgagggcccg	gaaacctggc	1260
cctgtcttct	tgacgagcat	tcctaggggt	cttcccctc	tcgccaagg	aatgcaaggt	1320
ctgttgaatg	tcgtgaagga	agcagttcct	ctggaagctt	cttgaagaca	aacaacgtct	1380
gtagcgacc	tttgcaggca	gcggaacccc	ccacctggcg	acaggtgcct	ctgcggccaa	1440
aagccacgtg	tataagatac	acctgcaaag	gcggcacaac	cccagtgcca	cgttgtgagt	1500
tggatagttg	tggaaagagt	caaatggctc	tcctcaagcg	tattcaacaa	ggggctgaag	1560
gatgccaga	aggtacocca	ttgtatggga	tctgatctgg	ggcctcggtg	cacatgcttt	1620
acatgtgttt	agtcgaggtt	aaaaaacgtc	taggcccccc	gaaccacggg	gacgtgtgtt	1680
tcctttgaaa	aacacgattg	ctcgaatcac	catggtgagc	aagggcgagg	agctgttcac	1740
cggggtggtg	cccacctcgtg	tcgagctgga	cgcgacgta	aacggccaca	agttcagcgt	1800
gtccggcgag	ggcgagggcg	atgccaccta	cgccaagctg	accctgaagt	tcctctgcac	1860
caccggcaag	ctgcccgtgc	cctggcccac	cctcgtgacc	accttcggtc	acggcctgca	1920
gtgcttcgcc	cgtacccccg	accacatgaa	gcagcacgac	ttcttcaagt	ccgcoatgcc	1980
cgaaggctac	gtccaggagc	gcaccatctt	cttcaaggac	gacggcaact	acaagaccgg	2040
cgccgaggtg	aagttcgagg	gcgacaccct	ggtgaaccgc	atcgagctga	agggcatcga	2100
cttcaaggag	gacggcaaca	tctggggca	caagctggag	tacaactaca	acagccacaa	2160
cgtctatata	atggccgaca	agcagaagaa	cggcatcaag	gtgaacttca	agatccgcca	2220
caacatcgag	gacggcagcg	tcgagctcgc	cgaccactac	cagcagaaca	cccccatcgg	2280
cgacggcccc	gtgctgctgc	ccgacaacca	ctacctgagc	taccagtccg	ccctgagcaa	2340
agaccccaac	gagaagcgcg	atcacatggt	cctgctggag	ttcgtgaccg	ccgccgggat	2400
cactctcggc	atggacgagc	tgtacaagta	atcggccgct	aatcagccat	accacatttg	2460
tagaggtttt	acttgcttta	aaaaacctcc	cacacctccc	cctgaacctg	aaacataaaa	2520
tgaatgcaat	tgttgttgtt	aacttgttta	ttgcagctta	taatggttac	aaataaagca	2580
atagcatcac	aaatttcaca	aataaagcat	ttttttcact	gcattctagt	tgtggtttgt	2640
ccaaactcat	caatgtatct	tatcatgtc				2669

<210> 25  
 <211> 3003  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; СИНТЕТИЧЕСКАЯ

&lt;400&gt; 25

gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacgggggtca ttagttcata	60
gcccataat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc	120
ccaacgacc cgcgccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag	180
ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgccac ttggcagtac	240
atcaagtgt tcatatgcca agtacgccc ctattgaagt caatgacggt aaatggcccg	300
cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg	360
tattagtcac cgtattacc atgggtgatgc ggttttggca gtacatcaat ggcggtggat	420
agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt	480
tttggcacca aaatcaacg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc	540
aaatgggocg taggcgtgta cgggtggagg tctatataag cagagctctc cctatcagt	600
atagagatct cctatcagt gatagagatc gtcgacgttt agtgaaccgt cagatcgct	660
ggagacgcca tccacgctgt tttgacctcc atagaagaca cggggaccga tccagctcc	720
gcggccggga acggtgcatt ggaacgcgga tccccgtgc caagagtgc gtaagtaccg	780
cctatagagt ctataggccc acccccttgg cttcttatgc atgctatact gtttttggct	840
tgggtctat acaccccgcc ttcctcatgt tataggtgat ggtatagctt agcctatagg	900
tgtgggttat tgaccattat tgaccactcc cctattggtg acgatacttt ccattactaa	960
tccataacat ggtcttttgc cacaaactctc tttattggct atatgccaat aactgtcct	1020
tcagagactg acacggactc tgtattttta caggatgggg tctcatttat tatttaciaa	1080
ttcacatata caacaccacc gtccccagt cccgcagttt ttattaaaca taacgtggga	1140
tctccacgcg aatctcgggt acgtgttccg gacatggtct cttctccggt agcggcggag	1200
cttctacatc cgagccctgc tcccatgcct ccagcgactc atggctgctc ggcagctcct	1260
tgctcctaac agtggaggcc agacttaggc acagcacgat gcccaccacc accagtgtgc	1320
cgcaacaaggc cgtggcggta gggatgtgt ctgaaaatga gctcggggag cgggcttgca	1380
ccgctgacgc atttggaaga cttaaggcag cggcagaaga agatgcaggc agctgagttg	1440
ttgtgttctg ataagagtca gaggtaactc ccgttgccgt gctgttaacg gtggagggca	1500
gtgtagtctg agcagtactc gttgctgccg cgcgcgccac cagacataat agctgacaga	1560
ctaacagact gttcctttcc atgggtcttt tctgcagtca ccgtccttga cacgaagctt	1620

atactcgagc tctagattgg gaacccgggt ctctcgaatt cgagatctcc accatgcaca 1680  
 gacctagacg tegtggaact cgtccacctc cactggcaact gctcgtctgt ctctcctctg 1740  
 ctgcacgtgg tctgtatgca caagtacaac tgcaacaaag cggagctgaa ctggccaac 1800  
 caggcgcttc cgtgaagatg tcttgtaaag ccagcgggta tacatttact aattactgga 1860  
 ttcactggga gaagcaaaga cctgaacagg gattggaatg gattggatac attaactcta 1920  
 acaccggaca cacagagtat aatcaaaaat tcaaggataa ggccacctc acagccgaca 1980  
 gatcttcttc aaccgcctat atgcaacttt ctccctcac ttctgaagac tccgcagttt 2040  
 acttttgccg acgaacttat tctggaagct cccatttoga ctactggggt caaggaacaa 2100  
 cactgatcgt gtctagcggc gccggagggt ccggcggggg cggtagcggg gccggagggt 2160  
 ctgatattgt catgactcaa acacctgtct ctctgctgt ttcacttggga gatcaagcta 2220  
 gcatttctctg ccgctctagt caatctctcg tccacaacaa cggcgatact ttcttgcat 2280  
 ggtatctgca gaaaccaggc cagtcaccta aactgcttat atacaaagtc tctaatagat 2340  
 tctcaggggt gccagatcga ttcagtgggt ctgggtccgg tacagatttt aactcaaga 2400  
 tatccagagt agaagcagaa gatctggcg tgtatttctg cagtcaaaca acacttattc 2460  
 ctcgtacttt tggaggcggg acaaaaactgg agatcaagcg tggaggcggg gggagtgttt 2520  
 tgttttatct gcccgttggg ataatgttc tcgtaaatac agtactttgg gtaacaataa 2580  
 ggaaggaact gaagagaaag aaaaaatggg atctggaat atcattggac agtggacacg 2640  
 aaaaaaagt cacatcatca ttgcaagaag accggcactt ggaggaggaa ctgaaatgtc 2700  
 aagagcaaaa agaagaacaa ctgcaagaag gcgtacatag aaaagaacca cagggagcaa 2760  
 cataggcggc cgctaatacag ccataccaca tttgtagagg ttttacttgc tttaaaaac 2820  
 ctcccacacc tccccctgaa cctgaaacat aaaatgaatg caattgttgt tgtaacttg 2880  
 tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt cacaaataa 2940  
 gcattttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt atcttatcat 3000  
 gtc 3003

<210> 26  
 <211> 208  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens

<400> 26

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 1 5 10 15

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro  
20 25 30

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

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
50 55 60

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
65 70 75 80

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

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
100 105 110

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
115 120 125

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
130 135 140

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
145 150 155 160

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

Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
180 185 190

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
195 200 205

<210> 27

<211> 8

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 27

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp

1 5

<210> 28  
 <211> 8  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens

<400> 28

Ile Asn Pro Asn Thr Gly His Thr  
 1 5

<210> 29  
 <211> 13  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens

<400> 29

Cys Ala Arg Thr Tyr Ser Gly Ser Ser His Phe Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 30  
 <211> 10  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens

<400> 30

Ser Leu Val His Asn Asn Gly Asp Thr Phe  
 1 5 10

<210> 31  
 <211> 9  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens

<400> 31

Ser Gln Thr Thr Leu Ile Pro Arg Thr  
 1 5

<210> 32  
 <211> 8  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens

<400> 32

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala Trp  
 1 5

<210> 33  
 <211> 10  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens

<400> 33

Ile Leu Ser Lys Thr Asp Gly Gly Thr Thr  
 1 5 10

<210> 34  
 <211> 13  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens

<400> 34

Thr Thr Ala Asp Phe Trp Ser Ala Tyr Ser Ser Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 35  
 <211> 4  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens

<400> 35

Gln Ser Leu Leu  
 1

<210> 36  
 <211> 7  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens

<400> 36

His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr  
 1 5

<210> 37  
 <211> 9  
 <212> Белок  
 <213> Homo sapiens

<400> 37

Met Gln Gly Leu Gln Thr Pro Tyr Thr  
 1 5

<210> 38  
 <211> 122  
 <212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 38

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

Ser His Arg Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala  
20 25 30

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

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

Pro Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Met  
65 70 75 80

Leu Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Ile Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95

Phe Cys Thr Thr Ala Asp Phe Trp Ser Ala Tyr Ser Ser Asp Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 39

<211> 112

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 39

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

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

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

Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly  
85 90 95

Leu Gln Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

<210> 40

<211> 452

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 40

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

Ser His Arg Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala  
20 25 30

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

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

Pro Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Met  
65 70 75 80

Leu Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Ile Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
85 90 95

Phe Cys Thr Thr Ala Asp Phe Trp Ser Ala Tyr Ser Ser Asp Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro  
115 120 125

Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser  
130 135 140

Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr  
145 150 155 160

Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro  
 165 170 175

Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val  
 180 185 190

Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His  
 195 200 205

Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro  
 210 215 220

Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu  
 225 230 235 240

Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu  
 245 250 255

Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser  
 260 265 270

Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu  
 275 280 285

Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr  
 290 295 300

Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser  
 305 310 315 320

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro  
 325 330 335

Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln  
 340 345 350

Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val  
 355 360 365

Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val  
 370 375 380

Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu  
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg  
405 410 415

Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val  
420 425 430

Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg  
435 440 445

Thr Pro Gly Lys  
450

<210> 41  
<211> 219  
<212> Белок  
<213> Homo sapiens

<400> 41

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

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

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

Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly  
85 90 95

Leu Gln Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
115 120 125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe  
 130 135 140

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg  
 145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 165 170 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu  
 180 185 190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser  
 195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210 215

<210> 42

<211> 256

<212> Белок

<213> Homo sapiens

<400> 42

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser  
 1 5 10 15

Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Gly Pro Gly Asp Lys Thr  
 20 25 30

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 35 40 45

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 50 55 60

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 65 70 75 80

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 85 90 95

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 100 105 110

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
115 120 125

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
130 135 140

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
145 150 155 160

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
165 170 175

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
180 185 190

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp  
195 200 205

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
210 215 220

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
225 230 235 240

Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
245 250 255

<210> 43

<211> 336

<212> Белок

<213> искусственная последовательность

<220>

<223> синтетический

<400> 43

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

Ser His Arg Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala  
20 25 30

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

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

Pro Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Met  
 65 70 75 80

Leu Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Lys Ile Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
 85 90 95

Phe Cys Thr Thr Ala Asp Phe Trp Ser Ala Tyr Ser Ser Asp Tyr Trp  
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser  
 130 135 140

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

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp  
 165 170 175

Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu  
 180 185 190

Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
 195 200 205

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

Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly Leu Gln Thr Pro Tyr Thr Phe  
 225 230 235 240

Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Val Leu  
 245 250 255

Phe Tyr Leu Ala Val Gly Ile Met Phe Leu Val Asn Thr Val Leu Trp  
 260 265 270

Val Thr Ile Arg Lys Glu Leu Lys Arg Lys Lys Lys Trp Asp Leu Glu  
 275 280 285

Ile Ser Leu Asp Ser Gly His Glu Lys Lys Val Thr Ser Ser Leu Gln  
 290 295 300

Glu Asp Arg His Leu Glu Glu Glu Leu Lys Cys Gln Glu Gln Lys Glu  
 305 310 315 320

Glu Gln Leu Gln Glu Gly Val His Arg Lys Glu Pro Gln Gly Ala Thr  
 325 330 335

<210> 44  
 <211> 7633  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная последовательность

<220>  
 <223> синтетическая

<400> 44  
 aagcttatac tcgagctcta gattgggaac ccgggtctct cgaattcgag atctccacca 60  
 tgcacagacc tagacgtcgt ggaactcgtc caectccact ggcactgctc gctgctctcc 120  
 tcttgctgc acgtgggtct gatgcagagg tgcagctggt ggagtctggg ggagccatag 180  
 taaagccggg ggggtcccat agagtctcct gtgaagcctc tggattcact ttcagtaacg 240  
 cctggatgag ttgggtccgc caggctccag ggagggggct ggagtgggtt ggcctgattt 300  
 taagcaagac tgatggggg acgacagact acgctgcacc cgtgaaagac agattcacca 360  
 tttcaagaga tgattctaaa aatatgttgt ttctgcaaat ggacagcctg aaaatcgagg 420  
 acacagccgt gtattttctgt accacggccg atttttggag tgettattct tctgactact 480  
 ggggccaggg aaccctggtc accgtctcct caggaggtgg aggttccggg ggcgggggt 540  
 ccggcggagg tggatcagat attgtgatga ctcagctctc actctccctg cccgtcacc 600  
 ctggagagcc ggcctccatc tctgcaggt ctagtcagag cctcctgcat agtaatgggt 660  
 acaactattt ggattggtac ctacagaagc cagggcagtc tccacaactc ctgatctatt 720  
 tgggttctaa tcgggcctcc ggggtcctc acaggttcag tggcagtgga tcaggcacag 780  
 attttact gaaaatcagc agaatggagg ctgaggatgt tggggtttat tactgcatgc 840  
 aaggtctaca aactccgtac acttttggcc aggggaccaa gctggagatc aaaggaggcg 900  
 gagggagtgt tttgttttat ctggccgttg ggataatgtt tctcgtaaat acagtacttt 960  
 ggtaacaat aaggaaggaa ctgaagagaa agaaaaatg ggatctggaa atatcattgg 1020

acagtgagaca cgaaaaaaaaa gtcacatcat cattgcaaga agaccggcac ttggaggagg	1080
aactgaaatg tcaagagcaa aaagaagaac aactgcaaga aggcgtacat agaaaagaac	1140
cacagggagc aacataggcg gccgctaatac agccatacca catttgtaga ggttttactt	1200
gctttaaaaa acctcccaca cctccccctg aacctgaaac ataaaatgaa tgcaattggt	1260
gttgtaact tgtttattgc agcttataat ggttacaat aaagcaatag catcacaat	1320
ttocaaaata aagcattttt ttcactgcat tctagttgtg gtttgtcaa actcatcaat	1380
gtatcttatac atgtctaccg gtataacttc gtataatgta tactatacga agttagccgg	1440
tagggcccct ctcttcatgt gagcaaaag ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc	1500
cgcgttgctg cgcgttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg	1560
ctcaagtcag aggtggogaa acccgacag actataaaga taccaggcgt tccccctgg	1620
aagctcccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgcgcctt accggatacc tgtccgcctt	1680
tctcccttcg ggaagcgtgg cgttttctca tagctcaagc ttaggtatc tcagttcgggt	1740
gtaggtcgtt cgtccaagc tgggctgtgt gcacgaacc cccgttcagc ccgaccgctg	1800
cgccctatcc ggtaactatc gtcttgagtc caaccggta agacacgact taccgccact	1860
ggcagcagcc actggttaaca ggattagcag agcagaggtat gtaggcggtg ctacagagtt	1920
cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaagaaca gtatttggtg tctgcgctct	1980
gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccgga aacaaaccac	2040
cgcgtgtagc ggtggttttt ttgtttcaa gcagcagatt acgcgcagaa aaaagatc	2100
tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg aaaactcacg	2160
ttaagggatt ttggtcatgg gcgcgcctca tactcctgca ggcagagat tatcaaaaag	2220
gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata	2280
tgagtaaaact tggctctgaca gttaccaatg cttaatcagt gaggcaccta tctcagcgat	2340
ctgtctattt cgttcatcca tagttgctg actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg	2400
ggagggctta ccactctggcc ccagtctgc aatgataacc cgagaccac gctcaccggc	2460
tccagattta tcagcaataa accagccagc cggaagggcc gagcgcagaa gtggtcctgc	2520
aactttatcc gctccatcc agtctattaa ttggtgcgg gaagctagag taagtagtcc	2580
gccagttaat agtttgcgca acgttggtgc cattgctaca ggcacgtgg tgcacgctc	2640
gtcgtttggt atgcttcat tcagctccgg ttcccacga tcaaggcgag ttacatgac	2700
ccccatggtg tgcaaaaaag cggttagctc cttogtct ccatcgttg tcagaagtaa	2760

gttggccgca ggtttatcac tcatggttat ggcagcactg cataattctc ttactgtcat	2820
gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg tgagtactca accaagtcac tctgagaata	2880
gtgtatgctg cgaccgagtt gctcttgccc ggcgtcaata cgggataata ctgcccaca	2940
tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag	3000
gatcttaccg ctggtgagat ccagttcgat gtaaccact cgtgcacca actgatcttc	3060
agcatctttt acttccacca gcgtttctgg gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc	3120
aaaaaggga ataaggcgca cacggaaatg ttgaatactc atactcttcc tttttcaata	3180
ttattgaagc atttaccagg gttattgtct catgagcgga tacatatttg aatgtattta	3240
gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac atttcccga aaagtccac ctgacgtcag	3300
gtacacaact tcgtatagca tacattatac gaagttatgg taccaagcct aggcctccaa	3360
aaaagcctcc tcaactcttc tggaaatagct cagaggcaga ggcggcctcg gcctctgat	3420
aaataaaaa aattagtcag ccattggggc gagaatgggc ggaactgggc ggagttaggg	3480
gcgggatggg cggagttagg ggcgggacta tggttgctga ctaattgaga tgcattcttt	3540
gcatacttct gctgctggg gagcctgggg actttccaca cctggttctg gactaattga	3600
gatgcattct ttgcatactt ctgcctgctg gggagcctgg ggactttcca caccgatcc	3660
accatgggtt cagctattga gcaggatggg ttgcattctg gtagtcccgc cgcattggtc	3720
gaacgactgt ttggatacga ttgggcccac cagactatag gctgttccga cgtgctgttc	3780
ttctgtttt ctgcacaagg tcgtccagtt ctgttcgtga aaaccgactt gtccggagcc	3840
ctcaatgagt tgcaagacga agctgcacga ctgagttggc ttgccaccac tgggttccca	3900
tgtgcccag tacttgacgt cgtcacagag gctggctcgc attggttctg ccttgagaa	3960
gtgcccggcc aagatcttct cagttcccac cttgccctg cggaaaaagt ttcaataatg	4020
gctgacgcta tgagaaggct gcacaccctt gaccctgcca catgtccatt cgtaccaca	4080
gccaaacacc gaattgaacg agctagaacc cgcattggaag ccggcctcgt tgatcaagac	4140
gatttggatg aggaacacca ggtctctgca ccgctgaac tcttctctg cctcaaagca	4200
cgaatgccag acggagatga cttggctgta acccaccgag atgctgctt tctaacata	4260
atggtagaga atggaagatt tagcggcttc attgattgtg gacgacttg agttgcagat	4320
cggtagcaag atatcgtctt cgtaccaga gatattctg aagaattggg cggagaatgg	4380
gctgatcggg ttctcgtact ctaccgaatt gccgcacctg attcccacg cattgctttt	4440
taccgtcttc tggatgagtt cttctaaacg cgtccccct ctcctcccc ccccctaac	4500

gttactggcc gaagccgctt ggaataaggc cgggtgogt ttgtctatat gttatnttcc	4560
accatattgc cgtcttttg caatgtgagg gcccgaaac ctggccctgt cttcttgacg	4620
agcattccta ggggtcttcc cctctcgcc aaaggaatgc aaggtctggt gaatgtcgtg	4680
aaggaagcag ttctctgga agcttcttga agacaaaca cgtctgtagc gacccttgc	4740
aggcagcggg acccccacc tggcgacagg tgccctcgcg gccaaaagcc acgtgtataa	4800
gatacacctg caaaggcggc acaaccccag tgccacgttg tgagttgat agttgtggaa	4860
agagtcaaat ggctctctc aagcgtattc aacaaggggc tgaaggatgc ccagaaggta	4920
ccccattgta tgggatctga tctggggcct cggtgacat gctttacatg tgtttagtcg	4980
aggttaaaaa acgtctaggc cccccgaacc acggggacgt ggttttctt tgaanaaac	5040
gattgctcga atcaccatgg tgagcaaggc cgaggagctg ttcaccgggg tggtgcccat	5100
cctggtcag ctgacggcg acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg gcgaggcga	5160
gggagatgcc acctacggca agctgacct gaagttcacc tgcaaccacc gcaagctgcc	5220
cgtgccctgg cccaccctcg tgaccacctt cggctacggc ctgcagtget tgcgccgcta	5280
ccccgaccac atgaagcagc acgacttctt caagtccgcc atgccgaag gctacgtcca	5340
ggagcgcacc atcttcttca aggacgacgg caactacaag acccgcccg aggtgaagtt	5400
cgagggcgac accctggtga accgcatcga gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg	5460
caacatcctg gggcacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaaagtct atatoatggc	5520
cgacaagcag aagaacggca tcaagtgaa cttcaagatc cgcacaaca tcgaggacgg	5580
cagcgtgcag ctgcgccgacc actaccagca gaacaccccc atcgggcagc gccccgtgct	5640
gctgcccgac aaccactacc tgagctacca gtccgcccgt agcaaagacc ccaacgagaa	5700
gcgcatcac atggtcctgc tggagttcgt gacgcggccc gggatcactc tcggcatgga	5760
cgagctgtac aagtaacg cgcctaata gccataccac atttgtagag gttttacttg	5820
ctttaaaaaa cctcccacac ctcccctga acctgaaaca taaaatgaat gcaattgttg	5880
ttgttaactt gtttattgca gttataatg gttacaaata aagcaatagc atcacaatt	5940
tcacaataa agcatttttt tcaactgact ctagttgtgg tttgtccaaa ctcatcaatg	6000
tatcttatea tgcggcgcg ttgacattga ttattgacta gttattaata gtaatcaatt	6060
acggggcat tagttcatag cccatatatg gagttccgcg ttacataact tacggtaaat	6120
ggccccctg getgacggc caacgacccc cgcattga cgtcaataat gacgtatgtt	6180
cccatagtaa cgcgaatag gactttccat tgaogtcaat ggggtggagta tttacggtaa	6240

actgccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgcaa gtacgcccc tattgacgtc 6300  
 aatgacggta aatggccgc ctggcattat gcccagtaca tgacctatg ggactttcct 6360  
 acttggcagt acatctacgt attagtcac gctattacca tggatgatg gttttggcag 6420  
 tacatcaatg ggcgtggata gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct ccaccccatt 6480  
 gacgtcaatg ggagtttgtt ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa atgtcgtaac 6540  
 aactccgcc cattgacgca aatgggcggg aggcgtgtac ggtgggagg ctatataagc 6600  
 agagctctcc ctatcagtga tagagatctc cctatcagtg atagagatcg tcgacgttta 6660  
 gtgaaccgtc agatcgctg gagacgccat ccacgtggt ttgacctcca tagaagacac 6720  
 cgggaccgat ccagcctccg cggccgggaa cggatgattg gaacgcggat tcccctgccc 6780  
 aagagtgacg taagtaccgc ctatagagtc tataggccca ccccttggc ttcttatgca 6840  
 tgctatactg tttttggctt ggggtctata ccccccgct tcctcatggt ataggatgag 6900  
 gtatagctta gcctataggt gtgggttatt gaccattatt gaccactccc ctattggtga 6960  
 cgatactttc cattaactaat ccataacatg gctctttgcc acaactctct ttattggcta 7020  
 tatgccaata cactgtcctt cagagactga cacggactct gtatttttac aggatgggg 7080  
 ctcatattatt atttacaaat tcacatatac aacaccaccg tcccagtcg ccgcagtttt 7140  
 tattaacat aacgtgggat ctccacgca atctcgggta cgtgttccgg acatggtctc 7200  
 ttctcggta gcggcggagc ttctacatcc gagocctgct cccatgcctc cagcgactoa 7260  
 tggtcgctcg gcagctcctt gctoctaaca gtggaggcca gacttaggca cagcacgatg 7320  
 cccaccacca ccagtgtgcc gcacaaggcc gtggcggtag ggtatgtgtc tgaaaatgag 7380  
 ctcgggggagc gggcttgca cgtgacgca tttggaagac ttaaggcagc ggcagaagaa 7440  
 gatgcaggca gctgagttgt tgtgttctga taagagtcag aggtaactcc cgttgcggtg 7500  
 ctgttaacgc tgaggggcag tgtagtctga gcagtactcg ttgctgccgc gcgcgccacc 7560  
 agacataata gctgacagac taacagactg ttcttttoca tgggtctttt ctgcagtcac 7620  
 cgtccttgac acg 7633

<210> 45  
 <211> 1011  
 <212> ДНК  
 <213> искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> синтетическая

<400> 45  
gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggagcc atagtaaagc cgggggggtc ccatagagtc 60  
tctctggaag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgagttgggt ccgccaggct 120  
ccagggaggg ggctggagtg ggttggccgt attttaagca agactgatgg tgggacgaca 180  
gactacgctg caccctgtaa agacagattc accatttcaa gagatgattc taaaaatag 240  
ttgtttctgc aaatggacag cctgaaaatc gaggacacag ccgtgtattt ctgtaccag 300  
gocgattttt ggagtgctta ttcttctgac tactggggcc agggaaccct ggtcacccgc 360  
tctcaggag gtggagggtc cgggggcggg ggcctccggcg gaggtggatc agatattgtg 420  
atgactcagt ctccactctc cctgcccgtc acccctggag agccggcctc catctcctgc 480  
aggtctagtc agagcctcct gcatagtaat gggtaacaact atttggattg gtacctacag 540  
aagccagggc agtctccaca actcctgac tatttgggtt ctaatcgggc ctccggggtc 600  
cctgacaggt tcagtgagcag tggatcaggc acagatttta cactgaaaat cagcagaatg 660  
gaggetgagg atgttggggg ttattactgc atgcaaggtc taaaaactcc gtacactttt 720  
ggccagggga ccaagctgga gatcaaagga ggcggagggg gtgttttggg ttatctggcc 780  
gttgggataa tgtttctcgt aaatacagta ctttgggtaa caataaggaa ggaactgaag 840  
agaaagaaaa aatgggatct ggaatatca ttggacagtg gacacgaaaa aaaagtcaca 900  
tcatcattgc aagaagaccg gcacttggag gaggaactga aatgtcaaga gcaaaaagaa 960  
gaacaactgc aagaaggcgt acatagaaaa gaaccacagg gagcaacata g 1011

<210> 46  
<211> 2669  
<212> ДНК  
<213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>  
<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ

<400> 46  
agcctaggcc tccaaaaaag cctcctcact acttctggaa tagctcagag gcagaggcgg 60  
cctcggcctc tgcataaata aaaaaaatta gtcagccatg gggcggagaa tgggcggaac 120  
tgggcggagt tagggcggg atgggcggag ttagggcggg gactatggtt gctgactaat 180  
tgagatgcat gctttgcata cttctgctg ctggggagcc tggggacttt ccacacctgg 240  
ttgctgacta attgagatgc atgctttgca tacttctgcc tgcctggggag cctggggact 300  
ttccacaccg gatccaccat gggttcagct attgagcagg atgggttgc tgcctggtagt 360  
cccgccgat gggtcgaacg actgtttga tacgattggg cccaacagac tataggctgt 420

tccgacgctg ctgtctttcg tctttctgca caaggtcgtc cagttctggt cgtgaaaacc	480
gacttgcccg gagccctcaa tgagttgcaa gacgaagctg cacgactgag ttggcttgcc	540
accactggtg tcccatgtgc cgcagtactt gacgtcgtca cagaggctgg tcgcgattgg	600
ttgctccttg gagaagtgcc cggccaagat cttctcagtt cccaccttgc ccctgccgaa	660
aaagtttcaa taatggtga cgctatgaga aggctgcaca cccttgacc tgccacatgt	720
ccattcgatc accaagccaa acaccgaatt gaacgagcta gaaccgcat ggaagccggc	780
ctcgttgatc aagacgattt ggatgaggaa caccagggtc tcgcaccgcg tgaactcttc	840
gctcgcctca aagcacgaat gccagacgga gatgaacttg tcgtaacca cggagatgcc	900
tgcttctcta acataatgg agagaatgga agatthagcg gcttcattga ttgtggacga	960
cttgagttg cagatcggta ccaagatc gctctcgtca ccagagatat tgctgaagaa	1020
ttggcgggag aatgggctga tcggtttctc gtactctacg gaattgccgc acctgattcc	1080
caacgcattg ctttttaccg tcttctggat gagttctctt aaacgcgtcc cccctctccc	1140
tcccccccc ctaacgttac tggccgaagc cgcttggaat aaggccggtg tgcgtttgtc	1200
tatatgttat tttccaccat attgccgtct tttggcaatg tgagggcccg gaaacctggc	1260
ccgtctctct tgacgagcat tctaggggt ctttcccctc tcgcccagg aatgcaaggt	1320
ctggtgaatg tcgtgaagga agcagttcct ctggaagctt cttgaagaca aacaacgtct	1380
gtagcgacce tttgcaggca gcggaacccc ccaoctggcg acaggtgect ctgcggccaa	1440
aagccacgtg tataagatac acctgcaaag gcggcacaac cccagtgcc cgttgtagt	1500
tggatagttg tggaaagagt caaatggctc tcctcaagcg tattcaacaa ggggctgaag	1560
gatgccaga aggtacocca ttgtatggga tctgatctgg ggcctcggtg cacatgcttt	1620
acatgtgttt agtcgaggtt aaaaaacgtc taggcccccc gaaccacggg gacgtggttt	1680
tcctttgaaa aacacgattg ctogaatcac catggtgagc aagggcgagg agctgttcac	1740
cggggtggtg cccatcctgg tcgagctgga cggcgacgta aacggccaca agttcagcgt	1800
gtccggcgag ggcgagggcg atgccacctc cggcaagctg accctgaagt tcctctgcac	1860
caccggcaag ctgccctg cctggcccac cctogtgacc accttcgget acggcctgca	1920
gtgcttogcc cgtaacccc accacatgaa gcagcacgac ttcttcaagt ccgccatgcc	1980
cgaaggctac gtccaggagc gcaccatctt cttcaaggac gacggcaact acaagaccg	2040
cgccgaggtg aagttcgagg gcgacacct ggtgaaccgc atcgagctga agggcatcga	2100
cttcaaggag gacggcaaca tctggggca caagctggag tacaactaca acagccaaa	2160

cgtctatatac atggccgaca agcagaagaa cggcatcaag gtgaacttca agatocgcca 2220  
 caacatogag gacggcagcg tgcagctcgc cgaccactac cagcagaaca ccccatcgg 2280  
 cgacggcccc gtgctgctgc ccgacaacca ctacctgagc taccagtccg ccctgagcaa 2340  
 agaccccaac gagaagcgcg atcacatggt cctgctggag ttcgtgaccg ccgcccggat 2400  
 cactctcggc atggacgagc tgtacaagta atcggccgct aatcagccat accacatttg 2460  
 tagaggtttt acttgcttta aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa 2520  
 tgaatgcaat tgttgttgtt aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca 2580  
 atagatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttcaact gcattctagt tgtggtttgt 2640  
 ccaaaactcat caatgtatct tatcatgtc 2669

<210> 47  
 <211> 2992  
 <212> ДНК  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>  
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ

<400> 47  
 gttgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacggggcca ttagttcata 60  
 gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc 120  
 ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgaogtatgt tcccatagta acgcoaatag 180  
 ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac 240  
 atcaagtgta tcatatgcc agtacgcccc ctattgacgt caatgacggg aaatggcccg 300  
 cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctaag 360  
 tattagtcat cgtattacc atggtgatgc ggttttgcca gtacatcaat gggcgtggat 420  
 agcggtttga ctcacgggga ttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt 480  
 tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc 540  
 aaatgggccc taggcgtgta cggtgggagg tctatataag cagagctctc cctatcagtg 600  
 atagagatct ccctatcagt gatagagatc gtcgacgttt agtgaaccgt cagatcgctt 660  
 ggagacgcca tccacgctgt tttgacctcc atagaagaca ccgggaccga tccagcctcc 720  
 gcggccggga acggtgcatt ggaacgcgga ttccccgtgc caagagtgac gtaagtaccg 780  
 cctatagagt ctatagggcc acccccctgg cttcttatgc atgctatact gtttttggct 840  
 tgggtctat acaccccccg ttctcatgt tataggtgat ggtatagctt agcctatagg 900

tgtgggttat tgaccattat tgaccactcc cctattggtg acgatacttt ccattactaa	960
tcataaacaat ggctctttgc cacaactctc tttattggct atatgccaat aactgtcct	1020
tcagagactg acacggactc tgtattttta caggatgggg tctcatttat tatttacaaa	1080
ttcacatata caacaccacc gtccccagtg cccgcagttt ttattaaaca taacgtggga	1140
tctccacgcg aatctcgggt acgtgttccg gacatggtct cttctccggt agcggcggag	1200
cttctacatc cgagccctgc tcccatgcct ccagcactc atggtcgcctc ggcagctcct	1260
tgctcctaac agtggaggcc agacttaggc acagcacgat gccaccacc accagtgtgc	1320
cgacaaggc cgtggcggta gggtatgtgt ctgaaaatga gctcggggag cgggcttgca	1380
ccgctgacgc atttgaaga ctaaggcag cggcagaaga agatgcaggc agctgagttg	1440
ttgtgttctg ataagagtca gaggtaactc ccgttgcggt gctgttaacg gtggagggca	1500
gtgtagtctg agcagtactc gttgctgccg cgcgcgccac cagacataat agctgacaga	1560
ctaacagact gttcctttcc atgggtcttt tctgcagaag cttatactcg agctctagat	1620
tgggaaccog ggtctctcga attcgagatc tccaccatgc acagacctag acgtcgtgga	1680
actcgtcac ctcactggc actgctcgcct gctctcctcc tggctgcacg tgggtcgtgat	1740
gcagaggtgc agctgggtga gctcggggga gccatagtaa agcggggggg gteccataga	1800
gtctcctgtg aagcctctgg attcactttc agtaacgcct ggatgagttg ggtccgccag	1860
gctccaggga gggggctgga gtgggtggc cgtattttta gcaagactga tgggtggagc	1920
acagactacg ctgcaccctg gaaagacaga ttaccattt caagagatga ttctaaaaat	1980
atgttgtttc tgcaaatgga cagcctgaaa atcgaggaca cagccgtgta tttctgtacc	2040
acggccgatt tttggagtgc ttattcttct gactactggg gccagggaac cctggtcacc	2100
gtctcctcag gaggtggagg ttccgggggc gggggctccg gcggaggtgg atcagatatt	2160
gtgatgactc agtctccact ctcctgcc cgtaccctcg gagagccggc ctccatctcc	2220
tgcaggtcta gtcagagcct cctgcatagt aatgggtaca actatttggg ttggtaceta	2280
cagaagccag ggcagctctc acaactcctg atctatttgg gttctaatcg ggctccggg	2340
gtccctgaca ggttcagtgg cagtggatca ggcacagatt ttactgaa aatcagcaga	2400
atggaggctg aggatgttg ggtttattac tgcattgcaag gctctacaaac tccgtacact	2460
tttgccagc ggaccaagct ggagatcaaa ggaggcggag ggagtgttt gttttatctg	2520
gccgttggga taatgtttct cgtaaataca gtactttggg taacaataag gaaggaactg	2580
aagagaaaga aaaaatggga tctggaata tcattggaca gtggacacga aaaaaagtc	2640

acatcatcat tgcaagaaga ccggcacttg gaggaggaac tgaaatgtca agagcaaaaa 2700  
 gaagaacaac tgcaagaag cgtacataga aaagaaccac agggagcaac ataggcggcc 2760  
 gctaatacgc cataccacat ttgtagaggt tttacttgct ttaaaaaacc tcccacacct 2820  
 ccccctgaac ctgaaacata aaatgaatgc aattgttggt gttaacttgt ttattgcagc 2880  
 ttataatggt tacaataaaa gcaatagcat cacaaatttc acaataaag catttttttc 2940  
 actgcattct agttgtggtt tgtocaaact catcaatgta tcttatcatg tc 2992

<210> 48  
 <211> 5765  
 <212> ДНК  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>  
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ

<400> 48  
 acaacttcgt atagcataca ttatacgaag ttatggtacc aagcctaggc ctccaaaaaa 60  
 gcctcctcac tacttctgga atagctcaga ggcagaggcg gcctcggcct ctgcataaat 120  
 aaaaaaaatt agtcagccat ggggocgaga atgggocgaa ctgggocgag ttaggggcgg 180  
 gatgggocga gttaggggcg ggactatggt tgetgactaa ttgagatgca tgettgtcat 240  
 acttctgcct gctggggagc ctggggactt tccacacctg gttgetgact aattgagatg 300  
 catgetttgc atacttotgc ctgctgggga gcctggggac tttccacacc ggatocacca 360  
 tgggttcagc tattgagcag gatgggttgc atgctggtag tcccgcgca tgggtcgaac 420  
 gactgttttg atacgattgg gcccaacaga ctataggctg tcccgacgct gctgtctttc 480  
 gtctttctgc acaaggctgt ccagttctgt tcgtgaaaac cgacttgtec ggagocctca 540  
 atgagttgca agacgaagct gcacgactga gttggcttgc caccactggt gtcccatgtg 600  
 ccgcagtact tgacgtogtc acagaggctg gtcgcgattg gttgctcctt ggagaagtgc 660  
 ccggccaaga tcttctcagt tcccacctg cccctgcga aaaagtttca ataatggtg 720  
 acgctatgag aaggctgcac acccttgacc ctgccacatg tccattogat caccaagcca 780  
 aacaccgaat tgaacgagct agaaccgca tggaagccgg cctcgttgat caagacgatt 840  
 tggatgagga acaccagggt ctgcacccg ctgaactctt cgtcgcctc aaagcacgaa 900  
 tgccagacgg agatgacttg gtcgtaacct acggagatgc ctgccttctt aacataatgg 960  
 tagagaatgg aagatttgcg ggttcattg attgtggacg acttggagtt gcagatcggg 1020  
 accaagatat cgtctctgct accagagata ttgctgaaga attgggocga gaatgggctg 1080

atcggtttct cgtactotac ggaattgccg cacctgattc ccaacgcatt gctttttacc	1140
gttttctgga tgagttottc taaacgcgtc cccctctcc cccccccc cctaacgtta	1200
ctggccgaag ccgcttgaa taaggccggt gtgcgtttgt ctatatgta tttccacca	1260
tattgccgtc ttttgcaat gtgagggccc gaaacctgg cctgtcttc ttgacgagca	1320
ttcctagggg tctttcccct ctgccaaaag gaatgcaagg tctgttgaat gtcgtgaagg	1380
aagcagttcc tctggaagct tcttgaagac aaacaacgtc tgtagcgacc ctttcaggc	1440
agcggaaacc cccacctggc gacaggtgcc tctgcggcca aaagccacgt gtataagata	1500
cacctgcaa ggcggcaca cccagtgcc acgttgtag ttgatagtt gtgaaagag	1560
tcaaatggct ctctcaagc gtattcaaca aggggtgaa ggatgccag aaggtacccc	1620
attgtatggg atctgatctg gggcctcggg gcacatgctt tacatgtgt tagtcgaggt	1680
taaaaaacgt ctaggcccc cgaaccacgg ggacgtggtt ttcctttgaa aaacacgatt	1740
gctcgaatca ccatggtgag caagggcgag gagctgttca ccggggtggt gcccatctg	1800
gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg tgtccgcga gggcgagggc	1860
gatgccacct acggcaagct gaccctgaag ttcattctgca ccaccgcaa gctgcccggtg	1920
ccctggccca cctctgtgac caccttcggc tacggcctgc agtgcctcgc ccgctacccc	1980
gaccacatga agcagcacga cttcttcaag tcggccatgc ccgaaggcta cgtccaggag	2040
cgcaccatct tcttcaagga cgaagcaac tacaagaacc gcgcgaggt gaagtctgag	2100
ggcgacaccc tgggaaccg catcgagctg aaggcatcg acttcaagga ggacggcaac	2160
atcctggggc acaagctgga gtacaactac aacagccaca acgtctatat catggccgac	2220
aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc aagatccgcc acaacatcga ggacggcagc	2280
gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac accccatcg gcgacggccc cgtgctgctg	2340
cccgacaacc actacctgag ctaccagtcc gccctgagca aagacccaa cgagaagegc	2400
gatcaatggt tctgctgga gttcgtgacc gccgcggga tctctctcg catggacgag	2460
ctgtacaagt aatcgccgc taatcagcca taccacattt gtagaggttt taettgcttt	2520
aaaaaacctc ccacacctc cctgaacct gaaacataaa atgaatgcaa ttgtgtgtgt	2580
taactgtttt attgcagctt ataatggtta caaataaagc aatagcatca caaatttcac	2640
aaataaagca tttttttcac tgcattctag ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc	2700
ttatcatgtc ggcgcttga cattgattat tgactagtta ttaatagtaa tcaattacgg	2760
ggtcattagt tcatagocca tatatggagt tccgcgttac ataacttac gtaaatggcc	2820

cgcttgctg acgcccac gaccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca	2880
tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtoaatgggt ggagtattta cggtaaacg	2940
cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg	3000
acggtaaatg gcccgctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac tttcctaact	3060
ggcagtacat ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggt gatgcggttt tggcagtaca	3120
tcaatgggag tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac ccattgacg	3180
tcaatgggag tttgttttg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact	3240
cgccccatt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat ataagcagag	3300
ctctccctat cagtgataga gatctcccta tcagtgatag agatcgtcga cgtttagtga	3360
accgtcagat cgctggaga cgccatccac gctgttttga cctccataga agacaccggg	3420
accgatccag cctccgctgc cgggaacggt gcattggaac gcggtattccc cgtgccaaga	3480
gtgacgtaag taccgcctat agagtctata ggcccacccc cttggcttct tatgcatgct	3540
atactgtttt tggcttggg tctatacacc ccgcttctct catgttatag gtgatggtat	3600
agcttagcct atagggtggt gttattgacc attattgacc actcccctat tggtgacgat	3660
actttccatt actaatccat aacatggctc tttgccacaa ctctctttat tggctatatg	3720
ccaatacact gtcttccaga gactgacacg gactctgtat ttttacagga tggggtctca	3780
tttattattht acaaatccac atatacaaca ccaocgtccc cagtgccgcg agtttttatt	3840
aaacataacg tgggatctcc acgcgaatct cgggtacgtg ttccggacat ggtctcttct	3900
cgggtagcgg cggagcttct acatccgagc cctgctccca tgctccagc gactcatggt	3960
cgctcggcag ctcttctgct ctaacagtgg aggccagact taggcacagc acgatgccc	4020
ccaccaccag tgtgccgcac aaggccgtgg cggtagggta tgtgtctgaa aatgagctcg	4080
gggagcgggc ttgcacogct gacgcatttg gaagacttaa ggcagcggca gaagaagatg	4140
caggcagctg agttgtgtg ttctgataag agtcagaggt aactcccgtt gcggtgctgt	4200
taacggtgga gggcagtgta gtctgacgag tactcgttgc tgccgcgcgc gccaccagac	4260
ataatagctg acagactaac agactgttcc ttccatggg tcttttctgc agtcaccgtc	4320
cttgacacga agcttatact cgagctctag attgggaacc cgggtctctc gaattcgaga	4380
tctccaccat gcacagacct agacgtcgtg gaactcgtcc acctccactg gactgctcg	4440
ctgctctct cctggctgca cgtggtgctg atgcagaggt gcagctgggt gagtctgggg	4500
gagccatagt aaagccgggg ggtcccata gactctctct tgaagcctct ggattcactt	4560

tcagtaacgc ctggatgagt tgggtccgcc aggetccagg gagggggctg gagtgggttg 4620  
 gccgtatfff aagcaagact gatgggtgga cgacagacta cgctgcaccc gtgaaagaca 4680  
 gattcaccat ttcaagagat gattctaaaa atatggtggt tctgcaaatg gacagcctga 4740  
 aaatcgagga cacagcogtg tttttctgta ccacggcoga tttttggagt gcttattctt 4800  
 ctgactactg gggccagga accctggta cgtctctctc aggaggtgga ggttccgggg 4860  
 gcgggggctc cggcggaggt ggatcagata ttgtgatgac tcagtctcca ctctccctgc 4920  
 ccgtcaccce tggagagcog gctccatct cctgcaggtc tagtcagagc ctctgcata 4980  
 gtaatgggta caactatffg gattggtacc tacagaagcc agggcagtct ccacaactcc 5040  
 tgatctatff gggttctaaf cgggcctccg gggccctga caggttcagt ggcagtggt 5100  
 caggcacaga ttttactctg aaaatcagca gaatggagcc tgaggatggt ggggtttatt 5160  
 actgcatgca aggtctacaa actccgtaca cttttggcca ggggaccaag ctggagatca 5220  
 aaggagcogc agggagtgtt ttgtttatc tggccttgg gataatgfff ctctaaata 5280  
 cagtactffg gtaacaata aggaaggaac tgaagagaaa gaaaaaatgg gatctggaaa 5340  
 tatcattgga cagtggacac gaaaaaaaaag tcacatcctc attgcaagaa gaccggcact 5400  
 tggagagga actgaaatgt caagagcaaa aagaagaaca actgcaagaa ggcgtacata 5460  
 gaaaaaacc acagggagca acataggcgg ccgctaata gccataccac atffgtagag 5520  
 gttttactct ctttaaaaaa cctcccacac ctcccctga acctgaaaca taaaaatgaa 5580  
 gcaatgffg ttgttaactt gtttatgca gcttataatg gttacaata aagcaatagc 5640  
 atcacaaatt tcacaaataa agcattffff tcaactgact ctagtffgg tffgtccaaa 5700  
 ctcatcaatg tatcttatca tgtctaccgg tataactctg tataatgtat actatacгаа 5760  
 gttag 5765

<210> 49  
 <211> 660  
 <212> ДНК  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>  
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ

<400> 49  
 gacatcgtga tgaccagtc tccactctcc ctgccctca ccctggaga gccggcctcc 60  
 atctctgca ggtctagtca gagcctctg catagtaatg ggtacaacta tffggattgg 120  
 tacctacaga agccagggca gtctccaaa ctctgatct atffgggttc taatcgggcc 180

tccggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggca cagattttac actgaaaatc 240  
 agcagaatgg aggctgagga tgttgggggtt tattactgca tgcaaggctc acaaaactccg 300  
 tacacttttg gccaggggac caagctggag atcaaacgag ctgatgctgc accaactgta 360  
 tccatcttcc caccatccag tgagcagtta acatctggag gtgcctcagt cgtgtgcttc 420  
 ttgaacaact tctaccccaa agacatcaat gtcaagtga agattgatgg cagtgaacga 480  
 caaaatggcg tctgaacag ttggactgat caggacagca aagacagcac ctacagcatg 540  
 agcagcacc ctcacgttgac caaggacgag tatgaacgac ataacagcta tacctgtgag 600  
 gccactcaca agacatcaac ttcaccatt gtcaagagct tcaacagggg agagtgttga 660

<210> 50  
 <211> 1359  
 <212> ДНК  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>  
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ

<400> 50  
 gaggtgcagc tggtgagtc tgggggagcc atagtaaagc cgggggggtc ccatagagtc 60  
 tctctggaag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgagttgggt ccgccaggct 120  
 ccagggaggg ggtctggagt ggttgccgt attttaagca agactgatgg tgggacgaca 180  
 gaactacgtg caocctgaa agacagatc accatttoaa gagatgattc taaaaatag 240  
 ttgtttctgc aaatggacag cctgaaaatc gaggacacag cctgtatatt ctgtaccag 300  
 gcgatTTTTT ggagtctta ttctctgac tactggggcc agggaaccct ggtcacctgc 360  
 tctcagcca aaacaacagc cccatcggtc tatccactgg cccctgtgtg tggagataca 420  
 actggtcct cggtgactct aggatgctg gtcaagggtt attccctga gccagtgacc 480  
 ttgacctgga actctggatc cctgtccagt ggtgtgcaca cctcccagc tgtcctgcag 540  
 tetgacctct acacctcag cagctcagtg actgtaacct cgagcacctg gccagccag 600  
 tccatcacct gcaatgtgga ccacccggca agcagcacca aggtggacaa gaaaattgag 660  
 cccagagggc ccacaatcaa gcctgtcct ccatgcaaat gccagcacc taacctctg 720  
 ggtggacat cegtcttcat ctccctoca aagatcaagg atgtactcat gatctccctg 780  
 agccccatag tcacatgtgt ggtggtggat gtgagcgagg atgaccaga tgtccagatc 840  
 agctggtttg tgaacaacgt ggaagtacac acagctcaga cacaaacca tagagaggat 900  
 tacaacagta ctctccgggt ggtcagtgcc ctcccatcc agcaccagga ctggatgagt 960

ggcaaggagt tcaaatgcaa ggtcaacaac aaagacctcc cagcgcccat cgagagaacc 1020  
 atctcaaaac ccaaagggtc agtaagagct ccacaggtat atgtcttgcc tccaccagaa 1080  
 gaagagatga ctaagaaaca ggtcactctg acctgcatgg tcacagactt catgcctgaa 1140  
 gacatttacg tggagtggac caacaacggg aaaacagagc taaactacaa gaacactgaa 1200  
 ccagtcctgg actctgatgg ttcttacttc atgtacagca agctgagagt ggaagaag 1260  
 aactgggtgg aaagaaatag ctactctgt tcagtgggtc acgaggtct gcacaatcac 1320  
 cacacgacta agagcttctc ccggactccg ggtaaataga 1359

<210> 51  
 <211> 1011  
 <212> ДНК  
 <213> ИСКУССТВЕННАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ

<220>  
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ

<400> 51  
 gaggtgcagc tgggtggagt cgggggagcc atagtaaagc cgggggggtc ccatagagtc 60  
 tctctgtaag cctctggatt cactttcagt aacgcctgga tgagttgggt ccgccaggct 120  
 ccagggaggg ggctggagtg ggttgccgt attttaagca agactgatgg tgggacgaca 180  
 gactacgctg caccogtgaa agacagattc accatttcaa gagatgattc taaaaatatg 240  
 ttgtttctgc aaatggacag cctgaaaatc gaggacacag ccgtgtattt ctgtaccacg 300  
 gccgattttt ggagtgctta ttctctgac tactggggcc agggaacct ggtcacccgtc 360  
 tctcaggag gtggagggtc cgggggcggg ggctccggcg gaggtggatc agatattgtg 420  
 atgactcagt ctccactctc cctgccgctc acccctggag agccggctc catctcctgc 480  
 aggtctagtc agagcctcct gcatagtaat gggtaacaact atttgattg gtacctacag 540  
 aagccagggc agtctccaca actcctgac tatttgggtt ctaatcgggc ctccggggtc 600  
 cctgacaggt tcagtggcag tggatcaggc acagatttta cactgaaaat cagcagaatg 660  
 gaggtgagg atgttgggtt ttattactgc atgcaaggtc tacaaactcc gtacactttt 720  
 ggccagggga ccaagctgga gatcaaagga ggcggagga gtgttttgtt ttatctggcc 780  
 gttgggataa tgtttctcgt aaatacagta ctttgggtaa caataaggaa ggaactgaag 840  
 agaaagaaaa aatgggatct ggaaatatca ttggacagtg gacacgaaaa aaaagtcaca 900  
 tcatcattgc aagaagaccg gcaactggag gaggaactga aatgtcaaga gcaaaaagaa 960  
 gaacaactgc aagaaggcgt acatagaaaa gaaccacagg gagcaacata g 1011

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантный антигенсвязывающий белок, который связывается с Fc-доменом IgG1 человека, Fc-доменом IgG2 человека или Fc-доменом IgG4 человека, где

рекомбинантный антигенсвязывающий белок связывается с Fc-доменом и не связывается с Fc\*-доменом, где Fc-домен содержит His95 и Tyr96, а Fc\*-домен содержит Arg95 и Phe96 в соответствии с системой нумерации экзонов IMGT, и содержит:

(i) антитело или ScFv, содержащие CDR-1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 27, HCDR-2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, HCDR-3, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, CDR-1 легкой цепи (LCDR-1), имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и LCDR-2, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, и

(ii) мембранный якорный домен.

2. Рекомбинантный антигенсвязывающий белок по п.1, где:

а) антигенсвязывающий белок содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 15, и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 16, или

б) антигенсвязывающий белок содержит HCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и LCVR, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

3. Рекомбинантный антигенсвязывающий белок по п.1 или 2, причем антигенсвязывающий белок представляет собой слитый с ScFv белок, включающий:

а) (i) вариабельный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 15, (ii) вариабельный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 16, и (iii) мембранный якорный домен, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 21; или

б) (i) вариабельный домен тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 15, (ii) вариабельный домен легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 16, и (iii) мембранный якорный домен, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 21.

4. Выделенный полинуклеотид, включающий последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует:

а) антигенсвязывающий белок по любому из пп.1-3; или

б) полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19.

5. Экспрессионный вектор в виде нуклеиновой кислоты, включающий:

(а) полинуклеотид по п.4;

(б) промотор, который функционально связан с полинуклеотидом;

(с) последовательность полиаденилирования.

6. Вектор по п.5, дополнительно включающий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей:

а) селективируемый маркер, или

б) используемый для переноса энергии белок, содержащий зеленый флуоресцентный белок или желтый флуоресцентный белок ("YFP").

7. Вектор по п.5 или 6, где:

а) промотор представляет собой промотор CMV;

б) селективируемый маркер придает устойчивость к неомицину;

с) используемым для переноса энергии белком является зеленый флуоресцентный белок или желтый флуоресцентный белок ("YFP").

8. Вектор по любому из пп.5-7, причем вектор является замкнутым в круг или линейным.

9. Клетка-хозяин, экспрессирующая антигенсвязывающий белок по любому из пп.1-3.

10. Клетка-хозяин по п.9, причем клеткой является клетка CHO.

11. Способ детектирования или выделения клетки-хозяина, которая экспрессирует гетеродимерный белок, включающий стадии:

(а) экспрессия в клетке-хозяине захватывающего белка клеточной поверхности (CSCP), содержащего антигенсвязывающий белок по любому из пп.1-3, и гетеродимерного белка,

где (i) CSCP связывается с первым сайтом в гетеродимерном белке с образованием комплекса CSCP-гетеродимерный белок внутри клетки-хозяина, (ii) комплекс CSCP-гетеродимерный белок переносится через клетку-хозяин и (iii) затем представляется на поверхности клетки-хозяина;

(б) приведение клетки-хозяина в контакт с детекторной молекулой, причем детекторная молекула связывается со вторым сайтом в гетеродимерном белке;

(с) отбор клетки-хозяина, которая связывается с детекторной молекулой, где в гетеродимерном белке:

(i) первый сайт находится в тяжелой цепи, которая имеет СНЗ-домен, содержащий остаток гистидина в положении 95 и остаток тирозина в положении 96 в соответствии с системой нумерации экзонов IMGT (Fc); и

(ii) второй сайт находится в тяжелой цепи, которая имеет СНЗ-домен, содержащий остаток аргинина в положении 95 и остаток фенилаланина в положении 96 в соответствии с системой нумерации экзонов IMGT (Fc\*).

12. Способ по п.11, включающий стадию приведения клетки-хозяина в контакт с блокирующей молекулой до отбора клетки-хозяина на стадии (с), причем блокирующая молекула связывается с CSCP, который не связан с гетеродимерным белком, но не связывается с комплексом CSCP-гетеродимерный белок.

13. Способ по п.11 или 12, причем стадию отбора (с) выполняют с помощью сортировки клеток с возбуждением флуоресценции.

14. Способ по любому из пп.11-13, причем гетеродимерный белок включает антитело, и первый сайт находится в антителе и расположен в тяжелой цепи, включающей СНЗ-домен дикого типа.

15. Способ по любому из пп.11-14, причем детекторная молекула (DM) включает:

(а) антигенсвязывающий белок, включающий переменный домен тяжелой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 38, и переменный домен легкой цепи, включающий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 39, или

(b) антигенсвязывающий белок, включающий тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 40, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO:41.

16. Способ по любому из пп.12-15, где блокирующей молекулой является нечеловеческий IgG или Fc-молекула человека.

