

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042507**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.02.21

(21) Номер заявки
201600354

(22) Дата подачи заявки
2014.11.11

(51) Int. Cl. **C12N 15/09** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(54) АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩАЯ МОЛЕКУЛА, СОДЕРЖАЩАЯ ВАРИАБЕЛЬНУЮ ОБЛАСТЬ АНТИТЕЛА

(31) **2013-232803**

(32) **2013.11.11**

(33) **JP**

(43) **2016.12.30**

(86) **PCT/JP2014/079785**

(87) **WO 2015/068847 2015.05.14**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЧУГАИ СЕИЯКУ КАБУШИКИ
КАИША (JP)**

(72) Изобретатель:
**Игава Томоюки, Кадоно Содзиро,
Хиронива Наока, Сакураи Мика (JP)**

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

(56) **JP-A-2008518023**

SCHAEFER, G., et al., A two-in-one antibody against HER3 and EGFR has superior inhibitory activity compared with monospecific antibodies, Cancer Cell, 2011, vol. 20, no. 4, p. 472-486

JP-A-2012501648

WO-A1-2012073985

JP-A-2007536912

LUTTERBUESE, R., et al., T cell-engaging BiTE antibodies specific for EGFR potentially eliminate KRAS- and BRAF-mutated colorectal cancer cells, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2010, vol. 107, no. 28, p. 12605-12610

WO-A1-1994018221

JP-A-2008526809

WO-A1-2013187495

(57) В изобретении описано создание антигенсвязывающей молекулы, содержащей вариабельную область антитела, где молекула обладает связывающей активностью с молекулой, экспрессируемой на поверхности Т-клеток, и с молекулой, экспрессируемой на поверхности другого иммунocyта, но которая не связывается с обеими молекулами одновременно. В изобретении описано также создание антигенсвязывающей молекулы, которая может предотвратить побочные эффекты, которые могут проявляться, когда сшиваются Т-клетки и другие иммунocyты, и которая обеспечивает получение антигенсвязывающей молекулы, пригодной для применения в качестве лекарственного средства.

B1**042507****042507****B1**

Область техники

В настоящем изобретении предлагается антигенсвязывающая молекула, содержащая вариабельную область антитела, которая способна связываться с двумя различными антигенами (первый антиген и второй антиген), но не связывается с этими антигенами одновременно, и вариабельную область антитела, связывающуюся с третьим антигеном, отличающимся от указанных антигенов, а также предлагается фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающую молекулу, и способ получения антигенсвязывающей молекулы.

Предпосылки создания настоящего изобретения

Антитела привлекали внимание в качестве лекарственных средств, так как обладают высокой стабильностью в плазме и оказывают незначительные отрицательные действия (Nat. Biotechnol. 23, 1073-1078 (2005) (список непатентной литературы 1) и Eur. J. Pharm. Biopharm. 59 (3), 389-396 (2005) (список непатентной литературы 2)). Антитела оказывают не только антигенсвязывающий эффект и действие агониста или антагониста, но проявляют цитотоксическую активность, опосредованную эффекторными клетками (называемую также эффекторной функцией), ADCC (антителозависимую цитотоксичность), ADCP (антителозависимый клеточный фагоцитоз) или CDC (комплементзависимую цитотоксичность). Прежде всего, антитела подкласса IgG1 проявляют эффекторные функции в отношении опухолевых клеток. Таким образом, в области онкологии было разработано множество лекарственных средств на основе антител.

Для проявления антителами активности ADCC, ADCP или CDC их Fc-области должны связываться с рецепторами антител (FcγR), которые присутствуют на эффекторных клетках (таких как природные клетки-киллеры NK или макрофаги) и с различными компонентами комплемента. Согласно опубликованным данным у человека существует семейство белков FcγR, включающее изоформы FcγRIa, FcγRIIa, FcγRIIb, FcγRIIIa и FcγRIIIb, а также их соответствующие аллотипы (Immunol. Lett. 82, 57-65 (2002) (список непатентной литературы 3)). Из этих изоформ, белки FcγRIa, FcγRIIa и FcγRIIIa в своих внутриклеточных доменах содержат домен ITAM (иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив), который преобразовывает активирующие сигналы. И наоборот, только FcγRIIb в своем внутриклеточном домене содержит домен ITIM (иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив), который преобразует ингибирующие сигналы. Известно, что все эти изоформы FcγR преобразуют сигналы за счет образования поперечных связей (то есть сшивка) с помощью иммунокомплексов или т.п. (Nat. Rev. Immunol. 8, 34-47 (2008)) (список непатентной литературы 4)). Действительно, когда антитела проявляют эффекторные функции против опухолевых клеток, молекулы FcγR на мембранах эффекторных клеток образуют кластеры за счет Fc-фрагментов множества антител, связанных с мембранами опухолевой клетки, и таким образом преобразовывают активационные сигналы через эффекторные клетки. В результате осуществляется цитотоксический эффект. В связи с этим, сшивка фрагментов FcγR ограничивается эффекторными клетками, локализованными вблизи опухолевых клеток, что свидетельствует об активации иммунной системы, локализованной на опухолевых клетках (Ann. Rev. Immunol. 6, 251-281 (1988) (список непатентной литературы 5)).

Природные иммуноглобулины связываются с антигенами с участием их вариабельных областей, и связываются с рецепторами, такими как FcγR, FcRn, FcαR и FcεR или компонентами комплемента, с участием их консервативных областей. Каждая молекула FcRn (связывающая молекула, которая взаимодействует с Fc-фрагментом IgG), связывается с каждой тяжелой цепью антитела при соединении типа один-к-одному. Следовательно, согласно литературным данным, две молекулы FcRn связываются с одной молекулой антитела типа IgG. В отличие от FcRn и т.п., FcγR взаимодействует с шарнирной областью антитела и CH2 доменами, и только одна молекула FcγR связывается с одной молекулой антитела типа IgG (J. Bio. Chem., 276, 16469-16477 (2001)). Было установлено, что важную роль в связывании FcγR с Fc-областью антитела играют некоторые аминокислотные остатки в шарнирной области, CH2 доменов антитела, а также углеводные остатки, присоединенные к остатку Asn 297 (нумерация EU согласно Кабату (Chem. Immunol. 65, 88-110 (1997) (список непатентной литературы 6), Eur. J. Immunol. 23, 1098-1104 (1993) (список непатентной литературы 7) и Immunol. 86, 319-324 (1995) (список непатентной литературы 8)). Недавно были исследованы варианты Fc-области с различными FcγR-связывающими свойствами. При этом основное внимание уделяли этому связывающему участку с целью получить варианты Fc-области с наиболее высокой связывающей активностью в отношении активации FcγR (WO2000/042072 (список патентной литературы 1) и WO2006/019447 (список патентной литературы 2)). Например, группе авторов Lazaq и др. удалось значительно повысить связывающую активность IgG1 человека в отношении FcγRIIIa человека (VI58) приблизительно в 370 раз при замене остатков Ser 239, Ala 330 и Ile 332 (нумерация Кабата) в последовательности IgG1 человека на остатки Asn, Leu и Glu, соответственно (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 4005-4010 (2006) (список непатентной литературы 9) и WO2006/019447 (список патентной литературы 2)). Эта измененная форма обладает приблизительно в 9 раз большей связывающей активностью по сравнению со связывающей активностью иммуноглобулина дикого типа в отношении FcγRIIIa/FcγIIb (A/I). В другом случае, группе авторов Shinkawa и др. удалось значительно повысить связывающую активность в отношении FcγRIIIa приблизительно в 100 раз за счет делеции остатков фукозы

в углеводной цепи, присоединенной к остатку Asn 297 (J. Biol. Chem. 278, 3466-3473 (2003) (список непатентной литературы 10)). Эти методы могут в значительной степени повысить активность ADCC IgG1 человека по сравнению с природными IgG1.

Природные антитела типа IgG обычно распознают и связываются с одним эпитопом через его вариабельную область (Fab) и, следовательно, могут связываться только с одним антигеном. В то же время известно, что множество типов белков принимают участие в развитии рака или воспаления, и эти белки могут взаимодействовать друг с другом. Например, известно, что некоторые воспалительные цитокины (TNF, IL1 и IL6) принимают участие в развитии иммунологического заболевания (Nat. Biotech., 28, 502-510 (2011) (список непатентной литературы 11)). Известно также, что активация других рецепторов является одним из механизмов, лежащих в основе развития невосприимчивости онкологических заболеваний к лекарственным средствам (Endocr Relat Cancer 13, 45-51 (2006) (список непатентной литературы 12)). В таком случае обычное антитело, которое распознает один эпитоп, не может ингибировать множество белков.

Антитела, которые связываются с двумя или более типами антигенов и которые представлены в одной молекуле (такие антитела называются биспецифическими антителами), исследовали в качестве молекул, ингибирующих множество мишеней. Связывающую активность с двумя различными антигенами (первый антиген и второй антиген) можно обеспечить с помощью модификации природных антител IgG-типа (mAbs. (2012) Mar 1, 4 (2)). Следовательно, такое антитело в виде одной молекулы не только оказывает эффект нейтрализации этих двух или более типов антигенов, но и эффект увеличения противоопухолевой активности за счет сшивки клеток, обладающих цитотоксической активностью в отношении раковых клеток. Ранее были опубликованы данные о молекулярных формах биспецифических антител, то есть о молекуле с антигенсвязывающим участком, присоединенным к N- или C-концу антитела (DVD-Ig и scFv-IgG), о молекуле с различными последовательностями двух Fab-областей антитела (биспецифическое антитело с общей L-цепью и гибридная гибридома), о молекуле, в которой одна Fab-область распознает два антигена (IgG два-в-одном), и о молекуле, содержащей петлю CH3-домена в качестве другого антигенсвязывающего участка (Fcab) (Nat. Rev., 10, 301-316 (2010) (список непатентной литературы 13) и Peds, 23 (4), 289-297 (2010) (список непатентной литературы 14)). Так как любые эти биспецифические антитела взаимодействуют с рецептором FcγR через их Fc области, то сохраняются эффекторные функции антитела. Таким образом, биспецифическое антитело связывается с любым антигеном, который тем самым распознается в одно и то же время со связыванием с FcγR и проявляет активность ADCC против клеток, экспрессирующих антиген.

При условии, что все антигены, распознаваемые биспецифическим антителом, являются антигенами, специфически экспрессированными при раке, биспецифическое антитело, связывающееся с любым из антигенов, будет проявлять цитотоксическую активность против раковых клеток и, следовательно, можно ожидать, что такие антитела будут оказывать более сильный противораковый эффект, чем обычное лекарственное средство на основе одного антигена. Однако в случае, если любой из антигенов, распознаваемых биспецифическим антителом, экспрессируется в нормальной ткани, или экспрессируется на иммунocyтах, то будет происходить разрушение нормальной ткани или высвобождение цитокинов за счет сшивки с FcγR (J. Immunol., 163 (3), 1246-1252 (1999) Aug 1 (список непатентной литературы 15)). В результате индуцируются сильные отрицательные реакции.

Например, известно, что катумаксомаб является биспецифическим антителом, которое распознает белок, экспрессируемый на Т-клетках, и экспрессируемый раковыми клетками белок (раковый антиген). Катумаксомаб связывается двумя Fab-фрагментами с раковым антигеном (ErCAM) и с цепью CD3ε, экспрессируемой на Т-клетках, соответственно. Катумаксомаб индуцирует опосредованную Т-клетками цитотоксическую активность за счет связывания в одно и то же время с раковым антигеном и с CD3ε, и индуцирует цитотоксическую активность, опосредованную клетками-киллерами или антиген-презентирующими клетками (например, макрофагом), за счет связывания в одно и то же время с раковым антигеном и FcγR. Благодаря использованию этих двух цитотоксических активностей катумаксомаб оказывает высокий терапевтический эффект на злокачественные асциты при внутривенном введении, и таким образом он был утвержден для применения в Европе (Cancer Treat Rev. 36 (6), 458-467 (2010) Oct (список непатентной литературы 16)). Кроме того, сообщается, что введение катумаксомаба в некоторых случаях приводит к выработке реактивных к раковым клеткам антител, что свидетельствует об индукции приобретенного иммунитета (Future Oncol. 8 (1), 73-85 (2012) Jan (список непатентной литературы 17)). В связи с этими результатами, такие антитела, проявляющие как опосредованную Т-клетками цитотоксическую активность, так и эффект, осуществляемый клетками, такими как клетки-киллеры или макрофаги с участием FcγR (такие антитела, прежде всего, называются трехфункциональными антителами), привлекали внимание, так как ожидалось сильное противораковое действие и индукция приобретенного иммунитета.

Однако трехфункциональные антитела связываются в одно и то же время с CD3ε и FcγR даже в отсутствии ракового антигена и, следовательно, сшивают экспрессируемый Т-клетками фрагмент CD3ε с FcγR-экспрессируемыми клетками даже в несодержащем раковые клетки окружении, что приводит к

продуцированию различных цитокинов в большом количестве. Такая независимая от ракового антигена индукция продуцирования различных цитокинов в настоящее время ограничивает введение трехфункциональных антител в брюшную полость (Cancer Treat Rev. 36 (6), 458-467 (2010 Oct) (список непатентной литературы 16)). Введение трехфункциональных антител системным способом представляет большие трудности в связи с тяжелыми отрицательными реакциями, связанными с сильным цитокиновым притоком (Cancer Immunol Immunother. 56 (9): 1397-1406 (2007 Sep) (список непатентной литературы 18)).

Биспецифическое антитело, полученное по стандартной технологии, способно связываться с обоими антителами, то есть с первым раковым антителом (ЕpCAM) и со вторым антигеном CD3ε, и одновременно связываться с FcγR, и, следовательно, не может устранить, в связи со своей молекулярной структурой, такие отрицательные реакции, вызванные связыванием с FcγR и со вторым антигеном CD3ε в одно и то же время.

Недавно получили модифицированное антитело, которое вызывает цитотоксическую активность, опосредованную Т-клетками, и при этом устраняет отрицательные реакции, причем такое антитело получали с использованием Fc области со сниженной связывающей активностью в отношении FcγR (WO2012/073985).

Однако даже такое антитело не способно действовать на два иммунорецептора, то есть CD3ε и FcγR, и в то же время связываться с раковым антигеном в связи со своей молекулярной структурой.

До сих пор не известно антитело, которое проявляет обе активности - цитотоксическую активность, опосредованную Т-клетками, и цитотоксическую активность, опосредованную другими клетками, отличающимися от Т-клеток, по специфическому к раковому антигену механизму, и при этом которое устраняет отрицательные реакции.

Список цитированной литературы

Патентная литература.

Патентная литература 1: WO2000/042072.

Патентная литература 2: WO2006/019447.

Непатентная литература.

Непатентная литература 1: Nat. Biotechnol. 23, 1073-1078 (2005).

Непатентная литература 2: Eur J Pharm Biopharm. 59 (3), 389-396 (2005).

Непатентная литература 3: Immunol. Lett. 82, 57-65 (2002).

Непатентная литература 4: Nat. Rev. Immunol. 8, 34-47 (2008).

Непатентная литература 5: Ann. Rev. Immunol. 6, 251-81 (1988).

Непатентная литература 6: Chem. Immunol. 65, 88-110 (1997).

Непатентная литература 7: Eur. J. Immunol. 23, 1098-1104 (1993).

Непатентная литература 8: Immunol. 86, 319-324 (1995).

Непатентная литература 9: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103, 4005-4010 (2006).

Непатентная литература 10: J. Biol. Chem. 278, 3466-3473 (2003).

Непатентная литература 11: Nat. Biotech., 28, 502-10 (2011).

Непатентная литература 12: Endocr Relat Cancer 13, 45-51 (2006).

Непатентная литература 13: Nat. Rev. 10, 301-316 (2010).

Непатентная литература 14: Peds (2010), 23 (4), 289-297.

Непатентная литература 15: J. Immunol. 163 (3), 1246-52 (1999) Aug 1.

Непатентная литература 16: Cancer Treat Rev. 36 (6), 458-67 (2010) Oct.

Непатентная литература 17: Future Oncol. (1), 73-85 (2012) Jan 8.

Непатентная литература 18: Cancer Immunol Immunother. 56 (9): 1397-406 2007 Sep.

Краткое описание сущности настоящего изобретения

Техническая задача.

Настоящее изобретение создано в свете этих обстоятельств. В объекте настоящего изобретения предлагается получение антигенсвязывающей молекулы, включающей: вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью с двумя различными антигенами (первый антиген и второй антиген), но не связывающуюся с этими антигенами одновременно, а также вариабельную область с антигеном (третий антиген), отличающимся от этих антигенов, и предлагается фармацевтическая композиция, включающая антигенсвязывающую молекулу, и способ получения антигенсвязывающей молекулы.

Решение задачи.

Авторы настоящего изобретения провели тщательные исследования для достижения поставленной цели. В результате авторы с успехом получили антигенсвязывающую молекулу, включающую: вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью с двумя различными антигенами (первый антиген и второй антиген), но не связывающуюся с этими антигенами одновременно, а также вариабельную область, связывающуюся с антигеном (третий антиген), отличающимся от этих антигенов, и повышенную активность, осуществляемую этой антигенсвязывающей молекулой благодаря использованию связывающей активности антигенсвязывающей молекулы с тремя различными антигенами. Кроме

того, авторы настоящего изобретения с успехом получили антигенсвязывающую молекулу, способную исключить сшивку различных клеток, которая происходит при связывании стандартной мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы с антигенами, экспрессируемыми на различных клетках, которое, как считается, является ответственным за развитие отрицательных реакций при использовании мультиспецифичной антигенсвязывающей молекулы в качестве лекарственного средства.

Более подробно, в настоящем изобретении предлагаются следующие объекты.

1. Антигенсвязывающая молекула, включающая переменную область антитела, обладающую связывающей активностью с первым антигеном и вторым антигеном, отличающимся от первого антигена, но не связывающуюся с первым антигеном и вторым антигеном одновременно, и переменную область, связывающуюся с третьим антигеном, отличающимся от первого антигена и второго антигена.

2. Антигенсвязывающая молекула, включающая переменную область антитела с аминокислотным остатком тяжелой цепи переменного домена, измененным таким образом, что переменная область способна связываться с первым антигеном и вторым антигеном, отличающимся от первого антигена, но не способна связываться с первым антигеном и вторым антигеном одновременно.

3. Антигенсвязывающая молекула по п.1 или 2, где переменной областью, которая не связывается с первым антигеном и вторым антигеном одновременно, является переменная область, которая не связывается одновременно с первым антигеном и вторым антигеном, каждый из которых экспрессируется на различных клетках.

4. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп.1-3, дополнительно включающая Fc область антитела.

5. Антигенсвязывающая молекула по п.4, где Fc областью является Fc область со сниженной связывающей активностью с рецептором FcγR по сравнению с Fc областью природного антитела IgG1 человека.

6. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп.1-5, где антигенсвязывающей молекулой является мультиспецифичное антитело.

7. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп.1-6, где переменной областью антитела, способной связываться с первым антигеном и вторым антигеном, является переменная область с измененным по крайней мере одним аминокислотным остатком.

8. Антигенсвязывающая молекула по п.7, где изменением является замена или вставка по крайней мере одного аминокислотного остатка.

9. Антигенсвязывающая молекула по п.7 или 8, где изменением является замена части аминокислотной последовательности переменной области, связывающейся с первым антигеном, на аминокислотную последовательность, связывающуюся со вторым антигеном, или вставкой аминокислотной последовательности, связывающейся со вторым антигеном, в аминокислотную последовательность переменной области, связывающейся с первым антигеном.

10. Антигенсвязывающая молекула по п.8 или 9, где число аминокислотных остатков, предназначенных для вставки, составляет от 1 до 25.

11. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп.7-10, где измененным аминокислотным остатком является аминокислотный остаток в CDR1, CDR2, CDR3 или FR3 областях переменной области антитела.

12. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп.7-11, где измененным аминокислотным остатком является аминокислотный остаток в петле.

13. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп.7-11, где измененным аминокислотным остатком является по крайней мере один аминокислотный остаток, выбранный из положений аминокислот согласно нумерации по Кабату 31-35, 50-65, 71-74 и 95-102 в тяжелой цепи H переменной области, и согласно нумерации по Кабату 24-34, 50-56 и 89-97 в легкой цепи L переменной области.

14. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп.1-13, где любым первым антигеном и вторым антигеном является молекула, специфически экспрессируемая на поверхности Т-клетки, а другим антигеном является молекула, экспрессируемая на поверхности Т-клетки или другого иммунного клетки.

15. Антигенсвязывающая молекула по п.14, где любым первым антигеном и вторым антигеном является CD3, а другим антигеном является FcγR, TLR, лектин, IgA, молекула иммунных контрольных точек, молекула подсемейства TNF, молекула подсемейства TNFR или молекула рецептора клеток-киллеров.

16. Антигенсвязывающая молекула по п.14 или 15, где третьим антигеном является молекула, специфически экспрессируемая в раковой ткани.

17. Фармацевтическая композиция, включающая антигенсвязывающую молекулу по любому из пп.1-16, и фармацевтически приемлемый носитель.

18. Способ получения антигенсвязывающей молекулы по любому из пп.1-16, где способ включает стадии (i)-(iv):

(i) получение библиотеки антигенсвязывающих молекул по крайней мере с одним измененным аминокислотным остатком в переменных областях антитела, каждая из которых связывается с первым

антигеном или со вторым антигеном, причем измененные вариабельные области отличаются друг от друга по крайней мере одним аминокислотным остатком;

(ii) выбор из полученной библиотеки антигенсвязывающей молекулы, включающей вариабельную область, проявляющую связывающую активность с первым антигеном и со вторым антигеном, но которая не связывается одновременно с первым антигеном и со вторым антигеном;

(iii) культивирование клеток хозяина, включающих нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельную область антигенсвязывающей молекулы, выбранной на стадии (ii), и/или нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельную область антигенсвязывающей молекулы, связывающейся с третьим антигеном, для экспрессии антигенсвязывающей молекулы, включающей вариабельную область антитела, способную связываться с первым антигеном и со вторым антигеном, но не связывается с первым антигеном и вторым антигеном одновременно, и/или вариабельную область, связывающуюся с третьим антигеном; и

(iv) выделение антигенсвязывающей молекулы из культуры клеток хозяина.

19. Способ по п.18, где вариабельной областью, которая не связывается с первым антигеном и вторым антигеном одновременно, содержащаяся в антигенсвязывающей молекуле, выбранной на стадии (ii), является вариабельная область, которая не связывается одновременно с первым антигеном и со вторым антигеном, каждый из которых экспрессируется на различных клетках.

20. Способ по п.18 или 19, где клетки хозяина, культивируемые на стадии (iii), дополнительно включают нуклеиновую кислоту, кодирующую Fc область антитела.

21. Способ по п.20, где Fc областью является Fc область со сниженной связывающей активностью в отношении рецептора FcγR по сравнению с Fc областью природного антитела IgG1 человека.

22. Способ по любому из пп.18-21, где продуцируемой антигенсвязывающей молекулой является мультиспецифичное антитело.

23. Способ по любому из пп.18-22, где по крайней мере одним измененным аминокислотным остатком в вариабельной области на стадии (i) является замещенный или вставленный аминокислотный остаток.

24. Способ по п.23, где число вставленных аминокислотных остатков составляет от 1 до 25.

25. Способ по любому из пп.18-24, где изменением является изменение аминокислотного остатка в области CDR1, CDR2, CDR3 или FR3 в вариабельной области антитела.

26. Способ по любому из пп.18-25, где изменением является изменение аминокислотного остатка в петле.

27. Способ по любому из пп.18-25, где изменением является изменение по крайней мере одного аминокислотного остатка, выбранного из положений аминокислот согласно нумерации по Кабату 31-35, 50-65, 71-74 и 95-102 в тяжелой цепи H вариабельного домена, и согласно нумерации по Кабату 24-34, 50-56 и 89-97 в легкой цепи L вариабельного домена.

28. Способ по любому из пп.18-27, где любым первым антигеном и вторым антигеном является молекула, специфически экспрессируемая на поверхности Т-клеток, а другим антигеном является молекула, экспрессируемая на поверхности Т-клеток или любого другого иммунocyта.

29. Способ по п.28, где любым первым антигеном и вторым антигеном является CD3, а другим антигеном является FcγR, TLR, лектин, IgA, молекула иммунных контрольных точек, молекула подсемейства TNF, молекула подсемейства TNFR или молекула рецептора клеток-киллеров.

30. Способ по п.28 или 29, где третьим антигеном является молекула, специфически экспрессируемая в раковой ткани.

31. Способ лечения рака, включающий введение антигенсвязывающей молекулы по любому из пп.1-16.

32. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп.1-16 для применения при лечении рака.

33. Применение антигенсвязывающей молекулы по любому из пп.1-16 для получения терапевтического агента для лечения рака.

34. Способ получения терапевтического агента для лечения рака, включающий стадию применения антигенсвязывающей молекулы по любому из пп.1-16.

35. Специалисту в данной области техники представляется очевидным, что в объем настоящего изобретения также включена любая комбинация двух или более объектов, описанных выше, если не возникают противоречия на основании общих технических принципов, известных специалистам в данной области техники.

Краткое описание фигур

На фиг. 1 представлена принципиальная схема антитела, которое связывается с первым антигеном и вторым антигеном, но не связывается с этими антигенами одновременно.

На фиг. 2 представлена принципиальная схема антитела, которое не вызывает сшивку благодаря тому, что антитело не связывается с двумя антигенами одновременно.

На фиг. 3 представлена принципиальная схема антитела, которое связывается с двумя антигенами одновременно, но при этом не соединяет две клетки одновременно.

На фиг. 4 представлена принципиальная схема антитела, которое сшивает раковую клетку с Т-

клеткой, экспрессирующей первый рецептор.

На фиг. 5 представлена принципиальная схема антитела, которое сшивает раковую клетку с клеткой, экспрессирующей второй рецептор.

На фиг. 6 представлена принципиальная схема антитела, которое сшивает раковую клетку с иммунитом, но при этом не сшивает иммуниты.

На фиг. 7 представлен график, на котором показаны результаты анализа CE115 для CD3ε методом цельноклеточного иммуноферментного анализа (ИФА).

На фиг. 8 представлена схема молекулярной формы EGFR_ERY22_CE115.

На фиг. 9 представлен график, на котором показаны результаты анализа TDCC (SK-pca13a) для формы EGFR_ERY22_CE115.

На фиг. 10 представлен график, на котором показана связывающая активность гуманизированных антител CE115 в отношении рецептора CD3ε.

На фиг. 11 представлен график, на котором показаны результаты электролюминесцентного иммуноферментного анализа (ECL-ИФА) для детектирования связывания с интегрином антител CE115 со вставкой RGD.

На фиг. 12 представлен график, на котором показаны результаты анализа ECL-ИФА для детектирования связывания с CD3ε антител CE115 со вставкой RGD.

На фиг. 13 представлен график, на котором показаны результаты анализа ECL-ИФА для детектирования одновременного связывания с CD3ε и интегрином антител CE115 со вставкой RGD. Показаны результаты одновременного связывания измененных форм с указанными белками.

На фиг. 14 представлен график, на котором показаны результаты анализа ECL-ИФА для детектирования одновременного связывания с антигенами антител CE115 со вставкой RGD. Показаны результаты связывания измененных форм, которые не связываются с антигенами одновременно.

На фиг. 15 представлен график, на котором показаны результаты анализа ECL-ИФА для детектирования связывания с TLR2 антител CE115 со вставкой TLR2-связывающего пептида.

На фиг. 16 представлен график, на котором показаны результаты анализа ECL-ИФА для детектирования связывания с CD3ε антител CE115 со вставкой TLR2-связывающего пептида.

На фиг. 17 представлен график, на котором показаны результаты анализа ECL-ИФА для детектирования одновременного связывания с TLR2 и CD3 антител CE115 со вставкой TLR2-связывающего пептида.

На фиг. 18 представлена типичная сенсограмма антитела, с соотношением количеств связанных компонентов менее 0,8. На оси ординат указана величина в условных единицах (ответный сигнал). На оси абсцисс указано время.

На фиг. 19 представлена диаграмма связывания Fab-домена, отображаемого фагом, с CD3ε и IL6R.

На фиг. 20 представлена диаграмма связывания Fab-домена, отображаемого фагом, с CD3ε и IgA человека (hIgA). NC обозначает его связывание на планшете, на котором не иммобилизовали антиген.

На фиг. 21 представлена диаграмма связывания клона, преобразованного в IgG, с CD3ε и IgA человека (hIgA).

На фиг. 22 представлена диаграмма, на которой показано, что связывание клона, преобразованного в IgG, с IgA человека ингибируется рецептором CD3ε, таким образом, что клон не способен одновременно связываться с IgA человека (hIgA) и с CD3ε.

На фиг. 23 представлена диаграмма связывания Fab-домена, отображаемого фагом, с CD3ε и с CD154 человека. NC обозначает его связывание на планшете, на котором не иммобилизовали антиген.

На фиг. 24 представлена диаграмма связывания клона, преобразованного в IgG, с CD3ε и с CD154 человека.

На фиг. 25 представлена диаграмма, на которой показано, что связывание клона, преобразованного в IgG, с CD154 человека ингибируется рецептором CD3ε, таким образом, что клон не способен одновременно связываться с CD154 человека (hIgA) и с CD3ε.

Описание вариантов осуществления настоящего изобретения

Использованный в данном контексте термин "вариабельная область антитела" обычно означает область, включающую домен, состоящий из четырех каркасных областей (FR) и трех определяющих комплементарность областей (CDR), фланкирующих с обоих концов области, и также включающую частичную последовательность этих областей длиной, достаточной для проявления связывающей активности с частью антигена или целым антигеном. Прежде всего предпочтительно область включает легкую цепь вариабельного домена (VL) антитела и тяжелую цепь вариабельного домена (VH). Вариабельная область антитела по настоящему изобретению может содержать произвольную последовательность и может содержать вариабельную область, полученную из любого антитела, такого как мышиное антитело, крысиное антитело, кроличье антитело, козье антитело, верблюжье антитело и гуманизированное антитело, полученное с помощью гуманизации любого из этих антител не человека и антитела человека. Термин "гуманизированное антитело", называемое также реконструированным антителом, получают при прививке областей CDR не человека из антител млекопитающих, например, мышиного антитела к областям

CDR человека. Способы детектирования областей CDR известны в данной области техники (Kabat и др., *Sequence of Proteins of Immunological Interest*, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1987), и Chothia и др., *Nature* 342: 877 (1989)). Основные методы генной инженерии также известны в данной области техники (см. *European Patent Application Publication No. EP 125023* и *WO 96/02576*).

Термин "вариабельная область антитела по настоящему изобретению", которая "не связывается одновременно с первым антигеном и вторым антигеном", означает, что вариабельная область антитела по настоящему изобретению не может связываться со вторым антигеном, если она уже связана с первым антигеном, и в то же время вариабельная область не может связываться с первым антигеном, если она уже связана со вторым антигеном. В этом контексте, фраза "одновременно не связывается с первым антигеном и вторым антигеном" также включает отсутствие сшивки клетки, экспрессирующей первый антиген, с клеткой, экспрессирующей второй антиген, или отсутствие одновременного связывания с первым антигеном и вторым антигеном, каждый из которых экспрессирован на различных клетках. Эта фраза также включает случай, когда вариабельная область способна связываться с обоими первым антигеном и вторым антигеном одновременно, если первый антиген и второй антиген не экспрессируются на клеточной мембране, как и с растворимыми белками, или когда оба антигена осаждаются на одной и той же клетке, но не может связываться одновременно с первым антигеном и вторым антигеном, каждый из которых экспрессируется на различных клетках. Такая вариабельная область антитела особо не ограничивается при условии, что вариабельная область антитела проявляет свои функции. Примеры включают вариабельные области, полученные из вариабельной области антитела типа IgG при изменении части ее аминокислотных остатков для связывания с требуемым антигеном. Предназначенные для изменения аминокислоты выбирают, например, из аминокислот, изменения которых не влияют на связывание с антигеном, в вариабельной области антитела, связывающейся с первым антигеном или со вторым антигеном.

В данном контексте фраза "экспрессируется на различных клетках" просто означает, что антигены экспрессируются на отдельных клетках. Комбинация таких клеток может включать, например, клетки одного типа, такие как Т-клетка и другая Т-клетка, или может включать клетки различного типа, такие как Т-клетка и клетка-киллер.

В настоящем изобретении можно использовать изменение одного аминокислотного остатка или изменение множества аминокислотных остатков в комбинации.

В случае использования изменений множества аминокислотных остатков в комбинации, число изменений, предназначенных для комбинирования, особо не ограничено, и может соответственно находиться в интервале, который обеспечивает достижение объекта настоящего изобретения. Число изменений, предназначенных для комбинирования, составляет, например, 2 или более и 30 или менее, предпочтительно 2 или более и 25 или менее, 2 или более и 22 или менее, 2 или более и 20 или менее, 2 или более и 15 или менее, 2 или более и 10 или менее, 2 или более и 5 или менее, или 2 или более и 3 или менее.

Множество изменений аминокислотных остатков, предназначенных для комбинирования, можно добавлять только в тяжелую цепь вариабельного домена антитела или в легкую цепь вариабельного домена антитела или их можно соответственно распределить в обеих тяжелой и легкой цепях вариабельного домена.

Приемлемым является изменение одного или более аминокислотных остатков в вариабельной области при условии, что сохраняется антигенсвязывающая активность. В случае изменения аминокислотного остатка в вариабельной области, полученная вариабельная область предпочтительно сохраняет связывающую активность соответствующего неизмененного антитела и предпочтительно проявляет 50% или более, более предпочтительно 80% или более, еще более предпочтительно 100% или более связывающей активности до изменения, хотя и вариабельная область по настоящему изобретению не ограничивается ими. Связывающую активность можно повысить с помощью изменения аминокислотных остатков, и, например, можно повысить в 2 раза, 5 раз или 10 раз по сравнению со связывающей активностью до изменений.

Примеры предпочтительной области для изменений аминокислотных остатков включают экспонированные в растворитель области и петли в вариабельной области. Среди прочих предпочтительными являются области CDR1, CDR2, CDR3, FR3 и петли. Подробнее предпочтительными являются положения согласно нумерации по Кабату 31-35, 50-65, 71-74 и 95-102 в вариабельном домене Н цепи и положения согласно нумерации по Кабату 24-34, 50-56 и 89-97 в вариабельном домене L-цепи. В ходе изменений аминокислотных остатков можно также включать дополнительные аминокислотные остатки, которые повышают антигенсвязывающую активность.

Термин "петля по настоящему изобретению" означает область, содержащую остатки, которые не принимают участие в поддержании β -складчатой структуры иммуноглобулина.

В настоящем изобретении изменение аминокислотных остатков означает замену, делецию, добавление, вставку или модификацию или их комбинацию. В настоящем изобретении изменение аминокислотных остатков можно использовать взаимозаменяемо с мутацией аминокислот и при этом использовать в таком же смысле.

Замену аминокислотного остатка осуществляют при замене на другой аминокислотный остаток с

целью изменения, например, согласно любому из следующих пунктов (а)-(в):

- (а) полипептидной цепи области со складчато-листовой или спиральной структурой;
- (б) электрического заряда или гидрофобности участка-мишени; и
- (в) размера боковой цепи.

Аминокислотные остатки классифицируют в следующие группы на основе свойств их боковых цепей:

- (1) гидрофобные остатки: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu и Ile,
- (2) нейтральные гидрофильные остатки: Cys, Ser, Thr, Asn и Gln,
- (3) кислотные остатки: Asp и Glu,
- (4) основные остатки: His, Lys и Arg,
- (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly и Pro; и
- (6) ароматические остатки: Trp, Tyr и Phe.

Замены аминокислотного остатка на аминокислотный остаток из одной и тоже указанной группы называют консервативными заменами, в то время как замены аминокислотного остатка из одной из этих групп на аминокислотный остаток из другой группы называют неконсервативными заменами.

Замена по настоящему изобретению может представлять собой консервативную замену или может представлять собой неконсервативную замену. В другом варианте можно комбинировать консервативную замену и неконсервативную замену.

Изменение аминокислотного остатка также включает: выбор вариабельной области, способной связываться с первым антигеном и вторым антигеном, но не способной одновременно связываться с этими антигенами, из областей, полученных случайным изменением аминокислотных остатков, изменение которых не устраняет связывающую активность с антигеном, в вариабельной области антитела, связывающейся с первым антигеном или со вторым антигеном, и изменение путем вставки пептида, про который предварительно известно, что он обладает связывающей активностью с требуемым антигеном, в область, указанную выше. Примеры известных пептидов, обладающих связывающей активностью с требуемым антигеном, включают пептиды, указанные в табл. 1.

Таблица 1

Связывающий компонент/исследуемый белок	Литература
VEGFR	J Biol Chem. 2002 Nov 8;277(45):43137-42. Epub 2002 Aug 14., EMBO J. 2000 Apr 3;19(7):1525-33., J Med Chem. 2010 Jun 10;53(11):4428-40.
TNFR	Mol Immunol. 2004 Jul;41(8):741-9., Eur J Pharmacol. 2011 Apr 10;656(1-3):119-24.
TLR5	J Immunol 2010;185:1744-1754
TLR4	PLoS ONE, February 2012 Volume 7 Issue 2 e30839
TLR2	WO2006/083706A2,
T клетка/VLA рецептор	Int Immunopharmacol. 2003 Mar;3(3):435-43.
PDGFR	Biochemical Pharmacology(2003), 66(7), 1307-1317, FEBS Lett. 1997 Dec 15;419(2-3):166-70.
Naip5(NLR)	NATURE IMMUNOLOGY VOLUME 9 NUMBER 10 OCTOBER 2008 1171-
Интегрин	WO 95/14714, WO 97/08203, WO 98/10795, WO 99/24462, J. Biol. Chem. 274: 1979-1985
FcγRIIa	J Biol Chem. 2009 Jan 9;284(2):1126-35
EGFR	Journal of Biotechnology(2005), 116(3) 211-219
DR5 агонист	Journal of Biotechnology(2006), 361(3) 522-536
CXCR4	Science 330, 1066 (2010); Vol. 330 no. 6007 pp. 1066-1071
CD40	Eur J Biochem. 2003 May;270(10):2287-94.
CD154	J Mol Med (Berl). 2009 Feb;87(2):181-97.

В одном объекте настоящего изобретения предлагается антигенсвязывающая молекула, включающая вариабельную область антитела с аминокислотным остатком в тяжелой цепи вариабельного домена, измененным таким образом, что вариабельная область способна связываться с первым антигеном и вторым антигеном, отличающимся от первого антигена, но не связывается одновременно с первым антигеном и вторым антигеном. Вариабельную область, способную связываться с первым антигеном и вторым антигеном, отличающимся от первого антигена, но которая не связывается одновременно с первым антигеном и вторым антигеном, можно получить, например, за счет изменения аминокислотного остатка (замена, делеция, вставка, добавление или модификация или их комбинация), как описано выше, в тяжелой цепи вариабельного домена. Положение аминокислотного остатка, который предназначен для изменения, предпочтительно находится в тяжелой цепи вариабельного домена. Примеры более предпочтительной области включают экспонированные к растворителю области и путли в вариабельном домене. Среди

прочих предпочтительными являются CDR1, CDR2, CDR3, FR3 и петли. Более подробно, предпочтительными являются положения согласно нумерации по Кабату 31-35, 50-65, 71-74 и 95-102 в варибельном домене Н цепи и наиболее предпочтительно положения согласно нумерации по Кабату 31, 52а-61, 71-74 и 97-101 в варибельном домене Н цепи. В ходе изменений аминокислотных остатков можно также включать дополнительные аминокислотные остатки, которые повышают антигенсвязывающую активность.

В варибельной области антитела по настоящему изобретению изменение, указанное выше, можно комбинировать с известным в данной области изменением. Например, известная в данной области техники модификация заключается в модификации N-концевого глутамина в варибельной области методом циклизации глутамина с образованием пироглутаминина. Таким образом, антитело по настоящему изобретению, содержащее глутамин в N-концевом положении тяжелой цепи, может содержать варибельную область с заменой N-концевого глутамина на пироглутаминовую кислоту.

Такая варибельная область антитела может дополнительно включать изменение аминокислотного остатка для улучшения, например, связывания с антигеном, фармакокинетики, стабильности или антигенности. Варибельную область антитела по настоящему изобретению можно изменять таким образом, чтобы обеспечить pH-зависимую связывающую активность с антигеном и тем самым получить способность повторно связываться с антигеном (WO2009/125825).

Можно также изменять аминокислотные остатки для изменения антигенсвязывающей активности в соответствии с концентрацией соединения, специфичного к ткани-мишени, например, в варибельной области антитела, связывающейся с третьим антигеном (WO2013/180200).

Варибельную область можно дополнительно изменить с целью, например, повысить связывающую активность, улучшить специфичность, снизить величину ИЭТ, придать pH-зависимые антигенсвязывающие свойства, улучшить термостабильность связывания, улучшить растворимость, улучшить стабильность к химической модификации, улучшить гетерогенность, свойственную углеводной цепи, исключить Т эпиготоп, выявленный с помощью предсказания *in silico* или анализа *in vitro* на основе Т-клеток, для снижения иммуногенности, или для включения Т-клеточного эпиготоп для активации регуляторных Т-клеток (mAbs 3: 243-247, 2011).

Способность варибельной области по настоящему изобретению "связываться с первым антигеном и вторым антигеном" можно оценивать методом, известным в данной области техники.

К такому методу относится, например, электролюминесцентный метод (метод ECL) (BMC Research Notes 2011, 4: 281).

Более подробно, например, низкомолекулярное антитело, включающее область, способную связываться с первым антигеном и вторым антигеном, например, Fab-область, меченную биотином антигенсвязывающую молекулу, предназначенную для анализа, или моновалентное антитело (антитело, которое не содержит одну из двух Fab-областей, которые содержатся в обычном антителе), смешивают с первым антигеном или вторым антигеном, содержащим сульфo-метку (комплекс Ru), и смесь добавляют в планшет с иммобилизованным стрептавидином. На этой стадии меченная биотином антигенсвязывающая молекула, предназначенная для анализа, связывается со стрептавидином на планшете. Излучение, наблюдаемое от сульфo-метки, и люминесцентный сигнал можно измерять с использованием прибора Sector Imager 600 или 2400 (MSD K.K.) или аналогичного устройства, тем самым подтверждая связывания указанной выше области антигенсвязывающей молекулы, предназначенной для анализа, с первым антигеном или вторым антигеном.

В другом варианте такой анализ можно проводить методами ИФА, FACS (сортировка клеток с активированной флуоресценцией), ALPHAScreen (гомогенный анализ усиленной за счет эффекта близости люминесценции), BIACORE (метод, основанный на явлении поверхностного плазмонного резонанса (ППР) и т.п. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (11), 4005-4010 (2006)).

Более подробно, анализ можно проводить с использованием, например, анализатора взаимодействия Bioscye (GE Healthcare Japan Corp.), основанного на явлении поверхностного плазмонного резонанса (ППР). Анализатор Bioscye включает любую модель, такую как Bioscye T100, T200, X100, A100, 4000, 3000, 2000, 1000 или C. В качестве сенсорного чипа для анализатора Bioscye можно использовать любой сенсорный чип, такой как CM7, CM5, CM4, CM3, C1, SA, NTA, L1, HPA или Au. Для иммобилизации на сенсорный чип белков для захвата антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению, таких как белок А, белок G, белок L, антитела против IgG человека, антитела против IgG-Fab человека, антитела против легкой цепи человека, антитела против Fc человека, антигенные белки или антигенные пептиды, можно использовать метод конденсации, такой как аминоконденсация, дисульфидная конденсация или альдегидная конденсация. Для получения сенсограммы в качестве анализируемого соединения на чип наносят первый антиген или второй антиген и измеряют взаимодействие. В этой операции концентрацию первого антигена или второго антигена можно выбирать в интервале от нескольких мкМ до нескольких нМ в соответствии с силой взаимодействия (например, KD) анализируемого образца.

В другом варианте вместо иммобилизации антигенсвязывающей молекулы на сенсорном чипе можно иммобилизовать первый антиген или второй антиген, и оценивать взаимодействие с образцом антител, предназначенным для анализа. Способность варибельной области антигенсвязывающей молекулы

кулы по настоящему изобретению связываться с первым антигеном и вторым антигеном" можно подтверждать с использованием величины константы диссоциации (K_D), рассчитанной по сенсограмме взаимодействия или по степени увеличения сигнала на сенсограмме после действия образца антигенсвязывающей молекулы по сравнению с уровнем до взаимодействия.

Анализ ALPHAScreen проводят по технологии ALPHA с использованием двух типов гранул (донорных и акцепторных) на основе следующего принципа: люминесцентный сигнал детектируется только тогда, когда эти два типа гранул сближаются при биологическом взаимодействии молекулы, связанной с донорной гранулой, и молекулой, связанной с акцепторной гранулой. Активированный лазером фотосенсибилизатор в донорной грануле преобразует кислород воздуха в синглетный кислород в возбужденном состоянии. Синглетный кислород диффундирует вокруг донорной гранулы и достигает расположенной поблизости акцепторной гранулы, тем самым вызывая хемилюминесцентную реакцию в грануле, которая в конечном итоге излучает свет. В отсутствие взаимодействия между молекулой, связанной с донорной гранулой, и молекулы, связанной с акцепторной гранулой, синглетный кислород, генерируемый в донорной грануле, не достигает акцепторной гранулы. В результате хемилюминесцентная реакция не происходит.

Одно из веществ (лиганд), между которыми должно наблюдаться взаимодействие, иммобилизуют на тонкую золотую пленку сенсорного чипа. Сенсорный чип снизу облучают светом таким образом, чтобы полное отражение происходило на границе раздела между тонкой золотой пленкой и стеклом. В результате в части отраженного света формируется участок с падением интенсивности отражения (сигнал ППР). Другое из веществ (анализируемое вещество), между которыми должно наблюдаться взаимодействие, вводят на поверхность сенсорного чипа. В процессе связывания анализируемого вещества с лигандом масса иммобилизованной молекулы-лиганда возрастает, изменяя показатель преломления растворителя на поверхности сенсорного чипа. Такое изменение показателя преломления сдвигает положение сигнала ППР (и наоборот, диссоциация связанных молекул сдвигает сигнал в исходное положение). В системе Biacore на оси ординат отложена величина сдвига, то есть изменение массы на поверхности сенсорного чипа, и отображается зависящее от времени изменение по массе в виде данных анализа (сенсограмма). Количество анализируемого вещества, связанного с лигандом, захваченного на поверхности сенсорного чипа (количественное изменение ответного сигнала на сенсограмме в период до и после взаимодействия анализируемого вещества) можно определить с использованием данных на сенсограмме. Однако, так как количество связанного вещества также зависит от количества лиганда, следует провести сравнение в условиях, в которых используют в основном равные количества лиганда. По кривой на сенсограмме можно определить кинетику, то есть константу скорости ассоциации (k_a) и константу скорости диссоциации (k_d), в то время как константу аффинности (K_D) можно определить по соотношению этих констант. Анализ ингибирования также предпочтительно проводить методом Biacore. Примеры анализа ингибирования описаны в статье Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (11), 4005-4010 (2006).

Способность антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению "не связываться одновременно с первым антигеном и вторым антигеном" можно подтверждать следующим образом: подтвердить наличие связывающей активности с первым антигеном и вторым антигеном, а затем обеспечить предварительное связывание первого антигена или второго антигена с антигенсвязывающей молекулой, включающей вариабельную область, которая обладает такой связывающей активностью, и затем определять присутствие или отсутствие ее связывающей активности с другим антигеном по методике, описанной выше.

В другом варианте такую способность можно также подтвердить при определении ингибирования связывания антигенсвязывающей молекулы с первым антигеном или вторым антигеном, иммобилизованным на планшете для ИФА или сенсорном чипе, при добавлении в раствор другого антигена.

Более подробно, в случае использования метода ECL готовят меченную биотином исследуемую антигенсвязывающую молекулу, первый антиген с введенной сульфо-меткой (комплекс Ru) и немеченый второй антиген. Если исследуемая антигенсвязывающая молекула способна связываться с первым антигеном и вторым антигеном, но не связывается одновременно с первым антигеном и вторым антигеном, то люминесцентный сигнал от сульфо-метки детектируется в отсутствие немеченого второго антигена при добавлении смеси исследуемой антигенсвязывающей молекулы и первого антигена в лунки планшета с иммобилизованным стрептавидином с последующим облучением светом. И наоборот, люминесцентный сигнал будет снижаться в присутствии второго антигена. Такое снижение люминесцентного сигнала можно использовать для количественного определения связывающей активности.

В случае использования анализа ALPHAScreen исследуемая антигенсвязывающая молекула взаимодействует с первым антигеном в отсутствие конкурирующего второго антигена, при этом генерируются сигналы при 520-620 нм. Немеченый второй антиген конкурирует с первым антигеном за связывание с исследуемой антигенсвязывающей молекулой. Снижение флуоресценции, вызванное конкуренцией, можно определить количественно и тем самым определить относительную связывающую активность. Биотинилирование полипептидов с использованием сульфо-NHS-биотина или подобных веществ известно в данной области техники. В первый антиген можно включить метку GST (глутатион-S-трансфераза) с помощью специально оптимизированного метода, который включает, например, слияние полинуклео-

тида, кодирующего первый антиген, в расплаве с полинуклеотидом, кодирующим GST, и осуществление экспрессии полученного гибридного гена в клетках или в аналогичных векторах-носителях, способных к их экспрессии, а затем очистку на колонке с иммобилизованным глутатионом. Полученные сигналы предпочтительно анализируют с использованием, например, программного обеспечения GRAPHPAD PRISM (GraphPad Software, Inc., Сан Диего), оптимизированного для модели конкуренции с одним участком взаимодействия на основе нелинейного регрессионного анализа. Такой анализ можно проводить аналогичным методом с использованием меченого второго антигена и немеченого первого антигена.

В другом варианте можно использовать метод резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET). FRET означает явление, при котором энергия возбуждения переносится напрямую от одной флуоресцентной молекулы к другой флуоресцентной молекуле, расположенными вблизи друг от друга, с помощью электронного резонанса. Когда происходит явление FRET, энергия возбуждения донора (флуоресцентная молекула в возбужденном состоянии) переносится к акцептору (другая флуоресцентная молекула, расположенная вблизи донора) таким образом, что флуоресценция, испускаемая донором, исчезает (точнее, время испускания флуоресценции уменьшается), и флуоресценцию испускает акцептор. С использованием этого явления можно анализировать присутствие или отсутствие двойного Fab-фрагмента. Например, если первый антиген несет флуоресцентный донор, а второй антиген несет флуоресцентный акцептор, связанный с антигенсвязывающей молекулой, предназначенной для анализа одновременно, то флуоресценция донора исчезает, в то время как акцептор испускает флуоресценцию. Следовательно, наблюдается изменение длины волны флуоресценции. Таким образом, подтверждается, что антитело не содержит двойной Fab. С другой стороны, если смешивание первого антигена, второго антигена и антигенсвязывающей молекулы, предназначенной для анализа, не приводит к изменению длины волны флуоресценции донора, связанного с первым антигеном, то такую антигенсвязывающую молекулу, предназначенную для анализа, можно рассматривать как содержащую двойной Fab.

Например, меченую биотином антигенсвязывающую молекулу, предназначенную для анализа, инкубируют для связывания со стрептавидином на донорной грануле, в то время как первый антиген, меченый GST, инкубируют для связывания с акцепторной гранулой. Антигенсвязывающая молекула, предназначенная для анализа, взаимодействует с первым антигеном в отсутствие конкурирующего второго антигена, при этом генерируются сигналы в интервале от 520 до 620 нм. Немеченый второй антиген конкурирует с первым антигеном за взаимодействие с антигенсвязывающей молекулой, предназначенной для анализа. Снижение флуоресценции, вызванное конкуренцией, можно количественно определять, тем самым определяя относительную связывающую активность. Биотинилирование полипептидов с использованием сульфо-NHS-биотина или подобных веществ известно в данной области техники. В первый антиген можно включить метку GST (глутатион-S-трансфераза) с помощью специально оптимизированного метода, который включает, например, слияние полинуклеотида, кодирующего первый антиген в расплаве с полинуклеотидом, кодирующим GST, и осуществление экспрессии полученного гибридного гена в клетках или в аналогичных векторах-носителях, способных к их экспрессии, а затем очистка на колонке с иммобилизованным глутатионом. Полученные сигналы предпочтительно анализируют с использованием, например, программного обеспечения GRAPHPAD PRISM (GraphPad Software, Inc., Сан Диего), оптимизированного для модели конкуренции с одним участком взаимодействия на основе нелинейного регрессионного анализа.

Включение метки не ограничивается меткой GST, и можно включать любую метку, такую как, но, не ограничиваясь только ими, гистициновую метку, метки MBP, CBP, Flag, HA, V5 или c-мус. Связывание антигенсвязывающей молекулы, предназначенной для анализа, с донорной гранулой не ограничивается связыванием с использованием реакции биотин-стрептавидин. Прежде всего, если антигенсвязывающая молекула включает Fc, то возможный метод включает инкубацию антигенсвязывающей молекулы, предназначенной для анализа, для связывания через Fc-распознающий белок, такой как белок A или белок G на донорной грануле.

А также в случае, когда переменная область способна связываться с первым антигеном и вторым антигеном одновременно, если первый антиген и второй антиген не экспрессируются на клеточных мембранах, также как с растворимыми белками, или если оба осаждаются на одной и той же клетке, но не связываются с первым антигеном и вторым антигеном, каждый из которых экспрессирован на различных клетках, можно одновременно анализировать методом, известным в данной области техники.

Более подробно, антигенсвязывающую молекулу, предназначенную для анализа и для которой методом ECL-ИФА подтверждено связывание одновременно с первым антигеном и вторым антигеном, также смешивают с клеткой, экспрессирующей первый антиген, и клеткой, экспрессирующей второй антиген. Можно выявить неспособность анализируемой антигенсвязывающей молекулы связываться с первым антигеном и вторым антигеном, экспрессированных на различных клетках, одновременно, при условии, что антигенсвязывающая молекула и эти клетки одновременно не связываются друг с другом. Этот анализ можно проводить, например, методом ECL-ИФА на основе клеток. Клетку, экспрессирующую первый антиген, предварительно иммобилизуют на планшете. После связывания анализируемой антигенсвязывающей молекулы с первым антигеном в планшет добавляют клетку, экспрессирующую второй антиген. Другой антиген, экспрессируемый только на клетке, экспрессирующей второй антиген,

детектируют с использованием антител с сульфо-меткой против этого антигена. Сигнал регистрируют при одновременном связывании антигенсвязывающей молекулы с двумя антигенами, соответственно экспрессируемых на двух клетках. Сигнал отсутствует, если антигенсвязывающая молекула одновременно не связывается с этими антигенами.

В другом варианте этот анализ можно проводить методом ALPHA Screen. Анализируемую антигенсвязывающую молекулу смешивают с клеткой, экспрессирующей первый антиген, связанный с донорной гранулой, и клеткой, экспрессирующей второй антиген, связанный с акцепторной гранулой. Сигнал регистрируют, если антигенсвязывающая молекула одновременно связывается с двумя антигенами, экспрессированными на двух клетках, соответственно. Сигнал не регистрируется, если антигенсвязывающая молекула одновременно не связывается с этими антигенами.

В другом варианте этот анализ можно проводить методом октетного взаимодействия. Сначала, клетку, экспрессирующую первый антиген с пептидной меткой, инкубируют для связывания с биосенсором, который распознает пептидную метку. Клетку, экспрессирующую второй антиген, и анализируемую антигенсвязывающую молекулу помещают в лунки и анализируют взаимодействие. Значительный сдвиг длины волны, вызванный связыванием анализируемой антигенсвязывающей молекулы и клетки, экспрессирующей второй антиген, с биосенсором, наблюдается, когда антигенсвязывающая молекула одновременно связывается с двумя антигенами, экспрессированными на двух клетках, соответственно. Незначительный сдвиг длины волны, вызванный связыванием только анализируемой антигенсвязывающей молекулы с биосенсором, наблюдается, когда антигенсвязывающая молекула не связывается одновременно с этими антигенами.

Вместо этих методов, основанных на связывающей активности, можно использовать анализ на основе биологической активности. Например, клетку, экспрессирующую первый антиген, и клетку, экспрессирующую второй антиген, смешивают с анализируемой антигенсвязывающей молекулой и культивируют. Два антигена, экспрессируемых двумя клетками, соответственно, совместно активируются в присутствии анализируемой антигенсвязывающей молекулы, когда антигенсвязывающая молекула связывается с этими двумя антигенами одновременно. Следовательно, можно регистрировать изменение активационного сигнала, такое как повышение уровней последующего фосфорилирования антигенов. В другом варианте, в результате активации индуцируется продуцирование цитокинов. Следовательно, можно измерять количество продуцированных цитокинов, тем самым подтверждая присутствие или отсутствие одновременного связывания с двумя клетками.

Использованный в данном контексте термин "Fc область" означает область, включающую шарнирную область или ее часть и домены CH2 и CH3 в молекуле антитела. Fc область класса IgG означает, но не ограничиваясь только ими, фрагмент от цистеина 226 (нумерация Кабата или индекс EU, использованный в данном контексте) до С-конца или от пролина 230 до С-конца. Fc область предпочтительно можно получить при частичном расщеплении, например, моноклональных антител IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 протеолитическим ферментом, таким как пепсин, с последующей элюцией фракции с колонки с иммобилизованным белком А или белком G. Такой протеолитический фермент особо не ограничен, при условии, что фермент способен расщеплять полноразмерное антитело с образованием фрагментов Fab или F(ab')₂ в соответствующих для фермента условиях (например, pH). Примеры таких ферментов могут включать пепсин и папаин.

Использованный в настоящем описании термин "антигенсвязывающая молекула" особо не ограничен при условии, что молекула включает "вариабельную область антитела" по настоящему изобретению. Антигенсвязывающая молекула может дополнительно включать пептид или белок длиной приблизительно 5 или более аминокислотных остатков. Пептид или белок не ограничивается пептидом или белком, полученными из организма, и может означать, например, полипептид, содержащий искусственную последовательность. Можно также использовать природный полипептид, синтетический полипептид, рекомбинантный полипептид или т.п.

Предпочтительные примеры антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению могут включать антигенсвязывающую молекулу, содержащую Fc область антитела.

В качестве "Fc-области" по настоящему изобретению можно использовать, например, природный IgG. В этом контексте природный IgG означает полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, идентичную природному IgG, и относится к классу антител, которые в основном кодируются геном гамма-иммуноглобулинов. Природные IgG человека означают, например, природный IgG1 человека, природный IgG2 человека, природный IgG3 человека или природные IgG4 человека. Природные IgG также включают варианты или подобные соединения, полученные из них самопроизвольно. Множество аллотипичных последовательностей на основе генного полиморфизма описаны в качестве консервативных областей IgG1 человека, IgG2 человека, IgG3 человека и IgG4 человека в списке иммунологических белков, см. публикацию национального Института здоровья NIH No. 91-3242, причем в настоящем изобретении можно использовать любой из этих иммуноглобулинов. Прежде всего последовательность IgG1 человека может содержать аминокислотные последовательности DEL или EEM, согласно нумерации Кабата фрагмент 356-358.

Было установлено, что область Fc антитела представляет собой Fc область иммуноглобулинов типа

IgA1, IgA2, IgD, IgE, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 или IgM. В качестве Fc области антитела по настоящему изобретению можно использовать, например, Fc область из природного IgG человека. В качестве Fc области антитела по настоящему изобретению можно использовать Fc область из консервативной области природного IgG, более подробно, можно использовать консервативную область (SEQ ID NO: 1), полученную из природного IgG1 человека, консервативную область (SEQ ID NO: 2), полученную из природного IgG2 человека, консервативную область (SEQ ID NO: 3), полученную из природного IgG3 человека, или консервативную область (SEQ ID NO: 4), полученную из природного IgG4 человека. Консервативная область природного IgG также включает варианты или подобные соединения, полученные из них самопроизвольно.

Fc область по настоящему изобретению предпочтительно и прежде всего представляет собой Fc область, обладающую сниженной связывающей активностью с рецептором Fcγ. В этом контексте рецептор Fcγ (называемый в данном контексте FcγR) означает рецептор, способный связываться с Fc областью IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, и означает любой член семейства белков, в основном кодируемых генами рецептора Fcγ. В организме человека это семейство включает, но не ограничиваясь только ими: FcγRI (CD64), включая изоформы FcγRIa, FcγRIb или FcγRIc; FcγRII (CD32), включая изоформы FcγRIIa (включая аллотипы H131 (H тип) и R131 (R тип)), FcγRIIb (включая FcγRIIb-1 и FcγRIIb-2), и FcγRIIc; и FcγRIII (CD16), включая изоформы FcγRIIIa (включая аллотипы V158 и F158) и FcγRIIIb (включая аллотипы FcγRIIIb-NA1 и FcγRIIIb-NA2); и любые еще не открытые FcγR или изоформу или аллотип FcγR человека. FcγR включает формы, выделенные из организма человека, мышей, крыс, кроликов и обезьян. FcγR не ограничивается этими молекулами и его можно получить из любого организма. Мышиные FcγR включают, но, не ограничиваясь только ими, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) и FcγRIII-2 (CD16-2), и любые еще не открытые мышиные FcγR или изоформу или аллотип FcγR. Предпочтительные примеры таких рецепторов Fcγ включают FcγRI (CD64), FcγRIIa (CD32), FcγRIIb (CD32), FcγRIIIa (CD16) и/или FcγRIIIb (CD16) человека.

FcγR найден в формах активирующего рецептора, содержащего ITAM (мотив на основе активированного тирозинового иммунорецептора) и ингибирующего рецептора, содержащего ITIM (мотив на основе ингибирующего тирозинового иммунорецептора). FcγR классифицируют на активирующий FcγR (FcγRI, FcγRIIa R, FcγRIIa H, FcγRIIIa и FcγRIIIb) ингибирующий FcγR (FcγRIIb).

Полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность FcγR указана в перечне NM_000566.3 и NP_000557.1, соответственно; полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность FcγRIIa указана в перечне BC020823.1 и AAN20823.1, соответственно; полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность FcγRIIb указана в перечне BC146678.1 и AAI46679.1, соответственно; полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность FcγRIIIa указана в перечне BC033678.1 и AAN33678.1, соответственно; и полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность FcγRIIIb указана в перечне BC128562.1 и AAI28563.1, соответственно (номера регистрации RefSeq). FcγRIIa характеризуется двумя типами генного полиморфизма, где 131-й аминокислотный остаток в последовательности FcγRIIa заменен на остаток гистидина (H тип) или аргинина (R тип) (J. Exp. Med. 172, 19-25, 1990). FcγRIIb характеризуется двумя типами генного полиморфизма, где 232-ой аминокислотный остаток в последовательности FcγRIIb заменен на остаток изолейцина (I тип) или треонина (T тип) (Arthritis. Rheum. 46: 1242-1254 (2002)). FcγRIIIa характеризуется двумя типами генного полиморфизма, где 158-ой аминокислотный остаток в последовательности FcγRIIIa заменен на остаток валина (V тип) или фенилаланина (F тип) (J. Clin. Invest. 100 (5): 1059-1070 (1997)). FcγRIIIb характеризуется двумя типами генного полиморфизма (NA1 тип и NA2 тип) (J. Clin. Invest. 85: 1287-1295 (1990)).

Сниженную связывающую активность с рецептором Fcγ можно подтверждать широко распространенным методом, таким как FACS, ИФА, ALPHAScreen (гомогенный анализ усиленной за счет эффекта близости люминесценции) или метод BIACORE на основе явления поверхностного плазмонного резонанса (ППР) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (11), 4005-4010 (2006)).

Анализ ALPHAScreen проводят по технологии ALPHA с использованием двух типов гранул (донорных и акцепторных) на основе следующего принципа: люминесцентный сигнал детектируется только тогда, когда эти два типа гранул сближаются при биологическом взаимодействии молекулы, связанной с донорной гранулой, и молекулой, связанной с акцепторной гранулой. Активированный лазером фотосенсибилизатор в донорной грануле преобразовывает кислород воздуха в синглетный кислород в возбужденном состоянии. Синглетный кислород диффундирует вокруг донорной гранулы и достигает расположенной поблизости акцепторной гранулы, тем самым вызывая хемилюминесцентную реакцию в грануле, которая в конечном итоге излучает свет. В отсутствии взаимодействия между молекулой, связанной с донорной гранулой, и молекулой, связанной с акцепторной гранулой, синглетный кислород, генерируемый в донорной грануле, не достигает акцепторной гранулы. В результате хемилюминесцентная реакция не происходит.

Например, меченую биотином антигенсвязывающую молекулу, предназначенную для анализа, ин-

кубируют для связывания с донорной гранулой, в то время как рецептор Fc γ , меченый GST (глутатион-S-трансфераза), инкубируют для связывания с акцепторной гранулой. В отсутствие конкурирующей антигенсвязывающей молекулы, содержащей мутированную Fc область, антигенсвязывающая молекула, содержащая Fc область дикого типа, взаимодействует с рецептором Fc γ , при этом генерируются сигналы в интервале от 520 до 620 нм. Немеченая антигенсвязывающая молекула, содержащая мутированную Fc область, конкурирует с антигенсвязывающей молекулой, содержащей Fc область дикого типа, за взаимодействие с рецептором Fc γ . Снижение флуоресценции, вызванное конкуренцией, можно количественно определять, тем самым определяя относительную связывающую активность. Биотинилирование антигенсвязывающей молекулы (например, антитела) с использованием сульфо-NHS-биотина или подобных веществ известно в данной области техники. В рецептор Fc γ можно включить метку GST (глутатион-S-трансфераза) с помощью специально оптимизированного метода, который включает, например, слияние полинуклеотида, кодирующего рецептор Fc γ в расплаве с полинуклеотидом, кодирующим GST, и осуществление экспрессии полученного гибридного гена в клетках или в аналогичных векторах-носителях, способных к их экспрессии, а затем очистка на колонке с иммобилизованным глутатионом. Полученные сигналы предпочтительно анализируют с использованием, например, программного обеспечения GRAPHPAD PRISM (GraphPad Software, Inc., Сан Диего), оптимизированного для модели конкуренции с одним участком взаимодействия на основе нелинейного регрессионного анализа.

Одно из веществ (лиганд), между которыми должно наблюдаться взаимодействие, иммобилизуют на тонкую золотую пленку сенсорного чипа. Сенсорный чип снизу облучают светом таким образом, чтобы полное отражение происходило на границе раздела между тонкой золотой пленкой и стеклом. В результате в части отраженного света формируется участок с падением интенсивности отражения (сигнал ППР). Одно из других веществ (анализируемое вещество), между которыми должно наблюдаться взаимодействие, вводят на поверхность сенсорного чипа. В процессе связывания анализируемого вещества с лигандом масса иммобилизованной молекулы-лиганда возрастает, изменяя показатель преломления растворителя на поверхности сенсорного чипа. Такое изменение показателя преломления сдвигает положение сигнала ППР (и наоборот, диссоциация связанных молекул сдвигает сигнал в исходное положение). В системе Biacore на оси ординат отложена величина сдвига, то есть изменение массы на поверхности сенсорного чипа, и отображается зависящее от времени изменение по массе в виде данных анализа (сенсограмма). По кривой на сенсограмме можно определить кинетику, то есть константу скорости ассоциации (k_a) и константу скорости диссоциации (k_d), в то время как константу аффинности (K_D) можно определить по соотношению этих констант. Анализ ингибирования также предпочтительно проводить методом Biacore. Примеры анализа ингибирования описаны в статье Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103 (11), 4005-4010 (2006).

В настоящем описании сниженная связывающая активность с рецептором Fc γ означает, что анализируемая антигенсвязывающая молекула проявляет связывающую активность, например, 50% активности или менее, предпочтительно 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, 30% или менее, 20% или менее, или 15% или менее, прежде всего предпочтительно 10% или менее, 9% или менее, 8% или менее, 7% или менее, 6% или менее, 5% или менее, 4% или менее, 3% или менее, 2% или менее, или 1% или менее, по сравнению со связывающей активностью контрольной антигенсвязывающей молекулы, содержащей область Fc, по данным анализа, описанного выше.

В качестве контрольной антигенсвязывающей молекулы можно соответственно использовать антигенсвязывающую молекулу, содержащую Fc область моноклональных антител IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Структура Fc области описана в последовательности SEQ ID NO: 1 (номер регистрации RefSeq No. AAC82527.1 с остатком A, добавленным на N-конце), SEQ ID NO: 2 (номер регистрации RefSeq No. AAB59393.1 с остатком A, добавленным на N-конце), SEQ ID NO: 3 (номер регистрации RefSeq No. CAA27268.1 с остатком A, добавленным на N-конце), или SEQ ID NO: 4 (номер регистрации RefSeq No. AAB59394.1 с остатком A, добавленным на N-конце). В случае использования в качестве анализируемого вещества антигенсвязывающей молекулы, содержащей вариант Fc области антитела определенного изотипа, в качестве контрольного вещества можно использовать антигенсвязывающую молекулу, содержащую Fc область антитела этого определенного изотипа, для исследования влияния мутации данного варианта на связывающую активность с рецептором Fc γ . Таким образом, подтверждается, что получена соответствующая антигенсвязывающая молекула, содержащая вариант Fc области, со сниженной связывающей активностью с рецептором Fc γ .

Например, в качестве такого варианта в предшествующем уровне техники описаны варианты со следующими изменениями: делеция 231A-238S (WO 2009/011941), C226S, C229S, P238S, (C220S) (J. Rheumatol (2007) 34, 11), C226S, C229S (Hum. Antibod. Hybridomas (1990) 1 (1), 47-54), C226S, C229S, E233P, L234V или L235A (Blood (2007) 109, 1185-1192) (нумерация этих аминокислотных остатков представлена согласно нумерации Кабата).

Предпочтительные примеры таких вариантов включают антигенсвязывающие молекулы, содержащие Fc область, полученную из Fc области антитела определенного изотипа при замещении любого из следующих составляющих аминокислотных остатков в положениях 220, 226, 229, 231, 232, 233, 234, 235,

236, 237, 238, 239, 240, 264, 265, 266, 267, 269, 270, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 325, 327, 328, 329, 330, 331 и 332, согласно нумерации Кабата. Изотип антитела, из которого получена Fc область, особо не ограничен и можно в равной степени использовать Fc область моноклонального антитела IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Предпочтительно использовать Fc область из природного антитела IgG1 человека.

Например, можно в равной степени использовать антигенсвязывающую молекулу, полученную из Fc области антитела IgG1 с помощью замен следующих групп составляющих аминокислот (номер соответствует положению аминокислотного остатка, определенному согласно нумерации Кабата, однобуквенный код аминокислоты, указанный до номера, означает аминокислотный остаток до замены, а однобуквенный код аминокислоты, указанный после номера, означает аминокислотный остаток после замены):

- (а) L234F, L235E и P331S,
- (б) C226S, C229S и P238S,
- (в) C226S и C229S и
- (г) C226S, C229S, E233P, L234V и L235A,

или с помощью делеции аминокислотной последовательности в положениях 231-239 согласно нумерации Кабата.

Можно в равной степени использовать антигенсвязывающую молекулу, полученную из Fc области антитела IgG2 с помощью замен следующих групп составляющих аминокислот (номер соответствует положению аминокислотного остатка, определенному согласно нумерации Кабата, однобуквенный код аминокислоты, указанный до номера, означает аминокислотный остаток до замены, а однобуквенный код аминокислоты, указанный после номера, означает аминокислотный остаток после замены):

- (д) H268Q, V309L, A330S и P331S,
- (е) V234A,
- (ж) G237A,
- (з) V234A и G237A, (и) A235E и G237A и
- (к) V234A, A235E и G237A.

Можно в равной степени использовать антигенсвязывающую молекулу, полученную из Fc области антитела IgG3 с помощью замен следующих групп составляющих аминокислот (номер соответствует положению аминокислотного остатка, определенному согласно нумерации Кабата, однобуквенный код аминокислоты, указанный до номера, означает аминокислотный остаток до замены, а однобуквенный код аминокислоты, указанный после номера, означает аминокислотный остаток после замены): (л) F241A, (м) D265A и (н) V264A.

Можно в равной степени использовать антигенсвязывающую молекулу, полученную из Fc области антитела IgG4 с помощью замен следующих групп составляющих аминокислот (номер соответствует положению аминокислотного остатка, определенному согласно нумерации Кабата, однобуквенный код аминокислоты, указанный до номера, означает аминокислотный остаток до замены, а однобуквенный код аминокислоты, указанный после номера, означает аминокислотный остаток после замены): (о) L235A, G237A и E318A, (п) L235E и (р) F234A и L235A.

Другие предпочтительные примеры таких замен включают антигенсвязывающую молекулу, полученную из Fc области природного IgG1 человека с помощью замен следующих составляющих аминокислот: 233, 234, 235, 236, 237, 327, 330 и 331, определенных согласно нумерации Кабата, на аминокислотный остаток Fc области в соответствующем положении согласно нумерации Кабата из аналогичной последовательности IgG2 или IgG4.

Другие предпочтительные примеры таких замен включают антигенсвязывающую молекулу, полученную из Fc области природного IgG1 человека с помощью замены любого одного или более следующих составляющих аминокислот: 234, 235 и 297, определенных согласно нумерации Кабата, на другой аминокислотный остаток. Тип аминокислотного остатка, на который была произведена замена, особо не ограничен. Прежде всего предпочтительна антигенсвязывающая молекула, содержащая Fc область с любой одной или более заменами аминокислотных остатков в положениях 234, 235 и 297 на остаток аланина.

Другие предпочтительные примеры таких замен включают антигенсвязывающую молекулу, полученную из Fc области природного IgG1 человека с помощью замены составляющего аминокислотного остатка в положении 265, определенного согласно нумерации Кабата, на другой аминокислотный остаток. Тип аминокислотного остатка, на который была произведена замена, особо не ограничен. Прежде всего предпочтительна антигенсвязывающая молекула, содержащая Fc область с заменой аминокислотного остатка в положениях 265 на остаток аланина.

Предпочтительной формой "антигенсвязывающей молекулы" по настоящему изобретению может являться, например, мультиспецифичное антитело, включающее вариабельную область по настоящему изобретению.

Для ассоциации мультиспецифичного антитела можно использовать метод подавления нежелательной ассоциации между тяжелыми цепями H с помощью введения отталкивающего электрического заряда на границу раздела между вторыми консервативными доменами (CH2) и третьими консервативными до-

менами (СНЗ) в составе тяжелых цепей антитела (WO2006/106905).

В способе подавления нежелательной ассоциации между тяжелыми цепями Н с помощью введения отталкивающего электрического заряда на границу раздела СН2 или СНЗ, примеры аминокислотных остатков, контактирующих друг с другом на границе раздела между консервативными доменами тяжелой цепи Н, могут включать остаток 356 согласно нумерации Кабата, остаток 439 согласно нумерации Кабата, остаток 357 согласно нумерации Кабата, остаток 370 согласно нумерации Кабата, остаток 399 согласно нумерации Кабата и остаток 409 согласно нумерации Кабата в одном СНЗ домене, и их соответствующие остатки в другом домене СНЗ.

Более подробно, например, антитело, включающее два домена СНЗ в тяжелой цепи, можно получить в форме антитела, в котором от одной до трех пар аминокислотных остатков, выбранных из следующих пар аминокислотных остатков (1)-(3) в первой тяжелой цепи, домен СНЗ несет тот же самый электрический заряд:

(1) аминокислотные остатки 356 и 439 согласно нумерации Кабата, содержащиеся в СНЗ домене тяжелой цепи,

(2) аминокислотные остатки 357 и 370 согласно нумерации Кабата, содержащиеся в СНЗ домене тяжелой цепи, и

(3) аминокислотные остатки 399 и 409, содержащиеся в СНЗ домене тяжелой цепи.

Кроме того, антитело можно получить в форме антитела, в котором от одной до трех пар аминокислотных остатков, выбранных из следующих пар аминокислотных остатков (1)-(3) во второй тяжелой цепи, домен СНЗ отличается от домена СНЗ первой тяжелой цепи таким образом, что он несет тот же самый электрический заряд, что и домен СНЗ в первой тяжелой цепи, но противоположный заряд в отличие от соответствующих аминокислотных остатков домена СНЗ в первой тяжелой цепи.

Каждый аминокислотный остаток, описанный в парах (1)-(3), расположен вблизи своего компонента в ассоциированных тяжелых цепях Н. Специалист в данной области техники сможет выбрать соответствующие аминокислотные остатки, описанные в каждой паре (1)-(3) в требуемых доменах СНЗ тяжелой цепи или консервативных доменах тяжелой цепи с использованием гомологичного моделирования или подобных методов и соответствующего коммерческого программного обеспечения, и соответственным образом изменить аминокислотные остатки в выбранных положениях.

В антителе, описанном выше, каждый из "остатков, несущих электрический заряд", предпочтительно выбирают, например, из аминокислотных остатков, включенных в любую из следующих групп (а) и (б):

(а) глутаминовая кислота (Е) и аспарагиновая кислота (D), и

(б) лизин (K), аргинин (R) и гистидин (H).

В антителе, описанном выше, выражение "несущий тот же самый электрический заряд" означает, что, например, все из двух или более аминокислотных остатков являются аминокислотными остатками, включенными в любую из групп (а) и (б). Выражение "несущие противоположный электрический заряд" означает, что, например, один аминокислотный остаток из двух или более аминокислотных остатков может относиться к любой из групп (а) и (б), в то время как другой аминокислотный остаток (остатки) может относиться к аминокислотному остатку (остаткам), включенным в другую группу.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения, антитело может содержать домен СНЗ первой тяжелой цепи и домен СНЗ второй тяжелой цепи, соединенные дисульфидной связью.

Изменяемый аминокислотный остаток по настоящему изобретению не ограничен аминокислотным остатком в варибельной области антитела или консервативной области антитела, указанных выше. Специалист в данной области техники может выбрать аминокислотные остатки, составляющие границу раздела в полипептидном варианте или гетеромультимере методом гомологичного моделирования или подобным методом с использованием коммерческого программного обеспечения и изменить аминокислотный остаток для регуляции ассоциации.

Ассоциацию для формирования мультиспецифичного антитела по настоящему изобретению можно также проводить по альтернативной методике, известной в данной области техники. Боковую цепь аминокислотного остатка, присутствующую в варибельной области одной тяжелой цепи антитела, заменяют на более длинную боковую цепь (выступ), а боковую цепь ее компонента, присутствующую в варибельном домене другой тяжелой цепи, заменяют на более короткую боковую цепь (углубление). Выступ может располагаться в углублении, что эффективно способствует ассоциации полипептидов Fc доменов (WO1996/027011; Ridgway JB и др., Protein Engineering 9, 617-621 (1996), и Merchant AM и др., Nature Biotechnology 16, 677-681 (1998)).

Кроме этого метода, для формирования мультиспецифичного антитела по настоящему изобретению можно использовать другой метод, известный в данной области техники. Часть СНЗ одной тяжелой цепи антитела превращают в полученную из IgA последовательность ее компонента, а комплементарную часть в СНЗ другой тяжелой цепи превращают в полученную из IgA последовательность ее компонента. Применение полученного методом геной инженерии (обмен цепей) домена СНЗ может вызвать эффективную ассоциацию между полипептидами с различной последовательностью за счет комплементарной ассоциации СНЗ (Protein Engineering Design & Selection, 23; 195-202, (2010)). С использованием этого

метода, известного в данной области техники, можно также эффективно получить исследуемое мультиспецифичное антитело.

В другом варианте мультиспецифичное антитело можно получить, например, по технологии формирования антител с использованием ассоциации антител CH1-CL и VH-VL, как описано в заявке WO2011/028952, по технологии получения биспецифичного антитела с использованием отдельных моноклональных антител (обмен плечей Fab), как описано в заявках WO2008/119353 и WO2011/131746, по технологии контроля ассоциации доменов CH3 тяжелых цепей антител, как описано в заявках WO2012/058768 и WO2013/063702, по технологии получения биспецифичного антитела, состоящего из двух типов легких цепей и одного типа тяжелой цепи, как описано в заявке WO2012/023053, или по технологии получения биспецифичного антитела с использованием двух бактериальных клеточных линий, каждая из которых экспрессирует половину молекулы антитела, состоящую из одной тяжелой цепи H и одной легкой цепи L, как описано в статье Christoph и др. (Nature Biotechnology Vol. 31, p. 753-758 (2013)). Кроме этих методов ассоциации для получения мультиспецифичной или мультипаратописической антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению можно также использовать технологию CrossMab, известную как технологию гетероассоциации легкой цепи, формирующей вариабельную область, связанную с первым эпитопом, и легкой цепи, формирующей вариабельную область, связанную со вторым эпитопом, с тяжелой цепью, формирующей вариабельную область, связанную с первым эпитопом, и тяжелой цепью, формирующей вариабельную область, связанную со вторым эпитопом, соответственно (Scaefers и др., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 108, 11187-11192 (2011)). Примеры технологии получения биспецифического антитела с использованием полученных отдельно моноклональных антител могут включать способ, который включает стимуляцию гетеродимеризации антител при включении моноклональных антител с конкретной аминокислотной заменой в домене CH3 тяжелой цепи в восстанавливающих условиях для получения требуемого биспецифического антитела. Примеры положений аминокислотных замен, предпочтительных для этого метода, могут включать остаток 392 согласно нумерации Кабата и остаток 397 согласно нумерации EU в домене CH3. Более того, биспецифическое антитело можно получить при использовании антитела, в котором от одной до трех пар аминокислотных остатков, выбранных из следующих пар аминокислотных остатков (1)-(3) в первой тяжелой цепи, домен CH3 несет тот же самый электрический заряд:

(1) аминокислотные остатки 356 и 439 согласно нумерации EU, содержащиеся в CH3 домене тяжелой цепи,

(2) аминокислотные остатки 357 и 370 согласно нумерации EU, содержащиеся в CH3 домене тяжелой цепи, и

(3) аминокислотные остатки 399 и 409, содержащиеся в CH3 домене тяжелой цепи.

Биспецифическое антитело можно также получить при использовании антитела, в котором от одной до трех пар аминокислотных остатков, выбранных из следующих пар аминокислотных остатков (1)-(3) во второй тяжелой цепи, домен CH3 отличается от домена CH3 первой тяжелой цепи таким образом, что он несет тот же самый электрический заряд, что и домен CH3 в первой тяжелой цепи, но несет противоположный заряд в отличие от соответствующих аминокислотных остатков домена CH3 в первой тяжелой цепи.

Даже если нельзя эффективно сформировать представляющее интерес мультиспецифическое антитело, его можно получить с помощью выделения и очистки представляющего интерес антитела из множества продуцируемых антител. Например, ранее описанный метод включает введение аминокислотной замены в вариабельные домены двух типов представляющих интерес тяжелых цепей с целью изменить изоэлектрические точки (ИЭТ) этих цепей таким образом, чтобы обеспечить очистку двух типов гомодимеров и гетеродимеров антител, каждого в отдельности, методом ионно-обменной хроматографии (WO2007114325). Ранее в качестве метода очистки гетеродимеров был опубликован метод, включающий использование белка А для очистки гетеродимера антитела, включающего тяжелую цепь Н мышинового антитела IgG2a, способную связываться с белком А, и тяжелую цепь Н антитела IgG2 в крысы, не способную связываться с белком А (WO98050431 и WO95033844). В другом варианте, аминокислотные остатки 435 и 436 согласно нумерации Кабата, которые содержатся в участке связывания белка А в составе IgG, можно заменить на аминокислоты, такие как Туг и His, которые обеспечивают различную силу связывания с белком А, и полученную тяжелую цепь Н использовать для взаимодействия каждой цепи Н с белком А. В результате с использованием колонки с иммобилизованным белком А можно эффективно очищать только гетеродимер антител.

Множество двух или более таких методов, например, можно использовать в комбинации. Такие методы можно также применять отдельно для двух тяжелых цепей, предназначенных для ассоциации. На основе антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению, но отдельно от измененной таким образом формы, можно получить антигенсвязывающую молекулу с идентичной этим формам аминокислотной последовательностью.

Изменение аминокислотной последовательности можно осуществлять различными известными в данной области техники методами. Примеры таких методов, которые можно использовать, включают, но не ограничиваясь только ими, сайт-направленный мутагенез (Hashimoto-Gotoh T, Mizuno T, Ogasahara Y.

и Nakagawa M., An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis, *Gene* 152, 271-275 (1995), Zoller MJ и Smith M., Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors, *Methods Enzymol.* 100, 468-500 (1983), Kramer W, Drutsa V, Jansen HW, Kramer B, Pflugfelder M. и Fritz HJ, The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction, *Nucleic Acids Res.* 12, 9441-9456 (1984), Kramer W и Fritz HJ, Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA, *Methods. Enzymol.* 154, 350-367 (1987) и Kunkel TA, Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82, 488-492 (1985)), ПЦП-мутагенез и кассетный мутагенез.

"Антигенсвязывающая молекула" по настоящему изобретению может представлять собой фрагмент антитела, который включает обе тяжелую цепь и легкую цепь, составляющие "вариабельную область антитела" по настоящему изобретению в единой полипептидной цепи, но не содержащие консервативную область. Таким фрагментом антитела может являться, например, диатело (Db), одноцепочечное антитело или $sc(Fab')_2$.

Db представляет собой димер, состоящий из двух полипептидных цепей (например, Holliger P и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993), EP404097 и WO93/11161). Эти полипептидные цепи соединены через короткий линкер длиной, например, приблизительно 5 аминокислотных остатков, так что вариабельный домен цепи L (VL) и вариабельный домен цепи H (VH) в составе одной и той же полипептидной цепи не могут ассоциировать друг с другом.

За счет такого короткого линкера VH и VL, кодируемые на одной полипептидной цепи, не могут образовывать одноцепочечный Fv, а наоборот димеризуются с VH и VL, соответственно, на другой полипептидной цепи, формируя два антигенсвязывающих участка.

Примеры одноцепочечного антитела, включают $sc(Fv)_2$. Фрагмент $sc(Fv)_2$ представляет собой одноцепочечное антитело, содержащее одну цепь, состоящую из четырех вариабельных доменов, то есть из двух VL и двух VH, соединенных через линкеры, такие как пептидные линкеры (*J Immunol. Methods* 231 (1-2), 177-189 (1999)). Эти две VL и VH можно получить из различных моноклональных антител. Предпочтительные примеры таких фрагментов включают биспецифичные $sc(Fv)_2$, которые распознают два типа эпитопов, присутствующих в одном и том же антигене, как описано в статье *Journal of Immunology* 152 (11), 5368-5374 (1994). Фрагмент $sc(Fv)_2$ можно получить известным в данной области техники. Например, фрагмент $sc(Fv)_2$ можно получить при соединении двух $sc(Fv)$ через линкер, такой как пептидный линкер.

Примеры конфигурации антигенсвязывающих доменов, состоящих из $sc(Fv)_2$, описанных в данном контексте, включают антитело, в котором две цепи VH и две цепи VL расположены в следующем порядке: VH, VL, VH и VL (т.е. [VH]-линкер-[VL]-линкер-[VH]-линкер-[VL]), начиная с N-конца одноцепочечного полипептида. Порядок расположения двух VH и двух VL особо не ограничен конфигурацией, и они могут располагаться в любом порядке. Примеры такого расположения включают следующие конфигурации:

[VL]-линкер-[VH]-линкер-[VH]-линкер-[VL],
[VH]-линкер-[VL]-линкер-[VL]-линкер-[VH],
[VH]-линкер-[VH]-линкер-[VL]-линкер-[VL],
[VL]-линкер-[VL]-линкер-[VH]-линкер-[VH] и
[VL]-линкер-[VH]-линкер-[VL]-линкер-[VH].

Молекулярная форма $sc(Fv)_2$ также подробно описана в заявке WO2006/132352. На основе настоящего описания специалист в данной области техники может соответственным образом получить требуемый фрагмент $sc(Fv)_2$ для получения антигенсвязывающей молекулы, описанной в настоящем контексте.

Антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению можно конъюгировать с полимерным носителем, таким как ПЭГ или органическое соединение, такое как противораковый агент. Предпочтительно для придания требуемого действия в антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению можно также включить углеводную цепь при вставке гликозилированной последовательности.

Например, для присоединения вариабельных доменов антител можно использовать произвольный пептидный линкер, который можно включить методом генной инженерии, или синтетическое соединение-линкер (например, соединение, описанное в статье *Protein Engineering*, 9 (3), 299-305 (1996)). В настоящем изобретении предпочтительным является пептидный линкер. Длина пептидного линкера особо не ограничена и специалист в данной области техники может ее соответственным образом выбрать согласно назначению. Длина предпочтительно составляет 5 или более аминокислотных остатков (верхний предел особо не ограничен и обычно составляет 30 аминокислот или менее, предпочтительно 20 аминокислот или менее, прежде всего 15 аминокислот. Если $sc(Fv)_2$ содержит три пептидных линкера, все эти использованные пептидные линкеры характеризуются одинаковой длиной или различными длинами.

Примеры пептидных линкеров могут включать следующие последовательности:

Ser, Gly-Ser, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 5),
Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 6),
Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 7),
Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 8),

Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 9),
 Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 10),
 Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 11),
 Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 12),
 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 7))_n и
 (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 8))_n,
 где n равен целому числу 1 или более.

Однако длину или последовательность пептидного линкера может выбрать специалист в данной области техники согласно назначению.

Синтетическое соединение-линкер (химический сшивающий агент) представляет собой сшивающий агент, обычно используемый для сшивки пептидов, например, N-гидроксисукцинимид (NHS), дисукцинимидилсуберат (DSS), бис(сульфосукцинимидил)суберат (BS3), дитиобис(сукцинимидилпропионат) (DSP), дитиобис(сульфосукцинимидил)пропионат (DTSSP), этиленгликоль бис(сукцинимидилсукцинат) (EGS), этиленгликоль бис(сульфосукцинимидилсукцинат) (сульфо-EGS), дисульфосукцинимидилтарtrat (сульфо-DST), бис[2-(сукцинимидоксикарбонилокси)этил]сульфон (BSOCOES) или бис[2-(сульфосукцинимидоксикарбонилокси)этил]сульфон (сульфо-BSOCOES). Эти сшивающие агенты выпускаются фирмами.

Для соединения четырех вариабельных доменов антитела обычно используют три линкера. Все эти использованные линкеры могут быть одинаковыми или различными.

Фрагмент F(ab')₂ включает две легких цепи и две тяжелых цепи, содержащих консервативную область (домены CH1 и часть доменов CH2), таким образом, образуется дисульфидная связь между этими двумя тяжелыми цепями.

Фрагмент F(ab')₂, составляющий полипептидный ассоциат, описанный в данном контексте, можно предпочтительно получить в условиях частичного расщепления, например, при расщеплении полноразмерного моноклонального антитела, содержащего требуемые антигенсвязывающие домены, протеолитическим ферментом, таким как пепсин, с последующим удалением фрагмента Fc, адсорбированного на колонке с иммобилизованным белком А. Такой протеолитический фермент особо не ограничен при условии, что фермент способен расщеплять полноразмерное антитело с образованием ограниченной формы F(ab')₂ в соответствующих для фермента условиях (например, pH). Примеры таких ферментов включают пепсин и фицин.

Антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению может дополнительно содержать другие изменения кроме изменений аминокислотных остатков, указанных выше. Дополнительные изменения можно выбрать, например, из замены, делеции или модификации аминокислоты, и их комбинаций.

Например, антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению можно дополнительно изменить произвольным способом, в основном не изменяя требуемые функции молекулы. Такую мутацию можно провести, например, с помощью замены консервативных аминокислотных остатков. В другом варианте даже изменение с целью изменения требуемых функций антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению можно проводить при условии, что функции, измененные в результате такого изменения, включены в объем объекта настоящего изобретения.

Изменение аминокислотной последовательности по настоящему изобретению также включает пост-трансляционную модификацию. Более подробно, пост-трансляционная модификация может означать вставку или делецию углеводной цепи. Антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению, например, содержащая консервативную область IgG1-типа, может содержать аминокислотный остаток в положении 297 согласно нумерации EU с модифицированной углеводной цепью. Структура углеводной цепи для использования при модификации не ограничена. В основном антитела, экспрессированные эукариотическими клетками, включают модификацию углеводной цепи в их консервативных областях. Таким образом, антитела, экспрессированные следующими клетками, обычно включают модификацию некоторых углеводных цепей: продуцирующие антитела клетки млекопитающих, и эукариотические клетки, трансформированные экспрессионными векторами, включающими ДНК, которые кодируют антитела.

В данном контексте эукариотические клетки включают дрожжевые и животные клетки. Например, типичными животными клетками, предназначенными для трансформации экспрессионными векторами, включающими ДНК, которые кодируют антитела, являются клетки CHO или HEK293H. С другой стороны, антитела по настоящему изобретению также включают антитела, в которых отсутствуют модифицированные углеводные цепи в указанном положении. Антитела с немодифицированными углеводными цепями в составе консервативных областей можно получить с использованием экспрессии генов, кодирующих эти антитела в прокариотических клетках, таких как *E. coli*.

Более подробно, дополнительное изменение согласно настоящему изобретению можно проводить, например, при включении сиаловой кислоты в углеводную цепь в составе Fc области (mAbs. 2 (5): 519-527 (2010 Sep-Oct)).

Если антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению содержит Fc область, можно дополнительно провести замену аминокислотных остатков для улучшения связывающей активности с FcRn

(J Immunol. 176 (1): 346-356 (2006 Jan 1), J Biol Chem. 281 (33): 23514-23524 (2006 Aug 18), Int Immunol. 18 (12): 1759-1769 (2006 Dec), Nat Biotechnol. 28 (2): 157-159 (2010 Feb), WO2006/019447, WO2006/053301 и WO2009/086320) или замену аминокислотных остатков для улучшения гетерогенности или стабильности антител (WO2009/041613).

Термин "антитело" в настоящем изобретении использован в самом широком смысле и также включает любое антитело, такое как моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела, варианты антител, фрагменты антител, мультиспецифичные антитела (например, биспецифичные антитела), гибридные антитела и гуманизированные антитела, при условии, что антитело проявляет требуемую биологическую активность.

Антитело по настоящему изобретению не ограничено типом его антигена, его источником и т.п., и может представлять собой любое антитело. Примеры источников антител могут включать, но, не ограничиваясь только ими, антитела человека, мышинные антитела, крысиные антитела и кроличьи антитела.

Антитела можно получать известным в данной области техники методом. Например, моноклональные антитела можно продуцировать гибридным методом (Kohler и Milstein, Nature 256: 495 (1975)) или рекомбинантным методом (патент U.S No. 4816567). В другом варианте моноклональные антитела можно выделять из библиотек с фаговым отображением антител (Clackson и др., Nature 352: 624-628 (1991) и Marks и др., J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991)). Моноклональные антитела можно также выделять из клонов целой В клетки (N. Biotechnol. 28 (5): 253-457 (2011)).

Гуманизированные антитела называются также реконструированными антителами человека. Более подробно, например, в данной области техники известно гуманизированное антитело, содержащее антитело человека с CDR-привитым нечеловеческим животным антителом (например, мышинным). Для получения гуманизированных антител известны также подходы на основе рекомбинации основных генов. Более подробно, например, в данной области техники в качестве метода для прививки мышинных антител к FR областям человека известен метод ПЦР с перекрывающимися праймерами.

ДНК, кодирующие вариабельные домены антител, каждый из которых содержит соединенные три области CDR и четыре FR области, и ДНК, кодирующие консервативные домены антител человека, можно вставлять в экспрессионные векторы таким образом, чтобы сформировать гибридный продукт ДНК вариабельных доменов и ДНК консервативных доменов в рамке считывания и получить векторы для экспрессии гуманизированного антитела. Эти векторы со вставками трансформируют в организмы хозяина, чтобы получить рекомбинантные клетки. Затем рекомбинантные клетки культивируют для экспрессии ДНК, кодирующих гуманизированные антитела, и получают гуманизированные антитела в культурах культивированных клеток (см. European Patent Publication No. EP 239400 and International Publication No. WO1996/002576).

При необходимости аминокислотный остаток (остатки) в FR фрагменте можно заменить таким образом, что области CDR реконструированного антитела будут образовывать соответствующий антигенсвязывающий участок. Например, аминокислотную последовательность FR фрагмента можно изменить с помощью мутации методом ПЦР, который используют для прививки мышинных CDR на FR фрагменты человека.

Требуемое антитело человека можно получить в процессе иммунизации ДНК с использованием трансгенных животных, у которых имеется весь набор генов антител человека (см. International Publication No. WO1993/012227, WO1992/003918, WO1994/002602, WO1994/025585, WO1996/034096 и WO1996/033735), что и у иммунизированных животных.

Кроме того, известен метод получения антител человека, так называемый пэннинг-метод (фракционирования и сортировки клеток), с использованием библиотеки антител. Например, V область антитела человека экспрессируют в виде одноцепочечного антитела (scFv) на поверхности фага методом фагового дисплея. Затем можно выбрать фаг, экспрессирующий антигенсвязывающий scFv. Ген выбранного фага можно анализировать для определения последовательности ДНК, кодирующей V область антигенсвязывающего антитела человека. После определения последовательности ДНК антигенсвязывающего scFv, последовательность V области можно получить в виде гибридного продукта с требуемой последовательностью C области антитела человека, а затем включить в соответствующие экспрессионные векторы для получения экспрессионных векторов. Экспрессионные векторы переносят в предпочтительные экспрессионные клетки, перечисленные выше, для экспрессии генов, кодирующих антитела человека, и получают антитела человека. Эти методы уже известны в данной области техники (см. International Publication No. WO1992/001047, WO1992/020791, WO1993/006213, WO1993/011236, WO1993/019172, WO1995/001438 и WO1995/015388).

Вариабельные области, составляющие антитело по настоящему изобретению, могут представлять собой вариабельные области, которые распознают произвольный антиген.

Использованный в настоящем описании термин "антиген" особо не ограничен, может быть любым антигеном. Примеры антигенов включают 17-1A, 4-1 BB, 4Dc, 6-кето-PGF1a, 8-изо-PGF2a, 8-оксо-dG, A1 аденозиновый рецептор, A33, ACE, ACE-2, активны A, активны AB, активны B, активны C, активны RIA, активны RIA ALK-2, активны RIB ALK-4, активны RIIA, активны RIIB, ADAM, ADAM10, ADAM12, ADAM15, ADAM17/TACE, ADAM8, ADAM9, ADAMTS, ADAMTS4, ADAMTS5, адресины,

адипонектин, АДФ-рибозилциклаза-1, aFGF, AGE, ALCAM, ALK, ALK-1, ALK-7, аллерген, альфа1-антихимотрипсин, альфа 1-антитрипсин, альфа-синуклеин, альфа-V/бета-1 антагонист, аминин, амилин, амилоид бета, варибельная область тяжелой цепи амилоидного иммуноглобулина, варибельная область легкой цепи амилоидного иммуноглобулина, андроген, ANG, ангиотензиноген, лиганд-2 ангиопоэтина, анти-Id, антитромбин III, антракс, APAF-1, APE, APJ, апо A1, сывороточный апо А амилоид, Аро-SAA, APP, APRIL, AR, ARC, ART, артемин, ASPARTIC, предсердный натрийуретический фактор, предсердный натрийуретический пептид, предсердные натрийуретические пептиды А, предсердные натрийуретические пептиды В, предсердные натрийуретические пептиды С, av/b3 интегрин, Axl, B7-1, B7-2, B7-H, BACE, BACE-1, протективный антиген сибирской язвы, Bad, BAFF, BAFF-R, Bag-1, BAK, Bax, BCA-1, BCAM, Bcl, BCMA, BDNF, b-ECGF, бета-2-микроглобулин, бета-лактамаза, bFGF, BID, Bik, BIM, BLC, BL-CAM, BLK, стимулятор В-лимфоцитов (BlyS), BMP, BMP-2 (BMP-2a), BMP-3 (остеогенин), BMP-4 (BMP-2b), BMP-5, BMP-6 (Vgr-1), BMP-7 (OP-1), BMP-8 (BMP-8a), BMPR, BMPR-IA (ALK-3), BMPR-IB (ALK-6), BMPR-II (BRK-3), BMPs, BOK, бомбезин, нейротрофический фактор костной ткани, гормон роста крупного рогатого скота, BPDE, BPDE-DNA, BRK-2, BTC, молекула клеточной адгезии Т лимфоцитов, C10, C1-ингибитор, C1q, C3, C3a, C4, C5, C5a (комплемент 5a), CA125, CAD-8, кадгерин-3, кальцитонин, цАМФ, карбоангидразу-IX, карциноэмбриональный антиген (CEA), карциномный антиген, кардиотрофин-1, катепсин А, катепсин В, катепсин С/DPP1, катепсин D, катепсин Е, катепсин Н, катепсин L, катепсин О, катепсин S, катепсин V, катепсин X/Z/P, CBL, CCL, CCK2, CCL, CCL1/I-309, CCL11/эотаксин, CCL12/MCP-5, CCL13/MCP-4, CCL14/HCC-1, CCL15/HCC-2, CCL16/HCC-4, CCL17/TARC, CCL18/PARC, CCL19/ELC, CCL2/MCP-1, CCL20/MIP-3- α , CCL21/SLC, CCL22/MDC, CCL23/MPIF-1, CCL24/эотаксин-2, CCL25/TECK, CCL26/эотаксин-3, CCL27/CTACK, CCL28/MC, CCL3/MIP-1- α , CCL3L1/LD-78-p, CCL4/MIP-1- β , CCL5/RANTES, CCL6/C10, CCL7/MCP-3, CCL8/MCP-2, CCL9/10/MTP-1- γ , CCR, CCR1, CCR10, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CD1, CD10, CD105, CD11a, CD11b, CD11c, CD123, CD13, CD137, CD138, CD14, CD140a, CD146, CD147, CD148, CD15, CD152, CD16, CD164, CD18, CD19, CD2, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD26, CD27L, CD28, CD29, CD3, CD30, CD30L, CD32, CD33 (белки p67), CD34, CD37, CD38, CD3E, CD4, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD49a, CD49b, CD5, CD51, CD52, CD54, CD55, CD56, CD6, CD61, CD64, CD66e, CD7, CD70, CD74, CD8, CD80 (B7-1), CD89, CD95, CD105, CD158a, CEA, CEACAM5, CFTR, cGMP, рецептор CGRP, CINC, CKb8-1, клаудин 18, CLC, токсин clostridium botulinum, токсин clostridium difficile, токсин clostridium perfringens, c-Met, CMV, CMV UL, CNTF, CNTN-1, фактор комплемента 3 (C3), фактор комплемента D, кортикостероид-связывающий глобулин, рецептор колониестимулирующего фактора-1, COX, C-Ret, CRG-2, CRTH2, CT-1, CTACK, CTGF, CTLA-4, CX3CL1/фракталкин, CX3CR1, CXCL, CXCL1/Gro- α , CXCL10, CXCL11/I-TAC, CXCL12/SDF-1- α/β , CXCL13/BCA-1, CXCL14/BRACK, CXCL15/лангкин (Lungkine), CXCL16, CXCL16, CXCL2/Gro- β , CXCL3/Gro- γ , CXCL3, CXCL4/PF4, CXCL5/ENA-78, CXCL6/GCP-2, CXCL7/NAP-2, CXCL8/IL-8, CXCL9/Mig, CXCL10/IP-10, CXCR, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, CXCR6, цистатин С, цитокератин-опухоль-ассоциированный антиген, DAN, DCC, DcR3, DC-SIGN, фактор ускорения распада, лиганд 4 дельтаподобного белка, des(1-3)-IGF-1 (IGF-1 мозга), Dhh, оксидазу DHICA, Dickkopf-1, дигоксин, дипептидил-пептидазу IV, DK1, DNAM-1, ДНКазу, Dpp, DPPIV/CD26, Dtk, ECAD, EDA, EDA-A1, EDA-A2, EDAR, EGF, EGFR (ErbB-1), EGF-подобный домен, содержащий белок 7, эластазу, эластин, ЕМА, ЕММРIN, ENA, ENA-78, эндосиалин, рецептор эндотелина, эндотаксин, энкефалиназу, eNOS, Eot, эотаксин, эотаксин-2, эотаксин, ЕpCAM, эфрин B2/EphB4, рецептор тирозинкиназы EphA2, рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), рецептор ErbB2, рецептор тирозинкиназы ErbB3, ERCC, EREG, эритропоэтин (ЕРО), рецептор эритропоэтина, Е-селектин, ET-1, Exodus-2, F-белок RSV, F10, F11, F12, F13, F5, F9, фактор Ia, фактор IX, фактор Ха, фактор VII, фактор VIII, фактор VIIIc, Fas, Fc α R, Fc ϵ RI, Fc γ IIb, Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIIa, Fc γ RIIIb, FcRn, FEN-1, ферритин, FGF, FGF-19, FGF-2, рецептор FGF-2, FGF-3, FGF-8, кислотный FGF, основной FGF, FGFR, FGFR-3, фибрин, белок активации фибробластов (FAP), фактор роста фибробластов, фактор роста фибробластов 10, фибронектин, FL, FLIP, Flt-3, лиганд FLT3, фоллатный рецептор, фолликулостимулирующий гормон (FSH), фракталкин (CX3C), свободную тяжелую цепь, свободную легкую цепь, FZD1, FZD10, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, G250, Gas 6, GCP-2, GCSF, G-CSF, рецептор G-CSF, GD2, GD3, GDF, GDF-1, GDF-15 (MIC-1), GDF-3 (Vgr-2), GDF-5 (BMP-14/CDMP-1), GDF-6 (BMP-13/CDMP-2), GDF-7 (BMP-12/CDMP-3), GDF-8 (миостатин), GDF-9, GDNF, гельзолин, GFAP, GF-CSF, GFR- α 1, GFR- α 2, GFR- α 3, GF- β 1, гликопротеин оболочки gH, GITR, глюкагон, рецептор глюкагона, рецептор глюкагоноподобного пептида-1, Glut 4, глутаматкарбоксипептидазу II, рецепторы гликопротеиновых гормонов, гликопротеин IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), глипикан-3, GM-CSF, рецептор GM-CSF, gp130, gp140, gp72, гранулоцит-CSF (G-CSF), GRO/MGSA, фактор, высвобождающий гормон роста, GRO- β , GRO- γ , H. pylori, гаптен (NP-сар или NIP-сар), HB-EGF, HCC, HCC 1, гликопротеин HCMV оболочки gB, HCMV UL, гемопоэтический фактор роста (HGF), Her B gp120, гепарапазу, кофактор гепарина II, гепатический фактор роста, защитный антиген сибирской язвы, гликопротеин E2 вируса гепатита С, гепатита Е, гепсидин, Her1, Her2/neu (ErbB-2), Her3 (ErbB-3), Her4 (ErbB-4), гликопротеин gB вируса простого герпеса (HSV), HGF, HGFA, высокомолекулярный меланома-

глобулин, Tie, TIMP, TIQ, тканевый фактор, ингибитор протеазы тканевого фактора, белок тканевого фактора, TMEFF2, Tmpo, TMPRSS2, рецептор TNF I, рецептор

TNF II, TNF- α , TNF- β , TNF- β 2, TNFc, TNF-RI, TNF-RII, TNFRSF10A

(TRAIL R1 Apo-2/DR4), TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5/KILLER/TRICK-2A/TRICK-B), TNFRSF10C (TRAIL R3 DcR1/LIT/TRID), TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2/TRUNDD), TNFRSF11A (RANK ODF R/TRANCE R), TNFRSF11B (OPG OCIF/TR1), TNFRSF12 (TWEAK R FN14), TNFRSF12A, TNFRSF13B (TACI), TNFRSF13C (BAFF R), TNFRSF14 (HVEM ATAR/HveA/LIGHT R/TR2), TNFRSF16 (NGFR p75NTR), TNFRSF17 (BCMA), TNFRSF18 (GITR AITR), TNFRSF19 (TROY TAJ/TRADE), TNFRSF19L (RELT), TNFRSF1A (TNF RI CD120a/p55-60), TNFRSF1B (TNF RII CD120b/p75-80), TNFRSF21 (DR6), TNFRSF22 (DcTRAIL R2 TNFRH2), TNFRSF25 (DR3 Apo-3/LARD/TR-3/TRAMP/WSL-1), TNFRSF26 (TNFRH3), TNFRSF3 (LTbR TNF RIII/TNFC R), TNFRSF4 (OX40 ACT35/TXGP1 R), TNFRSF5 (CD40 p50), TNFRSF6 (Fas Apo-1/APT1/CD95), TNFRSF6B (DcR3 M68/TR6), TNFRSF7 (CD27), TNFRSF8 (CD30), TNFRSF9 (4-1 BB CD137/ILA), TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1), TNFSF10 (TRAIL (Apo-2 лиганд)/TL2), TNFSF11 (TRANCE/лиганд RANK ODF/лиганд OPG), TNFSF12 (TWEAK (лиганд Apo-3)/лиганд DR3), TNFSF13 (APRIL TALL2), TNFSF13B (BAFF BLYS/TALL1/THANK/TNFSF20), TNFSF14 (LIGHT лиганд HVEM/LTg), TNFSF15 (TL1A/VEGI), TNFSF18 (лиганд GITR (лиганд AITR)/TL6), TNFSF1A (конектин TNF- α /DIF/TNFSF2), TNFSF1B (TNF- β LTa/TNFSF1), TNFSF3 (LTb TNFC/p33), TNFSF4 (лиганд OX40 gp34/TXGP1), TNFSF5 (лиганд CD40 CD154/gp39/HIGM1/IMD3/TRAP), TNFSF6 (лиганд Fas лиганд Apo-1/лиганд APT1), TNFSF7 (лиганд CD27 (CD70)), TNFSF8 (лиганд CD30 (CD153)), TNFSF9 (лиганд 4-1 BB (лиганд CD137)), TNF- α , TNF- β , TNIL-I,

токсический метаболит, TP-1, t-PA, Тро, TRAIL, TRAIL R, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRANCE, рецептор трансферрина, трансформирующие факторы роста (TGF), такие как TGF- α и TGF- β , трансмембранный гликопротеин NMB, транстиретин, TRF, Trk, TROP-2, трофобластный гликопротеин, TSG, TSLP, фактор некроза опухоли (TNF), опухоль-ассоциированный антиген CA 125, опухоль-ассоциированный антиген, экспрессирующий углевод, родственный Lewis Y, TWEAK, TXB2, Ung, uPAR, uPAR-1, урокиназу, VAP-1, эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF), васпин, VCAM, VCAM-1, VECAD, VE-кадгерин, VE-кадгерин-2, VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2, рецептор VEGF (VEGFR), VEGFR-3 (flt-4), VEGI, VIM, вирусные антигены, рецептор VitB12, рецептор витронектина, VLA, VLA-1, VLA-4, VNR-интегрин, фактор фон Виллебранда (vWF), WIF-1, WNT1, WNT10A, WNT10B, WNT11, WNT16, WNT2, WNT2B/13, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT7A, WNT7B, WNT8A, WNT8B, WNT9A, WNT9B, XCL1, XCL2/SCM-1- β , XCL1/лимфотактин, XCR1, XEDAR, XIAP и XPD.

Один из двух переменных доменов антитела, входящего в состав антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению, способен связываться с двумя различными антигенами, но не способен связываться с указанными антигенами одновременно. Термин "первый антиген" или "второй антиген", с которым связывается указанный переменный домен, предпочтительно обозначает, например, молекулу на поверхности иммуноцита (например, молекулу на поверхности Т-клеток, молекулу на поверхности НК клеток, молекулу на поверхности дендритных клеток, молекулу на поверхности В клеток, а также молекулу на поверхности НКТ-клеток, молекулу на поверхности MDSC клеток и молекулу на поверхности макрофагов), или антиген, который экспрессируется не только на опухолевых клетках, опухолевых сосудах, стволовых клетках и т.п., но и на здоровых тканях (интегрин, клеточный фактор, VEGFR, PDGFR, EGFR, IGFR, рецептор хемокина MET, гепарансульфатпротеогликан, CD44, фибронектин, DR5, TNFRSF и т.п.). Что касается использования комбинации "первого антигена" и "второго антигена", предпочтительно любой первый антиген и второй антиген обозначает, например, молекулу, специфически экспрессируемую на Т-клетке, а другой антиген обозначает молекулу, экспрессируемую на поверхности Т-клетки или любого другого иммуноцита. В другом варианте комбинации "первого антигена" и "второго антигена" предпочтительно любой первый антиген и второй антиген обозначает, например, молекулу, специфически экспрессируемую на Т-клетке, а другой антиген обозначает молекулу, которая экспрессируется на иммуноците и отличается от предварительно выбранного антигена. Конкретные примеры молекулы, специфически экспрессируемой на Т-клетке, включают CD3 и рецепторы Т-клеток. Прежде все-

го, предпочтительным является CD3. Например, в случае CD3 человека, участком в составе CD3, с которым связывается антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению, может быть любой эпитоп, присутствующий в γ -цепи, δ -цепи или ϵ -цепи, составляющих CD3 человека. Прежде всего, предпочтителен эпитоп, присутствующий во внеклеточной области ϵ -цепи комплекса CD3 человека. Полипептидные последовательности структур γ -цепи, δ -цепи и ϵ -цепи, составляющих CD3, показаны в последовательностях SEQ ID №№: 83 (NM_000073.2), 85 (NM_000732.4) и 87 (NM_000733.3), а соответствующие полипептидные последовательности представлены в последовательностях SEQ ID №№: 84 (NP_000064.1), 86 (NP_000723.1) и 88 (NP_000724.1) (регистрационные номера RefSeq приведены в скобках). Примеры другого антигена включают рецепторы Fc γ , TLR, лектин, IgA, молекулы иммунных контрольных точек, молекулы надсемейства TNF, молекулы надсемейства TNFR, а также молекулы рецепторов NK.

Из двух вариабельных доменов антитела, включенных в состав антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению, другой вариабельный домен связывается с "третьим антигеном", который отличается от упомянутых выше "первого антигена" и "второго антигена". Третьим антигеном предпочтительно является, например, опухолевый клеточно-специфический антиген, и указанный антиген также включает антиген, экспрессируемый при злокачественном изменении клеток, а также при появлении на поверхности клеток или в белковой молекуле аномальной углеводной последовательности в ходе злокачественной трансформации клеток. Конкретные примеры указанного антигена включают рецептор ALK (рецептор плейотрофина), плейотрофин, антиген рака поджелудочной железы KS 1/4, антиген рака яичников (CA125), кислую фосфатазу предстательной железы, простат-специфический антиген (PSA), меланома-ассоциированный антиген p97, антиген меланомы gp75, высокомолекулярный антиген меланомы (HMW-MAA), простат-специфический мембранный антиген, карциноэмбриональный антиген (CEA), антиген полиморфного эпителиального муцина, антиген мембран жировых глобул грудного молока человека, опухоль-специфический антиген колоректального рака (например, CEA, TAG-72, CO17-1A, GICA 19-9, CTA-1 и LEA), антиген лимфомы Беркитта 38.13, CD19, антиген В-клеточной лимфомы человека CD20, CD33, меланома-специфический антиген (например, ганглиозид GD2, ганглиозид GD3, ганглиозид GM2 и ганглиозид GM3), опухоль-специфический трансплантационный антиген (TSTA), Т-антиген, антиген вирус-индуцированной опухоли (например, капсульный антиген онкогенного ДНК-вируса и онкогенного РНК-вируса), CEA ободочной кишки, онкофетальный антиген- α -фетопротейн (например, онкофетальный трофобластный гликопротеин 5T4 и онкофетальный антиген опухоли мочевого пузыря), дифференцировочный антиген (например, антигены рака легких L6 и L20), антиген фибросаркомы, антиген Grp37, ассоциированный с Т-клеточным лейкозом человека, гликопротеин новорожденных, сфинголипид, антиген рака молочной железы (например, EGFR (рецептор эпителиального фактора роста)), антиген NY-BR-16, NY-BR-16 и HER2 (p185HER2), полиморфный эпителиальный муцин (PEM), антиген злокачественных лимфоцитов человека APO-1, дифференцировочный антиген, такой как антиген I, обнаруженный в фетальных эритроцитах, антиген I первичной эндодермы, обнаруженный в зрелых эритроцитах, I (Ma), обнаруженный в эмбриональных клетках до трансплантации или рака желудочно-кишечного тракта, M18, обнаруженный в эпителии молочной железы, M39, SSEA-1, обнаруженный в клетках костного мозга, VEP8, VEP9, Myl, VIM-D5, D156-22, обнаруженный в клетках колоректального рака, TRA-1-85 (группа крови H), SCP-1, обнаруженный в клетках рака яичек и в клетках рака яичников, C14, обнаруженный в клетках рака ободочной кишки, F3, обнаруженный в клетках рака легких, AN6, обнаруженный в клетках рака желудочно-кишечного тракта, гаптен Y, Ley, обнаруженный в клетках эмбрионального рака, TL5 (группа крови A), рецептор EGF, обнаруженный в клетках A431, серии E1 (группа крови B), обнаруженные в клетках рака поджелудочной железы, FC10.2, обнаруженный в клетках эмбрионального рака, антиген рака желудочно-кишечного тракта, CO-514 (группа крови Lea), обнаруженный в клетках аденокарциномы, NS-10, обнаруженный в клетках аденокарциномы, CO-43 (группа крови Leb), G49, обнаруженный в рецепторе EGF клеток A431, MH2 (группа крови ALeb/Ley), обнаруженный в клетках рака ободочной кишки, 19.9, обнаруженный в клетках рака ободочной кишки, муцин рака желудочно-кишечного тракта, T5A7, обнаруженный в клетках костного мозга, R24, обнаруженных в клетках меланомы, 4.2, GD3, D1.1, OFA-1, GM2, OFA-2, GD2, а также M1:22:25:8, обнаруженный в клетках эмбрионального рака, SSEA-3 и SSEA-4, обнаруженные в 4-8-клеточных эмбрионах, антиген, ассоциированный с Т-клеточной лимфомой кожи, антиген MART-1, антиген сиалил-Tn (STn), антиген клеток рака ободочной кишки NY-CO-45, вариант антигена А клеток рака легких NY-LU-12, антиген аденокарциномы ART1, паранеопластический антиген, ассоциированный с раком мозга-яичников (онконейрональный антиген MA2 и паранеопластический нейрональный антиген), нейроонкологический вентральный антиген 2 (NOVA2), антиген клеток рака крови 520, опухоль-ассоциированный антиген CO-029, опухоль-ассоциированный антиген MAGE-C1 (раковый тестикулярный антиген CT7), MAGE-B1 (антиген MAGE-XP), MAGE-B2 (DAM6), MAGE-2, MAGE-4a, MAGE-4b MAGE-X2, раково-тестикулярный антиген (NY-EOS-1), YKL-40, а также любой фрагмент указанных полипептидов и их модифицированные структуры (упомянутые выше модифицированные фосфатные группы, углеводные цепи и т.п.), ЕрсАМ, Ерег, CA19-9, CA15-3, сиалил SSEA-1 (SLX), HER2, PSMA, CEA и CLEC12A.

Антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению можно получить по известной методике. Например, антитело можно получить приведенным ниже методом, хотя метод получения антитела по настоящему изобретению не ограничивается этими методами. В данной области известно множество комбинаций клеток хозяина и экспрессионных векторов для получения антител при переносе выделенных генов, кодирующих полипептиды, в соответствующие клетки хозяина. Все указанные экспрессионные системы можно использовать для выделения антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению. В случае использования эукариотических клеток в качестве клеток хозяина можно соответствующим образом использовать клетки животных, клетки растений или клетки грибов. Более подробно, примеры клеток животных включают следующие клетки:

(1) клетки млекопитающих, такие как CHO (линия клеток яичников китайского хомячка), COS (линия клеток почки обезьян), клетки миеломы (Sp2/0, NS0 и т.п.), ВНК (линия клеток почки новорожденного хомяка), НЕК293 (линия клеток эмбриональной почки человека с деградированной ДНК аденовируса (Ad)5), клетки PER.C6 (линия клеток эмбриональной сетчатки человека, трансформированных генами E1A и E1B аденовируса типа 5 (Ad5)), Hela, а также Vero (Current Protocols in Protein Science (май 2001 г., раздел (Unit) 5.9, табл. 5.9.1)),

(2) клетки амфибий, такие как ооциты *Xenopus*, и

(3) клетки насекомых, такие как sf9, sf21 и Tn.

Антитело также можно получить с использованием клеток культуры *E. coli* (mAbs, 4 (2): сс. 217-225 (2012 Март-Апрель)) или дрожжей (WO 2000/023579). Антитело, полученное с использованием *E. coli*, является негликозилированным. С другой стороны, антитело, полученное с использованием дрожжей, является гликозилированным.

Экспрессируют ДНК, которая кодирует тяжелую цепь, включающую один или более аминокислотных остатков в вариабельном домене, замененных на различные требуемые аминокислотные остатки, и ДНК, кодирующую легкую цепь антитела. ДНК, которая кодирует тяжелую цепь или легкую цепь, включающую один или более аминокислотных остатков в вариабельном домене, замененных на различные требуемые аминокислотные остатки, можно получить, например, при получении ДНК, кодирующей вариабельный домен антитела, полученного по известной методике против определенного антигена, и соответственно производя замену, таким образом, что кодоны, которые кодируют конкретные аминокислотные остатки в домене, будут кодировать различные требуемые аминокислотные остатки.

В другом варианте ДНК, кодирующую белок, в котором один или более аминокислотных остатков в вариабельном домене антитела, полученного по известной методике против определенного антигена, заменены на различные требуемые аминокислоты, можно предварительно сконструировать и получить методом химического синтеза и получить ДНК, которая кодирует тяжелую цепь, включающую один или более аминокислотных остатков в вариабельном домене, которые заменены на различные требуемые аминокислоты. Участок замены аминокислот и тип замены особо не ограничены. Примеры области, которая является предпочтительной для изменения аминокислотных остатков, включают экспонированные в растворитель области и петли в вариабельной домене. Среди прочих предпочтительными являются CDR1, CDR2, CDR3, FR3 и петли. Прежде всего, предпочтительными являются следующие положения в вариабельном домене Н-цепи: 31-35, 50-65, 71-74 и 95-102 (согласно нумерации Кабата), а также следующие положения в вариабельном домене L-цепи: 24-34, 50-56 и 89-97 согласно нумерации Кабата. Более предпочтительными являются следующие положения в вариабельном домене Н-цепи: 31, 52a-61, 71-74 и 97-101 согласно нумерации Кабата, а также следующие положения в вариабельном домене L-цепи: 24-34, 51-56 и 89-96 согласно нумерации Кабата.

Изменение аминокислотной последовательности не ограничено заменой и может представлять собой делецию, добавление, вставку или модификацию или комбинацию указанных операций.

ДНК, которая кодирует тяжелую цепь, включающую в вариабельном домене один или более аминокислотных остатков, замененных на различные требуемые аминокислотные остатки, также можно получить в виде отдельных фрагментов ДНК. Примеры комбинации отдельных ДНК включают, но, не ограничиваясь только ими: ДНК, кодирующую вариабельный домен, и ДНК, кодирующую консервативный домен, а также ДНК, кодирующую домен Fab, и ДНК, кодирующую домен Fc. Аналогичным образом, ДНК, кодирующую легкую цепь, также можно получить в виде отдельных фрагментов ДНК.

Такие ДНК можно экспрессировать следующим способом: например, ДНК, кодирующую вариабельный домен тяжелой цепи, наряду с ДНК, кодирующей консервативный домен тяжелой цепи, вставляют в экспрессионный вектор, при этом получают экспрессионный вектор тяжелой цепи. Аналогичным образом, ДНК, кодирующую вариабельный домен легкой цепи, наряду с ДНК, кодирующей консервативный домен легкой цепи, вставляют в экспрессионный вектор, при этом получают экспрессионный вектор легкой цепи. Указанные гены тяжелой цепи и легкой цепи можно вставлять в один вектор.

ДНК, кодирующую требуемое антитело, вставляют в экспрессионные векторы таким образом, чтобы обеспечить экспрессию в условиях контроля определенных областей экспрессии, например, с использованием усилителя и промотора. Затем клетки хозяина трансформируют полученными экспрессионными векторами и проводят экспрессию антител. В указанном случае соответствующие клетки хозяина и экспрессионные векторы можно использовать в комбинации.

Примеры векторов включают векторы серий M13, векторы серий pUC, pBR322, pBluescript и pCR-Script. Кроме указанных векторов для субклонирования и вырезания сегмента кДНК также можно использовать, например, pGEM-T, pDIRECT или pT7.

Прежде всего, экспрессионные векторы пригодны для их использования для получения антитела по настоящему изобретению. Например, если организмом хозяина является штамм *E. coli*, такой как JM109, DH5a, HB101 или XL1-Blue, экспрессионные векторы обязательно включают промотор, который обеспечивает эффективную экспрессию в *E. coli*, например, промотор lacZ (статья Ward и др., *Nature*, 341, с. 544-546 (1989) и Faseb J., 6, с. 2422-2427 (1992), содержание которых полностью включено в настоящее описание в качестве ссылок), промотор agaB (статья Better и др., *Science*, 240, 1041-1043 (1988), содержание которой полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки), или промотор T7. Примеры указанных векторов включают упомянутые выше векторы, а также вектор pGEX-5X-1 (выпускаемый фирмой Pharmacia), набор векторов "QIAexpress system" (выпускаемый фирмой Qiagen N.V.), векторы pEGFP и pET (в указанном случае организмом хозяина предпочтительно является штамм BL21, экспрессирующий РНК-полимеразу T7).

Векторы могут содержать сигнальную последовательность для секреции полипептидов. В случае продуцирования в периплазме *E. coli*, в качестве сигнальной последовательности для секреции полипептидов можно использовать сигнальную последовательность pelB (статья Lei S. P. и др., *J. Bacteriol.*, 169, с. 4397 (1987), содержание которой полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки). Векторы можно переносить в клетки организма хозяина с использованием, например, системы трансфекции в присутствии липофектина, фосфата кальция или DEAE-декстрана.

Кроме экспрессионных векторов для *E. coli* примеры векторов для продуцирования полипептида по настоящему изобретению включают экспрессионные векторы млекопитающих (например, вектор pcDNA3 (выпускаемый фирмой Invitrogen Corp.), вектор EGF-BOS (статья *Nucleic Acids Res.*, 18 (17), с. 5322 (1990), содержание которой полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки), векторы pEF и pCDM8), экспрессионные векторы насекомых (например, экспрессионная система бакуловируса "Bac-to-BAC" (выпускаемая фирмой GIBCO BRL) и pBacPAK8), экспрессионные векторы растений (например, pMH1 и pMH2), экспрессионные векторы животных (например, pHSV, pMV и pAdexLcw), экспрессионные векторы ретровирусов (например, pZIPneo), экспрессионные векторы дрожжей (например, набор векторов "Pichia Expression Kit" (выпускаемый фирмой Invitrogen Corp.), pNV11 и SP-Q01), а также экспрессионные векторы *Bacillus subtilis* (например, pPL608 и pKTH50).

Для экспрессии в клетках животных, таких как клетки CHO, клетки COS, клетки NIH3T3 или клетки HEK293, векторы обязательно содержат промотор, необходимый для внутриклеточной экспрессии, например, промотор SV40 (статья Mulligan и др., *Nature*, 277, с. 108 (1979), содержание которой полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки), промотор MMTV-LTR, промотор EF1 α (статья Mizushima и др., *Nucleic Acids Res.*, 18, с. 5322 (1990), содержание которой полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки), промотор CAG (*Gene*, 108, 193 (1991), содержание которой полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки) или промотор CMV и более предпочтительно содержат ген для скрининга трансформированных клеток (например, ген, отвечающий за резистентность к действию лекарственного средства, который служит в качестве маркера лекарственного средства (неомицин, G418, и т.п.)). Примеры векторов, характеризующихся указанными свойствами, включают pMAM, pDR2, pBK-RSV, pBK-CMV, pOPRSV и pOP13. Кроме того, для увеличения числа генных копий при этом можно совместно экспрессировать белок EBNA1. В указанном случае используют векторы, содержащие точку начала репликации OriP (статьи *Biotechnol. Bioeng.*, 75 (2), с. 197-203 (2001 Oct20) и *Biotechnol. Bioeng.*, 91 (6), с. 670-677 (2005 Sep20)).

Типичный способ, предназначенный для стабильной экспрессии гена и увеличения числа внутриклеточных генных копий, включает трансформацию клеток CHO, в которых исключен путь синтеза нуклеиновых кислот, векторами, включающими ген DHFR, служащих в качестве его комплемента (например, pCHOI), и использованием метотрексата (MTX) в ходе амплификации генов. Типичный способ, предназначенный для временной экспрессии гена, включает применение клеток COS, содержащих в своих хромосомах Т-антиген SV40, при этом клетки трансформируют векторами, содержащими точку начала репликации SV40 (pCD и т.п.). В качестве точки начала репликации можно использовать точку, полученную из полиомавируса, аденовируса, бычьего папилломавируса (BPV), и т.п. Для повышения числа генных копий в системе клеток хозяина экспрессионные векторы могут включать селективный маркер, такой как ген аминогликозидфосфотрансферазы (APH), ген тимидинкиназы (TK), ген ксантингуанинфосфорибозилтрансферазы *E. coli* (Ecogpt) или ген дигидрофолатредуктазы (dhfr).

Антитело можно выделить, например, культивируя трансформированные клетки и затем отделяя антитело из трансформированных молекулами клеток или из культуральной среды. Затем антитело можно выделять и очищать, соответственно используя комбинации способов, таких как центрифугирование, фракционирование в различных концентрациях сульфата аммония, высаливание, ультрафильтрация, хроматография на колонках с иммобилизованными C1q, FcRn, белком А и белком G, аффинная хроматография, ионообменная хроматография и гель-фильтрация.

Для эффективного получения мультиспецифичного антитела в способе можно использовать упомя-

нутую выше технологию, такую как технология "выступы-в-углублениях" (заявка WO 1996/027011, статьи Ridgway J.B. и др., Protein Engineering, 9, с. 617-621 (1996) и Merchant A.M. и др., Nature Biotechnology, 16, с. 677-681 (1998)) или технология подавления нежелательной ассоциации Н-цепей при введении электрических отталкивающих зарядов (заявка WO 2006/106905).

В настоящем изобретении, кроме того, предлагается способ получения антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению и, прежде всего, предлагается способ получения антигенсвязывающей молекулы, включающей: переменный домен антитела, который способен связываться с двумя различными антигенами (первый антиген и второй антиген), но не связывается с первым антигеном и вторым антигеном одновременно (указанный переменный домен называют первым переменным доменом), и второй переменный домен, связывающийся с третьим антигеном, который отличается от первого антигена и второго антигена (указанный переменный домен называют вторым переменным доменом), причем способ включает стадию получения библиотеки антигенсвязывающих молекул, содержащих различные аминокислотные последовательности первого переменного домена.

Примеры могут включать способ получения, включающий следующие стадии:

(i) получение библиотеки антигенсвязывающих молекул, содержащих, по крайней мере, один измененный аминокислотный остаток в переменных доменах антитела, каждая из которых связывается с первым антигеном или со вторым антигеном, причем измененные переменные домены отличаются друг от друга, по крайней мере, одним аминокислотным остатком;

(ii) выбор из полученной библиотеки антигенсвязывающей молекулы, включающей переменный домен, который связывается с первым антигеном и вторым антигеном, но не связывается с первым антигеном и вторым антигеном одновременно;

(iii) культивирование клеток хозяина, включающих нуклеиновую кислоту, кодирующую переменный домен антигенсвязывающей молекулы, выбранной на стадии (ii), и нуклеиновую кислоту, кодирующую переменный домен антигенсвязывающей молекулы, связывающейся с третьим антигеном, при этом экспрессируют антигенсвязывающую молекулу, включающую переменный домен антитела, который способен связываться с первым антигеном и вторым антигеном, но не связывается с первым антигеном и вторым антигеном одновременно, а также переменный домен, связывающийся с третьим антигеном; и

(iv) выделение антигенсвязывающей молекулы из культур клеток хозяина.

В указанном способе получения стадией (ii) может быть следующая стадия селекции:

(v) выбор из полученной библиотеки антигенсвязывающей молекулы, включающей переменный домен, который связывается с первым антигеном и вторым антигеном, но не связывается одновременно с первым антигеном и вторым антигеном, каждый из которых экспрессируется на различных клетках.

Антигенсвязывающие молекулы, используемые на стадии (i), особо не ограничены при условии, что каждая из указанных молекул включает переменный домен антитела. Антигенсвязывающие молекулы могут представлять собой фрагменты антител, такие как Fv, Fab или Fab', или антитела, содержащие Fc область.

Аминокислоту, подлежащую изменению, выбирают, например, из аминокислот, изменение которых в переменном домене антитела, связывающимся с первым антигеном или со вторым антигеном, не влияет на связывание с антигеном.

В настоящем изобретении можно использовать изменение одного аминокислотного остатка или можно использовать изменение множества аминокислотных остатков в комбинации.

В случае использования изменения множества аминокислот в комбинации, число изменений, предназначенных для комбинирования, особо не ограничено и составляет, например, 2 или более и 30 или менее, предпочтительно 2 или более и 25 или менее, 2 или более и 22 или менее, 2 или более и 20 или менее, 2 или более и 15 или менее, 2 или более и 10 или менее, 2 или более и 5 или менее, или 2 или более и 3 или менее.

Множество изменений аминокислот, предназначенных для комбинирования, можно добавлять или только в переменный домен тяжелой цепи антитела, или в переменный домен легкой цепи или соответственно можно распределять в обоих переменных доменах - в переменном домене тяжелой цепи и в переменном домене легкой цепи.

Примеры области, предпочтительной для изменения аминокислотной последовательности, включают экспонированные в растворитель области и петли в переменном домене. Среди прочих предпочтительными являются CDR1, CDR2, CDR3, FR3 и петли. Прежде всего, предпочтительными являются следующие положения в переменном домене Н-цепи: 31-35, 50-65, 71-74 и 95-102 согласно нумерации Кабата, а также следующие положения в переменном домене L-цепи: 24-34, 50-56 и 89-97 согласно нумерации Кабата. Более предпочтительными являются следующие положения в переменном домене Н-цепи: 31, 52а-61, 71-74 и 97-101 согласно нумерации Кабата, а также следующие положения в переменном домене L-цепи: 24-34, 51-56 и 89-96 согласно нумерации Кабата.

Изменение аминокислотного остатка также включает произвольное изменение аминокислотных остатков в упомянутой выше области в переменном домене антитела, связывающимся с первым антигеном или со вторым антигеном, и вставку пептида с известной связывающей активностью с требуемым

антигеном в упомянутую выше область. Антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению можно получить, выбирая среди измененных таким образом антигенсвязывающих молекул варибельный домен, который способен связываться с первым антигеном и вторым антигеном, но не способен одновременно связываться с указанными антигенами. Примеры пептида с известной связывающей активностью с требуемым антигеном включают пептиды, перечисленные выше в табл. 1.

Способность варибельного домена связываться с первым антигеном и вторым антигеном и отсутствие способности одновременно связываться с указанными антигенами и, кроме того, способность варибельного домена одновременно связываться с обоими указанными антигенами - первым антигеном и вторым антигеном, при условии, что любой один из первого антигена и второго антигена находится на клетке, а другой антиген присутствует отдельно, оба антигена присутствуют каждый в отдельности, или оба антигена находятся на одной и той же клетке, и отсутствие способности одновременно связываться с указанными антигенами, когда каждый антиген экспрессируется на различных клетках, также можно подтвердить указанным методом.

В настоящем изобретении, кроме того, предлагается способ получения антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению и, прежде всего, предлагается способ получения антигенсвязывающей молекулы, включающей варибельный домен антитела, который способен связываться с двумя различными антигенами (первым антигеном и вторым антигеном), но не связывается с первым антигеном и вторым антигеном одновременно (указанный варибельный домен называют первым варибельным доменом), при этом способ включает стадию получения библиотеки антигенсвязывающих молекул, содержащих различные аминокислотные последовательности первого варибельного домена.

Примеры способа получения такой антигенсвязывающей молекулы включают способ получения, включающий следующие стадии:

(i) получение библиотеки антигенсвязывающих молекул, содержащих в варибельных доменах антитела, по крайней мере, один измененный аминокислотный остаток, каждая из которых связывается с первым антигеном или со вторым антигеном, причем измененные варибельные домены отличаются друг от друга, по крайней мере, одним аминокислотным остатком;

(ii) выбор из полученной библиотеки антигенсвязывающей молекулы, включающей варибельный домен, который проявляет связывающую активность с первым антигеном и вторым антигеном, но не связывается с первым антигеном и вторым антигеном одновременно;

(iii) культивирование клетки хозяина, включающей нуклеиновую кислоту, кодирующую варибельный домен антигенсвязывающей молекулы, выбранной на стадии (ii), при этом осуществляют экспрессию антигенсвязывающей молекулы, включающей варибельный домен антитела, который способен связываться с первым антигеном и вторым антигеном, но не связывается с первым антигеном и вторым антигеном одновременно; и

(iv) выделение антигенсвязывающей молекулы из культур клеток хозяина.

Примеры области, предпочтительной для изменения аминокислот, включают варибельный домен тяжелой цепи. Более предпочтительные примеры указанной области включают экспонированные в растворителе области и петли в варибельном домене. Среди прочих предпочтительными являются CDR1, CDR2, CDR3, FR3 и петли. Прежде всего, предпочтительными являются следующие положения в варибельном домене Н-цепи: 31-35, 50-65, 71-74 и 95-102 согласно нумерации Кабата, а также следующие положения в варибельном домене L-цепи: 24-34, 50-56 и 89-97 согласно нумерации Кабата. Более предпочтительными являются следующие положения в варибельном домене Н-цепи: 31, 52a-61, 71-74 и 97-101 согласно нумерации Кабата, а также следующие положения в варибельном домене L-цепи: 24-34, 51-56 и 89-96 согласно нумерации Кабата.

В указанном способе получения стадией (ii) может быть следующая стадия селекции:

(v) выбор из полученной библиотеки антигенсвязывающей молекулы, включающей варибельный домен, которая проявляет связывающую активность с первым антигеном и вторым антигеном, но не связывается одновременно с первым антигеном и вторым антигеном, когда каждый антиген экспрессируется на различных клетках.

Антигенсвязывающие молекулы, используемые на стадии (i), особо не ограничены при условии, что каждая из указанных молекул включает варибельный домен антитела. Антигенсвязывающими молекулами могут быть фрагменты антитела, такие как Fv, Fab или Fab', или антитела, содержащие Fc-область.

Аминокислотный остаток, предназначенный для изменения, выбирают, например, из аминокислот, изменение которых не влияет на связывание антигена с варибельным доменом антитела, связывающимся с первым антигеном или со вторым антигеном.

В настоящем изобретении можно использовать изменение одного аминокислотного остатка или можно использовать изменение множества аминокислотных остатков в комбинации.

В случае использования изменения множества аминокислотных остатков в комбинации, число изменений, предназначенных для комбинирования, особо не ограничено и составляет, например, 2 или более и 30 или менее, предпочтительно 2 или более и 25 или менее, 2 или более и 22 или менее, 2 или более и 20 или менее, 2 или более и 15 или менее, 2 или более и 10 или менее, 2 или более и 5 или менее, или 2

или более и 3 или менее.

Изменение множества аминокислотных остатков, предназначенных для комбинирования, можно проводить или только в вариабельном домене тяжелой цепи антитела, или в вариабельном домене легкой цепи или можно распределять соответствующим образом в обоих доменах - в вариабельном домене тяжелой цепи и в вариабельном домене легкой цепи.

Изменение аминокислотной последовательности также включает: произвольное изменение аминокислотных остатков в упомянутой выше области в вариабельном домене антитела, связывающимся с первым антигеном или со вторым антигеном, и вставку в упомянутую выше область пептида с известной связывающей активностью с требуемым антигеном. Антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению можно получить, выбирая среди измененных таким образом антигенсвязывающих молекул вариабельный домен, который способен связываться с первым антигеном и вторым антигеном, но не способен связываться с указанными антигенами одновременно. Примеры пептида с известной связывающей активностью с требуемым антигеном включают пептиды, перечисленные в табл. 1 выше.

Способность вариабельного домена связываться с первым антигеном и вторым антигеном и отсутствие способности одновременно связываться с указанными антигенами и, кроме того, способность вариабельного домена одновременно связываться с обоими указанными антигенами - первым антигеном и вторым антигеном при условии, что любой один из первого антигена и второго антигена находится на клетке, а другой антиген присутствует отдельно, оба антигена присутствуют каждый в отдельности или оба антигена находятся на одной и той же клетке, а также отсутствие способности одновременно связываться с указанными антигенами, когда каждый антиген экспрессируется на различных клетках, можно также подтвердить в соответствии с упомянутым выше способом.

Настоящее изобретение включает также антигенсвязывающую молекулу, полученную любым из указанных способов получения.

Тип или область изменения аминокислотных остатков, включенных способом по настоящему изобретению, особо не ограничены.

В неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения примеры библиотеки по настоящему изобретению включают библиотеку, состоящую из антигенсвязывающих молекул, связывающихся с CD3 (в случае CD3 человека, с γ -цепью, δ -цепью или ϵ -цепью в составе CD3 человека), выбранным в качестве первого антигена, а также с произвольно выбранным вторым антигеном.

Использованный в данном контексте термин "библиотека" относится к множеству антигенсвязывающих молекул или к множеству гибридных полипептидов, включающих антигенсвязывающие молекулы, или к нуклеиновым кислотам или к полинуклеотидам, кодирующим указанные последовательности. Множество антигенсвязывающих молекул или множество гибридных полипептидов, включающих антигенсвязывающие молекулы, включенные в библиотеку, представляют собой антигенсвязывающие молекулы, отличающиеся друг от друга последовательностью, но не содержащие единичные последовательности, или гибридные полипептиды, включенные в антигенсвязывающие молекулы.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения можно получить гибридный полипептид, содержащий антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению, и гетерологичный полипептид. В одном варианте гибридный полипептид может включать антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению, соединенную, по крайней мере, с частью поверхностного белка вируса, выбранного из группы, включающей, например, поверхностные белки вируса рIII, рVIII, рVII, рIX, Soc, Hoc, gpD и рVI, а также варианты указанных белков.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения антигенсвязывающей молекулой по настоящему изобретению является ScFv, фрагмент Fab, F(ab)₂ или F(ab')₂. В другом варианте осуществления настоящего изобретения предлагается библиотека, состоящая в основном из множества гибридных полипептидов, отличающихся друг от друга последовательностью, при этом каждый из гибридных полипептидов составляет любую из указанных антигенсвязывающих молекул и гетерологичный полипептид. Прежде всего, в настоящем изобретении предлагается библиотека, состоящая в основном из множества гибридных полипептидов, отличающихся друг от друга последовательностью, при этом каждый из гибридных полипептидов составляет любую из указанных антигенсвязывающих молекул, соединенных, по крайней мере, с частью поверхностного белка вируса, выбранного из группы, включающей, например, поверхностные белки вируса рIII, рVIII, рVII, рIX, Soc, Hoc, gpD и рVI, а также их варианты. Антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению может, кроме того, включать димеризационный домен. В одном варианте димеризационный домен может быть расположен между вариабельным доменом тяжелой цепи антитела и вариабельным доменом легкой цепи антитела и, по крайней мере, частью поверхностного белка вируса. Димеризационный домен может включать, по крайней мере, одну димеризационную последовательность и/или последовательность, включающую один или более остатков цистеина. Указанный димеризационный домен предпочтительно присоединен к С-концевому фрагменту вариабельного домена или консервативного домена тяжелой цепи. Димеризационный домен может характеризоваться различными структурами в зависимости от того, получают ли вариабельный домен антитела в виде гибридного полипептидного компонента поверхностного белка вируса (отсутствует янтарный стоп-кодон, следующий за димеризационным доменом), или в зависимости от того, получают ли

вариабельный домен антитела преимущественно без включения компонента поверхностного белка вируса (например, присутствует янтарный стоп-кодон, следующий за димеризационным доменом). Если вариабельный домен антитела получают преимущественно в виде гибридного полипептидного компонента с поверхностным белком вируса, то получают двухвалентный дисплей с использованием одной или более дисульфидных связей и/или единичной димеризационной последовательности.

Использованный в данном контексте термин "отличающиеся друг от друга последовательностью" в отношении множества антигенсвязывающих молекул, отличающихся друг от друга последовательностью, обозначает, что отдельные антигенсвязывающие молекулы в библиотеке характеризуются различными последовательностями. Прежде всего, число различных последовательностей в библиотеке отражает число независимых клонов в библиотеке, отличающихся последовательностями, и этот термин также можно назвать "размером библиотеки". Размер обычной библиотеки фагового дисплея составляет от 10^6 до 10^{12} , и при использовании методики, известной в данной области техники, такой как метод рибосомного дисплея, может быть увеличен до 10^{14} . Однако действительное число фаговых частиц, предназначенных для использования методом "пэннинга" для фаговой библиотеки, обычно в 10-10000 раз больше по сравнению с размером библиотеки. Указанное избыточное множество, так называемое "число эквивалентов библиотеки", представляет собой от 10 до 10000 индивидуальных клонов, которые могут включать одинаковую аминокислотную последовательность. Соответственно, использованный в настоящем изобретении термин "отличающиеся друг от друга последовательностью" обозначает, что индивидуальные антигенсвязывающие молекулы в библиотеке, исключая число эквивалентов библиотеки, характеризуются различными последовательностями, и более конкретно, указанный термин обозначает, что библиотека включает от 10^6 до 10^{14} , предпочтительно от 10^7 до 10^{12} , более предпочтительно от 10^8 до 10^{11} , прежде всего, предпочтительно от 10^8 до 10^{10} антигенсвязывающих молекул, отличающихся друг от друга последовательностью.

Использованный в настоящем изобретении термин "состоящая в основном" в отношении библиотеки, состоящей в основном из множества антигенсвязывающих молекул, указывает число антигенсвязывающих молекул, отличающихся по своей связывающей активности с первым и/или вторым антигеном, среди независимых клонов в библиотеке, отличающихся последовательностью. Прежде всего, библиотека предпочтительно включает, по крайней мере, 10^4 антигенсвязывающих молекул, которые проявляют указанную связывающую активность. Более предпочтительно, в настоящем изобретении предлагается библиотека, включающая по крайней мере 10^5 антигенсвязывающих молекул, которые проявляют указанную связывающую активность. Еще более предпочтительно, в настоящем изобретении предлагается библиотека, включающая по крайней мере 10^6 антигенсвязывающих молекул, которые проявляют указанную связывающую активность. Прежде всего, предпочтительно в настоящем изобретении предлагается библиотека, включающая по крайней мере 10^7 антигенсвязывающих молекул, которые проявляют указанную связывающую активность. Также предпочтительно в настоящем изобретении предлагается библиотека, включающая по крайней мере 10^8 антигенсвязывающих молекул, которые проявляют указанную связывающую активность. Другими словами, указанный термин предпочтительно означает соотношение числа антигенсвязывающих молекул, отличающихся связывающей активностью с первым и/или вторым антигеном, и числа независимых клонов в библиотеке, отличающихся последовательностью. Более конкретно, в настоящем изобретении предлагается библиотека, включающая антигенсвязывающие молекулы, которые проявляют указанную связывающую активность, при отношении указанных молекул к числу независимых клонов в библиотеке, отличающихся последовательностью, равному от 0,1 до 80%, предпочтительно от 0,5 до 60%, более предпочтительно от 1 до 40%, еще более предпочтительно от 2 до 20%, прежде всего, предпочтительно от 4 до 10%. Для гибридных полипептидов, молекул полинуклеотидов или векторов также можно указывать число молекул или их соотношение к общему числу молекул, как в указанном выше случае. Аналогичным образом, для вирусов также можно указывать число индивидуумов-носителей вирусов или их отношение к общему числу индивидуумов-носителей вирусов, как в указанном выше случае.

Использованный в данном контексте термин "фаговый дисплей" относится к методу, который заключается в том, что варианты полипептидов отображаются в виде гибридных белков, соединенных, по крайней мере, с частью поверхностных белков на поверхности частиц фагов, например, нитевидных фагов. Использование фагового дисплея обусловлено тем, что он обеспечивает быстрый и эффективный скрининг большой библиотеки рандомизированных белковых вариантов для выбора последовательности, которая связывается с антигеном-мишенью с высокой аффинностью. Дисплей библиотек пептидов и белков на фагах используют для скрининга миллионов полипептидов для выбора полипептидов со специфическими связывающими свойствами. Метод поливалентного фагового дисплея используют для отображения небольших произвольных пептидов и небольших произвольных белков при гибридизации или с геном III, или с геном VIII нитевидного фага (статья Wells и Lowman, Curr. Opin. Struct. Biol., 3, с. 355-362 (1992) и цитированные в указанной статье ссылки). Одновалентный фаговый дисплей включает библиотеку гибридных белков или пептидов с геном III или с его частью и экспрессию гибридных белков при низких уровнях в присутствии белка гена III дикого типа, при этом каждая фаговая частица отображает одну копию гибридного белка или не отображает ни одной копии. Одновалентные фаговые дисплеи

характеризуются более низким эффектом avidности по сравнению с поливалентными фагами и, в связи с этим, обеспечивают скрининг на основе эндогенной аффинности к лиганду с использованием фагмидных векторов, которые упрощают обработку полученных ДНК (Lowman и Wells, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology*, 3, с. 205-216 (1991)).

Термин "фагмида" относится к плазмидному вектору, который включает точку начала бактериальной репликации, например, ColE1, и копию межгенной области бактериофага. Соответственно можно использовать фагмиду, полученную из любого бактериофага, известного в данной области, например, нитевидного бактериофага или лямбдоидного бактериофага. Обычно плазида также содержит селективный маркер для устойчивости к антибиотику. Фрагменты ДНК, клонированные в указанные векторы, можно культивировать в виде плазмид. Если клетки, содержащие указанные векторы, включают все гены, необходимые для продуцирования фаговых частиц, картина репликации плазмид изменяется на репликацию по типу "катящегося кольца", при этом образуются копии одной цепи плазмидной ДНК и происходит упаковка их в фаговые частицы. Фагмида может образовывать инфекционные или неинфекционные фаговые частицы. Указанный термин включает фагмиду, которая содержит ген поверхностного белка фага или его фрагмент, связанный с геном гетерологичного полипептида в результате гибридизации генов, при которой происходит отображение гетерологичного полипептида на поверхности фаговой частицы.

Термин "фаговый вектор" обозначает двухцепочечную репликативную форму бактериофага, которая содержит гетерологичный ген и способна к репликации. Фаговый вектор включает точку начала фаговой репликации, которая обеспечивает репликацию фага и образование фаговых частиц. Фагом предпочтительно является нитевидный бактериофаг, например, фаг M13, f1, fd или Pf3 или их производные, или лямбдоидный фаг, например, фаг лямбда, 21, phi80, phi81, 82, 424, 434 или любой другой фаг или его производное.

Термин "олигонуклеотид" относится к короткоцепочечному одно- или двухцепочечному полидезоксинуклеотиду, который получают известным в данной области техники методом химического синтеза (например, твердофазным методом на основе фосфотриэфилов, фосфитов или фосфорамидитов, таким как метод, описанный в патенте EP 266032, или методом получения через промежуточные производные дезоксинуклеотид Н-фосфоната, описанные в статье Froeshler и др., *Nucl. Acids. Res.*, 14, с. 5399-5407 (1986)). Другие методы синтеза олигонуклеотидов включают полимеразную цепную реакцию (ПЦР), описанную ниже, и другие аутопраймерные методы, а также синтез нуклеотидов на твердых подложках. Все указанные способы описаны в статье Engels и др., *Agnew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 28, с. 716-734 (1989). Указанные методы используют, если известна полная нуклеотидная последовательность гена или если доступна нуклеотидная последовательность, комплементарная кодирующей цепи. В другом варианте, если известна требуемая последовательность нуклеиновой кислоты, то возможную нуклеотидную последовательность можно соответственно сконструировать с использованием известных и предпочтительных остатков, кодирующих каждый аминокислотный остаток. Олигонуклеотид можно очищать с использованием колонок с полиакриламидными гелями или колонок с молекулярными ситами или осаждением.

Термины "гибридный белок" и "гибридный полипептид" относятся к полипептиду, включающему два ковалентно связанных друг с другом сегмента. Эти сегменты в полипептиде отличаются своими свойствами. Указанным свойством может являться, например, биологическое свойство, такое как активность *in vitro* или *in vivo*. В другом варианте указанным свойством может являться химическое или физическое свойство, например, связывание с антигеном-мишенью или катализ реакции. Указанные два сегмента могут быть связаны либо напрямую через одну пептидную связь, либо через пептидный линкер, содержащий один или более аминокислотных остатков. Обычно указанные два сегмента и линкер расположены в одной и той же рамке считывания. Предпочтительно, два сегмента полипептида получают из гетерологичных или различных полипептидов.

Термин "поверхностный белок" относится к белку, по крайней мере, часть которого присутствует на поверхности вирусной частицы. С точки зрения функциональности поверхностный белок представляет собой произвольный белок, который связывается с вирусными частицами в ходе формирования вирусов в клетках хозяина и остается там связанным до инфицирования вирусом других клеток хозяина. Поверхностный белок может являться основным поверхностным белком или минорным поверхностным белком. Минорным поверхностным белком обычно является поверхностный белок, присутствующий в вирусной капсуле в количестве, предпочтительно, по крайней мере, приблизительно 5, более предпочтительно, по крайней мере, приблизительно 7, еще более предпочтительно, по крайней мере, приблизительно 10 или более копий белка на вирион. Основным поверхностным белком может присутствовать в количестве десятков, сотен или тысяч копий на вирион. Примеры основного поверхностного белка включают белок нитевидного фага р8.

В неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения примеры способа получения библиотеки включают 6 следующих способов:

1) способ, который заключается во вставку пептида (указанный термин используют для включения полипептида и белка), связывающегося со вторым антигеном, в антигенсвязывающие молекулы, каждая из которых связывается с первым антигеном;

2) способ, который заключается в том, что библиотеку получают таким образом, чтобы различные аминокислотные остатки отображались в положениях, в которых можно осуществить изменение, что позволяет удлинить (расширить) изменяемые фрагменты петель в антигенсвязывающих молекулах, и получить антигенсвязывающую молекулу, проявляющую связывающую активность со вторым произвольным антигеном, выбранным из библиотеки, при использовании связывающей активности с антигеном в качестве индекса;

3) способ, который заключается в идентификации аминокислот, которые позволяют сохранить связывающую активность с первым антигеном, при использовании антитела, полученного сайт-направленным мутагенезом из антигенсвязывающей молекулы, для которой предварительно показано, что она связывается с первым антигеном, и получают антигенсвязывающую молекулу, проявляющую связывающую активность со вторым произвольным антигеном, выбранным из библиотеки, в составе которой идентифицированные аминокислоты отображаются с использованием связывающей активности с антигеном в качестве индекса;

4) способ по п.3, который дополнительно включает получение библиотеки антител таким образом, чтобы различные аминокислотные остатки отображались в положениях, которые позволяют удлинить (расширить) изменяемые фрагменты петель в антигенсвязывающих молекулах, и получение антигенсвязывающей молекулы, проявляющей связывающую активность со вторым произвольным антигеном, выбранным из библиотеки, при использовании связывающей активности с антигеном в качестве индекса;

5) способ по пп.1, 2, 3 или по п.4, который дополнительно включает изменение антигенсвязывающих молекул для включения углеводных последовательностей (например, NxS и NxT, где x обозначает аминокислоту, отличающуюся от P), при этом в антигенсвязывающие молекулы вставляют углеводные цепи, которые распознают рецепторы углеводных цепей (например, в состав антигенсвязывающих молекул вставляют углеводные цепи с высоким содержанием маннозы, причем известно, что углеводные цепи с высоким содержанием маннозы получают при добавлении кифуненсина в ходе экспрессии антител (mAbs, 4 (4), с. 475-87 (2012 Jul-Aug)), и

б) способ по пп.1, 2, 3 или по п.4, который дополнительно включает добавление в состав антигенсвязывающих молекул доменов, каждый из которых связывается со вторым антигеном через ковалентную связь, при вставке остатков Cys, Lys или не природной аминокислоты в петли или участки, которые, как было установлено, предназначены для замены на различные аминокислотные остатки, или проведение в указанных участках замены на остатки Cys, Lys или не природную аминокислоту (указанный способ типизируют с использованием конъюгатов антитело-лекарственное средство, и указанный способ является способом конъюгации с Cys, Lys или с не природной аминокислотой через ковалентную связь (mAbs, 6, 1, с. 34-45 (2014 Jun-Feb), заявка WO 2009/134891 A2 и статья Bioconjug. Chem., 19, 25 (2), с. 351-361 (2014 Feb)).

В указанных 6 способах получения библиотеки, перечисленных выше, в качестве участка для замены аминокислот в каждой антигенсвязывающей молекуле или в качестве участка для вставки пептида в антигенсвязывающую молекулу предпочтительно выбирают участок в Fab-фрагменте или в варибельном домене антигенсвязывающей молекулы. Примеры предпочтительной области включают экспонированные в растворитель области и петли варибельного домена. Среди прочих предпочтительными являются CDR1, CDR2, CDR3, FR3 и петли. Прежде всего, предпочтительными являются следующие положения в варибельном домене Н-цепи: 31-35, 50-65, 71-74 и 95-102 согласно нумерации Кабата, а также следующие положения в варибельном домене L-цепи: 24-34, 50-56 и 89-97 согласно нумерации Кабата. Более предпочтительными являются следующие положения в варибельном домене Н-цепи: 31, 52a-61, 71-74 и 97-101 согласно нумерации Кабата, а также следующие положения в варибельном домене L-цепи: 24-34, 51-56 и 89-96 согласно нумерации Кабата.

В одном варианте примеры способа 1, который включает вставку пептида, связывающегося со вторым антигеном, в антигенсвязывающие молекулы, каждая из которых связывается с первым антигеном, также могут включать способ вставки G-CSF, как описано в качестве примера в статье Angew Chem., Int. Ed., Engl., 52 (32), с. 8295-8298 (2013 Aug5). В другом варианте пептид, который предназначен для вставки, можно получить из пептидной библиотеки в формате фагового дисплея пептидов. В другом варианте можно использовать полноразмерный природный белок или его часть.

Для идентификации аминокислот, которые позволяют сохранять связывающую активность с первым антигеном CD3 (в случае CD3 человека, γ -цепь, δ -цепь или ϵ -цепь, составляющие CD3 человека), например, получают антитела, включающие изменение одного аминокислотного остатка, при изменении аминокислотного остатка в участках, которые предположительно принимают участие в связывании с антигеном, и анализируют указанные антитела. Связывание CD3 с антителами, включающими изменение одного аминокислотного остатка, можно оценить соответствующим образом выбранным методом, общеизвестным специалистам в данной области техники, и можно определить, например, методом ИФА (иммуно-ферментного анализа), FACS (сортировки клеток с активированной флуоресценцией), ALPHAScreen (гомогенным анализом усиленной за счет эффекта близости люминесценции) или методом BIACORE, основанном на явлении поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

Для идентификации аминокислот, которые позволяют сохранить связывающую активность с CD3,

можно использовать данные по соотношению количеств антигенов, например, связанных с различными измененными формами, и количества антигена, связанного с соответствующим неизмененным антителом. Более подробно, если количество соответствующего неизмененного связанного антитела равно X , а количество формы, связанной с одним измененным аминокислотным остатком, равно Y , то можно использовать значение Z (соотношение количеств связанных компонентов) $= Y/X$. Измененную форму можно рассматривать как сохраняющую связывающую активность по сравнению с соответствующим неизмененным антителом, если Z (соотношение количеств связанных компонентов) равно 0,5 или более, 0,6 или более, 0,7 или более, 0,8 или более, или 0,9 или более, предпочтительно 0,8 или более. Библиотеку антител можно получить таким образом, чтобы отображались аминокислоты, которые позволяют сохранить связывающую активность.

ВКМ (внеклеточный матрикс) представляет собой внеклеточный компонент и присутствует *in vivo* в различных участках. В связи с этим, известно, что антитело с высокой связывающей активностью в отношении ВКМ характеризуется более низкими кинетическими показателями в крови (более короткий период полураспада) (заявка WO 2012/093704 A1). Таким образом, в качестве аминокислот, которые отображаются в библиотеке антител, предпочтительно выбирают аминокислоты, которые не повышают связывание с ВКМ.

Чтобы выбрать аминокислоты, которые не влияют на связывание с ВКМ, связывание с ВКМ оценивают, например, по методике, описанной в примере сравнения 2. Величину связывания ВКМ (электролюминесцентная реакция (ECL)) каждой измененной формой делят на величину связывания ВКМ с антителом MRA (Н-цепь: SEQ ID NO: 57, L-цепь: SEQ ID NO: 58) и используют полученное значение. При оценке эффекта повышения связывания ВКМ с множеством измененных форм, в качестве указанной величины можно использовать полученное значение вплоть до 5-кратного, 6-кратного, 7-кратного, 8-кратного, 9-кратного, 10-кратного, 15-кратного, 20-кратного или 30-кратного повышения. Предпочтительно, для создания библиотеки используют полученное значение вплоть до 10-кратного повышения связывания. Библиотеку антител можно получить таким образом, чтобы отображались выбранные указанным образом аминокислоты.

В случае вставки в CDR3 пептида, включающего 6 аминокислотных остатков, но, не ограничиваясь только указанным случаем, связывание с ВКМ повышается, если удлиненная петля CDR3 обогащена аминокислотами, содержащими положительно заряженную боковую цепь. Следовательно, петля предпочтительно не должна включать три или более аминокислотных остатков, содержащих положительно заряженную боковую цепь.

В библиотеке по настоящему изобретению пептид для расширения разнообразия библиотеки можно вставлять в каждый варибельный домен. Примеры области, предпочтительной для пептидной вставки, включают экспонированные в растворитель области и петли в варибельном домене. Среди прочих предпочтительными являются CDR1, CDR2, CDR3, FR3 и петли. Прежде всего, предпочтительными являются следующие положения в варибельном домене Н-цепи: 31-35, 50-65, 71-74 и 95-102 согласно нумерации Кабата, а также следующие положения в варибельном домене L-цепи: 24-34, 50-56 и 89-97 согласно нумерации Кабата. Более предпочтительными являются следующие положения в варибельном домене Н-цепи: 31, 52а-61, 71-74 и 97-101 согласно нумерации Кабата, а также следующие положения в варибельном домене L-цепи: 24-34, 51-56 и 89-96 согласно нумерации Кабата. Еще более предпочтительными являются положения 99 и 100 в варибельном домене Н-цепи согласно нумерации Кабата. Аминокислоту, которая повышает антигенсвязывающую активность, можно кроме того включать в любое время в ходе изменения аминокислотных остатков.

В неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения типичная длина пептида, предназначенного для вставки, составляет от 1 до 3 аминокислотных остатков, от 4 до 6 аминокислотных остатков, от 7 до 9 аминокислотных последовательностей, от 10 до 12 аминокислотных остатков, от 13 до 15 аминокислотных остатков, от 15 до 20 аминокислотных остатков и от 21 до 25 аминокислотных остатков. Длина пептида, предназначенного для вставки, предпочтительно составляет от 1 до 3 аминокислотных остатков, от 4 до 6 аминокислотных остатков или от 7 до 9 аминокислотных остатков.

Участок вставки и длину пептида для расширения разнообразия библиотеки можно исследовать, получая молекулы, включающие пептидные вставки, и оценивая связывание таких молекул с CD3. Связывание с CD3 можно оценивать соответственно выбранным методом, общеизвестным специалистам в данной области техники, и можно определить, например, методом ИФА (иммуно-ферментного анализа), FACS (сортировки клеток с активированной флуоресценцией), ALPHA Screen (гомогенным анализом усиленной за счет эффекта близости люминесценции) или методом BIACORE, основанном на явлении поверхностного плазмонного резонанса (ППР).

В неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения библиотеку антител для получения антитела, связывающегося с CD3 и вторым антигеном, можно создать следующим образом:

стадия 1: выбор аминокислотных остатков, которые позволяют сохранить способность связываться с CD3 (для обеспечения связывания с 80% или более неизмененного антитела с CD3).

Библиотеку для получения антитела, связывающегося с CD3 и вторым антигеном, можно получить, например, таким образом, чтобы отображались аминокислоты, выбранные на стадии 1.

В неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения библиотеку антител для получения антитела, связывающегося с CD3 и вторым антигеном, можно создать следующим образом:

стадия 1: выбор аминокислотных остатков, которые позволяют сохранить способность связываться с CD3 (для обеспечения связывания с 80% или более неизмененного антитела с CD3), и

стадия 2: вставка аминокислотного остатка между положениями 99 и 100 (согласно нумерации Кабата) в Н цепь CDR3.

Библиотеку для получения антитела, связывающегося с CD3 и вторым антигеном, можно создать с расширенным разнообразием библиотеки, например, при проведении стадии 1, а также при вставке аминокислотного остатка в домен CDR3 на стадии 2.

В неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения библиотеку антител для получения антитела, связывающегося с CD3 и вторым антигеном, можно создать следующим образом:

стадия 1: выбор аминокислотных остатков, которые позволяют сохранить способность связываться с CD3 (для обеспечения связывания с 80% или более неизмененного антитела с CD3),

стадия 2: выбор аминокислотных остатков, которые обеспечивают 10-кратное повышение связывания с BKM по сравнению со связыванием с MRA до изменения, и

стадия 3: вставка аминокислот между положениями 99 и 100 (согласно нумерации Кабата) в Н цепь CDR3.

В качестве аминокислот, отображающихся в библиотеке, также можно выбрать аминокислотные остатки, которые не повышают связывание с BKM, например, на стадиях 1 и 3, а также на стадии 2, хотя настоящее изобретение не ограничено указанным подходом. Даже библиотека, полученная без проведения стадии 2, позволяет проводить анализ антигенсвязывающей молекулы, полученной из библиотеки, и оценивать связывание с BKM.

В неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения в качестве матрицы последовательности для антитела, связывающегося с CD3 (CD3ε), можно использовать VH-домен CE115HA000 (SEQ ID NO: 52). В указанном случае примеры аминокислот для использования при создании библиотеки включают любую одну или более аминокислот в положениях 11, 31, 52a, 52b, 52c, 53, 54, 56, 57, 61, 72, 78, 98, 99, 100, 100a, 100b, 100c, 100d, 100e, 100f, 100g и 101 согласно нумерации Кабата, содержащихся в варибельном домене тяжелой цепи.

Для создания библиотеки предпочтительно проводят изменение аминокислотных остатков V11L/L78I в VH-домине CE115HA000 (SEQ ID NO: 52), хотя библиотека по настоящему изобретению не ограничена проведением указанным изменением. Кроме того, для создания библиотеки предпочтительно проводят изменение аминокислотных остатков V11L/D72A/L78I/D101Q в VH-домине CE115HA000 (SEQ ID NO: 52), хотя библиотека по настоящему изобретению не ограничена указанным изменением.

В неограничивающем варианте осуществления настоящего изобретения VL домен GLS3000 (SEQ ID NO: 53) можно использовать в качестве матрицы последовательности для антитела, связывающегося с CD3 (CD3ε). В указанном случае примеры аминокислот для использования при создании библиотеки включают любой один или более аминокислотных остатков в следующих положениях: 11, 24, 25, 26, 27, 27a, 27b, 27c, 27e, 30, 31, 33, 34, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 74, 77, 89, 90, 92, 93, 94, 96 и 107 согласно нумерации Кабата, содержащихся в варибельном домене легкой цепи.

Получение библиотеки по настоящему изобретению включает, но, прежде всего, не ограничиваясь только ими, создание библиотеки, включающей антигенсвязывающие домены, аминокислотный остаток в которых в конкретном участке заменен на требуемый аминокислотный остаток, или создание библиотеки, включающей множество измененных форм антигенсвязывающих молекул, включающих антигенсвязывающие домены, при использовании известной в данной области методики создания библиотек, например, библиотек NNK или TRIM (Gonzalez-Munoz A. и др., mAbs (2012), Lee C.V. и др., J. Mol. Biol. (2004), Knappik A. и др., J. Mol. Biol. (2000) и Tiller T. и др., mAbs (2013)).

В настоящем изобретении термин "один или более аминокислотных остатков" не ограничивается конкретным числом аминокислотных остатков и может обозначать 2 или более типов аминокислотных остатков, 5 или более типов аминокислотных остатков, 10 или более типов аминокислотных остатков, 15 или более типов аминокислот или 20 типов аминокислотных остатков.

В случае дисплея гибридных полипептидов, гибридный полипептид варибельного домена антигенсвязывающей молекулы можно отображать в различных формах на поверхности клеток, вирусов и фагмидных частиц. Указанные формы включают одноцепочечные Fv фрагменты (scFvs), F(ab) фрагменты и мультивалентные формы указанных фрагментов. Мультивалентными формами предпочтительно являются димеры ScFv, Fab и F(ab'), которые обозначены в данном контексте как (ScFv)₂, F(ab)₂ и F(ab')₂, соответственно. Дисплей мультивалентных форм является предпочтительным, частично вероятно в связи с тем, что отображение мультивалентных форм обычно позволяет идентифицировать клоны, характеризующиеся низкой аффинностью и/или включающие множество антигенсвязывающих участков, что позволяет более эффективно осуществлять выбор редких клонов в ходе селекции.

Методы отображения гибридных полипептидов, включающих фрагменты антител на поверхности бактериофагов, известны в данной области и описаны, например, в заявке WO 1992/001047, а также в

настоящем описании. Другие аналогичные методы описаны в заявках WO 1992/020791, WO 1993/006213, WO 1993/011236 и WO 1993/019172. Специалисты в данной области могут соответствующим образом использовать указанные способы. В других опубликованных документах (статья Hoogenboom H.R., Winter G., J. Mol. Biol., 227, с. 381-388 (1992), заявки WO 1993/006213 и WO 1993/011236) описана идентификация антител с использованием набора искусственно перестроенных генов переменного домена в отношении различных антигенов, отображенных на поверхности фагов.

В случае конструирования вектора для отображения в форме scFv, указанный вектор включает последовательности нуклеиновых кислот, кодирующих переменный домен легкой цепи и переменный домен тяжелой цепи антигенсвязывающей молекулы. В основном, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный домен тяжелой цепи антигенсвязывающей молекулы, соединяют с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей компонент поверхностного белка вируса. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный домен легкой цепи антигенсвязывающей молекулы, присоединяют к нуклеиновой кислоте переменного домена тяжелой цепи антигенсвязывающей молекулы через последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую пептидный линкер. Пептидный линкер обычно содержит от 5 до 15 аминокислотных остатков. Необязательно, к 3'-концевому фрагменту последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей переменный домен легкой цепи антигенсвязывающей молекулы, или последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей переменный домен тяжелой цепи антигенсвязывающей молекулы, или обеих указанных последовательностей можно присоединять дополнительную последовательность, кодирующую, например, пептидную метку, пригодную для очистки или детектирования.

В случае конструирования вектора для отображения в форме F(ab), указанный вектор включает последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие переменные домены антигенсвязывающей молекулы и консервативные домены антигенсвязывающей молекулы. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный домен легкой цепи антигенсвязывающей молекулы, присоединяют к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей консервативный домен легкой цепи. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный домен тяжелой цепи антигенсвязывающей молекулы, присоединяют к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей консервативный СН1 домен тяжелой цепи. В основном, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменный домен тяжелой цепи и консервативный домен, соединяют с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей полноразмерный поверхностный белок вируса или его часть. Переменный домен тяжелой цепи и консервативный домен предпочтительно экспрессируют в виде гибридного продукта, по крайней мере, с частью поверхностного белка вируса, в то время как переменный домен легкой цепи и консервативный домен экспрессируют отдельно от гибридного белка, включающего тяжелую цепь и поверхностный белок вируса. Тяжелая цепь и легкая цепь могут быть связаны друг с другом ковалентной связью или нековалентной связью. Необязательно, к 3'-концевому фрагменту последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей консервативный домен легкой цепи антигенсвязывающей молекулы, или последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей консервативный домен тяжелой цепи антигенсвязывающей молекулы, или обеих указанных последовательностей можно присоединять дополнительную последовательность, кодирующую, например, полипептидную метку, пригодную для очистки или детектирования.

В отношении переноса вирусов в клетки хозяина, векторы, сконструированные, как описано выше, переносят в клетки хозяина для амплификации и/или экспрессии. Векторы можно переносить в клетки хозяина известным в данной области методом трансформации, включая электропорацию, осаждение в присутствии фосфата кальция и т.п. Если векторы представляют собой инфекционные частицы, такие как вирусы, векторы самостоятельно проникают в клетки хозяина. Гибридные белки отображаются на поверхности фаговых частиц при трансфекции клеток хозяина репликационными экспрессионными векторами, включающими вставки полинуклеотидов, кодирующих гибридные белки, и продуцировании фаговых частиц известным в данной области способом.

Репликационные экспрессионные векторы можно переносить в клетки хозяина с использованием различных методов. В неограничивающем варианте векторы можно переносить в клетки методом электропорации, как описано в заявке WO 2000/106717. Клетки культивируют при 37°C, необязательно в течение от 6 ч до 48 ч (или до тех пор, пока оптическая плотность при 600 нм не достигает значения от 0,6 до 0,8) в стандартной культуральной среде. Затем культуральную среду центрифугируют и отделяют клеточный супернатант (например, декантацией). На начальной стадии очистки клеточный осадок предпочтительно ресуспендируют в буферном растворе (например, 1,0 mM HEPES (pH 7,4)). Затем суспензию снова центрифугируют для отделения супернатанта. Полученный клеточный осадок ресуспендируют в глицерине, разбавленном до концентрации, например, от 5 об.% до 20 об.%. Суспензию снова центрифугируют, при этом отделяют супернатант и получают клеточный осадок. Клеточный осадок ресуспендируют в воде или в разбавленном глицерине. На основании измеренной плотности клеток полученной суспензии конечную плотность клеток подбирают таким образом, чтобы получить требуемое значение, используя воду или разбавленный глицерин.

Примеры предпочтительных клеток-реципиентов включают штамм SS320 E. coli, чувствительный к

электропорации (статья Sidhu и др., *Methods Enzymol.*, 328, с. 333-363 (2000)). Штамм SS320 *E. coli* получают объединением клеток MC1061 с клетками XL1-BLUE в условиях, достаточных для переноса фертильной эписомы (F'-плазида) или XL1-BLUE в клетки MC1061. Штамм SS320 *E. coli* депонирован в американской коллекции типов культур (ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, Вирджиния) под регистрационным номером 98795. Согласно настоящему изобретению можно использовать любую F'-эписому, обеспечивающую репликацию фагов в указанном штамме. Соответствующую эписому можно получить из штаммов, депонированных в ATCC, или можно получить в виде коммерческого продукта (TG1, CJ236, CSH18, DHF', ER2738, JM101, JM103, JM105, JM107, JM109, JM110, KS1000, XL1-BLUE, 71-18 и т.п.).

Использование более высоких концентраций ДНК (приблизительно в 10 раз выше) при электропорации позволяет увеличить частоту трансформации и число молекул ДНК, трансформирующих клетки хозяина. Применение высокой плотности клеток также повышает эффективность (приблизительно в 10 раз). Повышенное число перенесенных ДНК может обеспечить создание библиотеки с более расширенным разнообразием и большим числом независимых клонов с различными последовательностями. Трансформированные клетки обычно выбирают на основе присутствия или отсутствия роста в среде, содержащей антибиотик.

В настоящем изобретении, кроме того, предлагается нуклеиновая кислота, кодирующая антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению. Нуклеиновая кислота по настоящему изобретению может присутствовать в любой форме, такой как ДНК и РНК.

В настоящем изобретении, кроме того, предлагается вектор, включающий нуклеиновую кислоту по настоящему изобретению. Тип вектора соответствующим образом могут выбирать специалисты в данной области в соответствии с клетками хозяина, в которые переносят вектор. Например, можно использовать любой из упомянутых выше векторов.

Настоящее изобретение, кроме того, относится к клетке хозяина, трансформированной вектором по настоящему изобретению. Клетку хозяина соответствующим образом могут выбирать специалисты в данной области. Например, можно использовать любую из упомянутых выше клеток хозяина.

В настоящем изобретении также предлагается фармацевтическая композиция, включающая антигенсвязывающую молекулу по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно получить согласно способу, известному в данной области, добавляя к антигенсвязывающей молекуле по настоящему изобретению фармацевтически приемлемый носитель. Например, фармацевтическую композицию можно использовать в форме стерильного раствора или суспензии в воде или любого другого фармацевтически приемлемого раствора для парентеральной инъекции. Например, фармацевтическую композицию можно получить при смешивании антигенсвязывающей молекулы в стандартной лекарственной форме, используемой в стандартной фармацевтической практике, в соответствующей комбинации с фармацевтически приемлемыми носителями или средами, прежде всего, стерильной водой, физиологическим раствором, растительным маслом, эмульгатором, суспендирующим агентом, ПАВ, стабилизатором, ароматизатором, эксципиентом, носителем, консервантом, связующим агентом и т.п. Конкретные примеры носителя могут включать светлую безводную кремниевую кислоту, лактозу, кристаллическую целлюлозу, маннит, крахмал, кальциевую соль кармеллозы, натриевую соль кармеллозы, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, поливинилацеталь-диэтиламиноацетат, поливинилпирролидон, желатин, триглицерид среднецепочечной жирной кислоты, полиоксиэтиленгидрированное касторовое масло 60, сахарид, карбоксиметилцеллюлозу, кукурузный крахмал и неорганические соли. Количество активного ингредиента в таком препарате определяют таким образом, чтобы обеспечить соответствующую дозу в назначенном диапазоне.

Стерильную композицию для инъекции можно получить согласно стандартной фармацевтической практике с использованием носителя, такого как дистиллированная вода для инъекций. Примеры водных растворов для инъекций включают физиологический раствор, изотонические растворы, содержащие глюкозу и другие адъюванты, например, D-сорбит, D-манноза, D-маннит и хлорид натрия. Указанные растворы можно использовать в комбинации с соответствующим стабилизатором, например спиртом (прежде всего, с этанолом) или многоатомным спиртом (например, пропиленгликолем и полиэтиленгликолем), или с неионогенным ПАВ, например, с полисорбатом 80(TM) или HCO-50.

Примеры растворов масел включают кунжутное масло и соевое масло. Указанные растворы можно использовать в комбинации с бензилбензоатом или бензиловым спиртом в качестве стабилизатора. Растворы можно дополнительно смешивать с буферным раствором (например, фосфатный буферный раствор и буферный раствор ацетата натрия), успокаивающим средством (например, гидроксид прокаина), стабилизатором (например, бензиловый спирт и фенол) и антиоксидантом. Полученными таким образом растворами для инъекций обычно заполняют соответствующие ампулы. Фармацевтическую композицию по настоящему изобретению предпочтительно вводят парентерально. Конкретные примеры указанных стандартных лекарственных форм включают инъекции, агенты для интраназального введения, агенты для транспульмонального введения и агенты для чрескожного введения. Примеры инъекций включают внутривенную инъекцию, внутримышечную инъекцию, внутривнутрибрюшинную инъекцию и под-

кожную инъекцию, которые можно использовать для введения фармацевтической композиции системным или местным способом.

Способ введения можно соответствующим образом выбирать в зависимости от возраста и симптомов пациента. Дозу фармацевтической композиции, содержащей полипептид или полинуклеотид, кодирующий полипептид, можно выбрать в диапазоне, например, от 0,0001 мг/кг до 1000 мг/кг массы тела в расчете на дозу. В другом варианте, дозу можно выбрать в диапазоне, например, от 0,001 до 100000 мг/кг массы тела пациента, хотя доза необязательно ограничена указанными численными значениями. Несмотря на то, что доза и способ введения изменяются в зависимости от массы тела, возраста, симптомов пациента и т.п., специалисты в данной области соответствующим образом могут выбирать дозу и способ.

В настоящем изобретении предлагается также способ лечения рака, включающий стадию введения антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению, при этом антигенсвязывающая молекула по настоящему изобретению предназначена для применения при лечении рака, а также включающий применение антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению при получении терапевтического агента, предназначенного для лечения рака, и способ получения терапевтического агента, предназначенного для лечения рака, включающий стадию применения антигенсвязывающей молекулы по настоящему изобретению.

Трехбуквенные коды и соответствующие однобуквенные коды, использованные для обозначения аминокислот в данном контексте, определены следующим образом: аланин: Ala и A, аргинин: Arg и R, аспарагин: Asn и N, аспарагиновая кислота: Asp и D, цистеин: Cys и C, глутамин: Gln и Q, глутаминовая кислота: Glu и E, глицин: Gly и G, гистидин: His и H, изолейцин: Ile и I, лейцин: Leu и L, лизин: Lys и K, метионин: Met и M, фенилаланин: Phe и F, пролин: Pro и P, серии: Ser и S, треонин: Thr и T, триптофан: Trp и W, тирозин: Tyr и Y, и валин: Val и V.

Специалистам в данной области представляется очевидным, что настоящее изобретение также включает одну или любую комбинацию двух или более аспектов, описанных в данном контексте, если на основе общих технических принципов, известных специалистам в данной области техники, не возникает технического противоречия.

Все документы, цитированные в данном контексте, включены в полном объеме в настоящее описание в качестве ссылок.

Далее настоящее изобретение проиллюстрировано приведенными ниже примерами. Однако приведенные ниже примеры не ограничивают настоящее изобретение.

Примеры

Пример 1.

Концепция измененного переменного домена (Fab-фрагмент) иммуноглобулина, который связывается с CD3 (первым антигеном) и другим антигеном (вторым антигеном), но не связывается одновременно с CD3 (первым антигеном) и другим антигеном (вторым антигеном) на различных клетках.

Связывание иммуноглобулина с двумя или более молекулами активирующего рецептора FcγR одновременно, или с активирующим рецептором FcγR и одновременно с другим антигеном вызывает реакцию сшивки активирующего FcγR, что, в свою очередь, может передавать сигналы ITAM FcγR и приводить к возможной активации иммунных клеток. Одна молекула антитела типа IgG способна связываться только с одной молекулой FcγR, как описано выше. Следовательно, только в присутствии антигена сшивка двух или более молекул активирующего FcγR вызывает активацию иммунных клеток.

При связывании антитела типа IgG с антигеном через его переменный домен (Fab), указанное антитело также способно одновременно связываться с одной или более молекулами FcγR через его Fc-область. Указанное вызывает сшивку клетки, экспрессирующей антиген, с клеткой, экспрессирующей FcγR. В зависимости от клетки, экспрессирующей антиген, такая сшивка антигена и FcγR может оказывать нежелательный эффект. Прежде всего, если антигеном является, например, CD3, сшивка Т-клетки с клеткой, экспрессирующей FcγR, может вызвать иммунную активацию, такую как высвобождение цитокинов (J. Immunol., 163 (3), с. 1246-1252 (1999 Aug. 1)). В указанном случае Fc-область может утратить свою связывающую активность с FcγR из-за включения изменения, предотвращающего реакцию сшивки антигена с FcγR (Advanced Drug Delivery Reviews, 58, с. 640-656 (2006)). Аналогичным образом, при связывании антигенов с антителами типа IgG, например, с молекулами подсемейства TNFR (например, CD40, OX40 и CD27) или CD3 и TLR (например, TLR2, TLR4, TLR8 и TLR9), FcγR-опосредованная сшивка вызывает системную иммунную активацию. Таким образом, одновременное связывание этих молекул, экспрессируемых на различных клетках, является нежелательным.

Между тем, стандартное мультиспецифическое антитело связывается одновременно с множеством антигенов. В зависимости от комбинации антигенов одновременное связывание с множеством антигенов может быть нежелательным. Например, интегрин αvβ3, известный как молекула клеточной адгезии, экспрессируется во многих раковых клетках и окружающих опухоль кровеносных сосудах, и, в связи с этим, его можно использовать в качестве молекулы-мишени при направленной доставке лекарственного средства в опухоль (Haubner R., PLoS Med., 2, e70 (2005)), несмотря на то, что указанная молекула, как известно, также экспрессируется в различных нормальных клетках (Thromb. Haemost., 80 (5), с. 726-734).

(1998 Nov.)) - В связи с этим, одновременное связывание мультиспецифического антитела с CD3 и с интегрином $\alpha v \beta 3$ может повредить нормальные клетки из-за сильной цитотоксической активности, опосредованной Т-клетками.

Соответственно, возможный метод контроля такой нежелательной реакции сшивки заключается в применении молекулы Fab с двойной связывающей активностью, одна часть варибельного домена (Fab) которой связывается с первым антигеном, а другая часть, которая не принимает участия в указанном связывании с первым антигеном, связывается со вторым антигеном (фиг. 1). При условии, что два фрагмента, расположенные максимально близко в одном варибельном домене (Fab), играют важную роль при связывании с их соответствующими антигенами, как показано на фиг. 1, связывание с первым антигеном ингибирует связывание со вторым антигеном, при этом связывание со вторым антигеном также ингибирует связывание с первым антигеном. Таким образом, модифицированное антитело, характеризующееся свойствами такой молекулы Fab с двойной связывающей активностью, не способно связываться с первым антигеном и вторым антигеном одновременно и, следовательно, может не вызвать реакцию сшивки первого антигена и второго антигена (фиг. 2). Считается также, что молекула Fab с двойной связывающей активностью способна одновременно связываться с обоими антигенами - с первым антигеном и вторым антигеном, когда первый антиген и второй антиген не экспрессируются на клеточных мембранах, как в случае растворимых белков, или оба антигена находятся на одной и той же клетке, но не связываются одновременно с указанными антигенами, когда каждый антиген экспрессируется на различных клетках, а также не сшивает указанные две клетки (фиг. 3). С другой стороны, антиген (третий антиген), связывающийся с другим варибельным доменом (Fab), может вступать в реакцию сшивки с первым антигеном (фиг. 4) или может вступать в реакцию сшивки со вторым антигеном (фиг. 5). Для указанного антитела, Fc область, связывающуюся с Fc γ R, можно использовать в качестве консервативного домена, или в качестве консервативного домена можно использовать Fc область, характеризующуюся сниженной связывающей активностью с Fc γ R.

Кроме того, при использовании свойств указанной молекулы Fab с двойной связывающей активностью можно, например, предложить метод повреждения раковых клеток, экспрессирующих раковый антиген, с помощью опосредованного антителом притока Т-клеток с использованием интегрин в качестве мишени в раковых тканях и таким образом обеспечить более высокую противораковую специфичность.

Краткое описание метода: если варибельный домен (Fab) можно модифицировать в Fab с двойной связывающей активностью, чтобы обеспечить следующие свойства, можно получить антитело, характеризующееся свойствами, как показано на фиг. 1:

- 1) связывающей активностью с первым антигеном;
- 2) связывающей активностью со вторым антигеном; и
- 3) отсутствием способности одновременно связываться с первым антигеном и вторым антигеном.

Выражение "не связывающаяся с первым антигеном и вторым антигеном одновременно" также включает как отсутствие сшивки клетки, экспрессирующей первый антиген, с клеткой, экспрессирующей второй антиген, так и отсутствие одновременного связывания с первым антигеном и вторым антигеном, когда каждый антиген экспрессируется на различных клетках. Указанное выражение, кроме того, включает случай, когда варибельный домен способен одновременно связываться с обоими антигенами - с первым антигеном и вторым антигеном, когда первый антиген и второй антиген не экспрессируются на клеточных мембранах, как в случае растворимых белков, или оба антигена находятся на одной и той же клетке, но не способны связываться одновременно с первым антигеном и вторым антигеном, когда каждый антиген экспрессируется на различных клетках.

Аналогичным образом, если варибельный домен (Fab) можно модифицировать в Fab с двойной связывающей активностью, чтобы обеспечить следующие свойства, можно получить антитело, характеризующееся свойствами, как показано на фиг. 6:

- 1) связывающей активностью с первым антигеном на Т-клетке;
- 2) связывающей активностью со вторым антигеном на антиген-презентирующей клетке; и
- 3) отсутствием способности одновременно связываться с первым антигеном и вторым антигеном.

Пример 2.

Получение антитела CE115 против CD3 ϵ человека и CD3 ϵ яванской макаки.

(2-1) Получение гибридомы с использованием крысы, иммунизированной клетками, экспрессирующими CD3 человека и CD3 яванской макаки.

Каждую крысу SD (самка, возраст 6 недель в начале иммунизации, фирмы Charles River Laboratories Japan, Inc.) иммунизировали клетками Ba/F3, экспрессирующими CD3 $\epsilon\gamma$ человека или CD3 $\epsilon\gamma$ яванской макаки, следующим образом: в день 0 (первоначальную дату определяли как день 0), крысе вводили внутрибрюшинно 5×10^7 клеток Ba/F3, экспрессирующих CD3 $\epsilon\gamma$ человека, наряду с полным адьювантом Фрейнда (фирмы Difco Laboratories, Inc.). В день 14 вводили внутрибрюшинно 5×10^7 клеток Ba/F3, экспрессирующих CD3 $\epsilon\gamma$ яванской макаки, наряду с неполным адьювантом Фрейнда (фирмы Difco Laboratories, Inc.). Затем крысе поочередно через неделю (в целом 4 раза) внутрибрюшинно вводили 5×10^7 клеток Ba/F3, экспрессирующих CD3 $\epsilon\gamma$ человека, и клеток Ba/F3, экспрессирующих CD3 $\epsilon\gamma$ яванской макаки.

Через неделю (в день 49) для усиления иммунной реакции последний раз внутривенно вводили CD3εγ, клетки Ba/F3, экспрессирующие CD3εγ человека. Через 3 дня для получения гибридом клетки селезенки крысы смешивали с клетками миеломы мыши SP2/0 стандартным методом с использованием ПЭГ1500 (фирмы Roche Diagnostics К.К.). Гибридные клетки, т.е. гибридомы, культивировали в среде RPMI1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС, в данном контексте сокращено как 10% ФБС/RPMI1640).

Через день после гибридизации (1) гибридные клетки суспендировали в полужидкой среде (фирмы Stemcell Technologies, Inc.). Гибридомы селективно культивировали и также получали колонии клеток.

Через 9 или 10 дней после гибридизации колонии гибридом собирали и высевали в количестве 1 колония/лунку в 96-луночном планшете, содержащем селективную среду HAT (10% ФБС/RPMI1640, 2 об.% HAT 50×концентрат (фирмы Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd.), и 5 об.% BM-Condensed H1 (фирмы Roche Diagnostics К.К.)). Через 3-4 дня культивирования из каждой лунки отбирали культуральный супернатант и в нем измеряли концентрацию IgG крысы. Культуральный супернатант, в котором было подтверждено присутствие IgG крысы, анализировали для выявления клона, продуцирующего антитело, специфически связывающееся с CD3εγ человека, методом цельноклеточного ИФА, используя иммобилизованные клетки Ba/F3, экспрессирующие CD3εγ человека, или иммобилизованные клетки Ba/F3, не экспрессирующие CD3εγ человека (фиг. 7). Клон также оценивали на перекрестную реакцию с CD3εγ яванской макаки методом цельноклеточного ИФА, используя иммобилизованные клетки Ba/F3, экспрессирующие CD3εγ яванской макаки (фиг. 7).

(2-2) Получение химерного антитела против CD3ε человека и CD3ε макаки.

Полноразмерную РНК экстрагировали из каждой гибридомной клетки с использованием мини-наборов RNeasy Mini Kits (фирмы Qiagen N.V.) и синтезировали кДНК с использованием набора для амплификации ДНК SMART RACE cDNA Amplification Kit (фирмы BD Biosciences). Полученную кДНК использовали в методе ПЦР для встраивания гена варибельного домена антитела в клонирующий вектор. Нуклеотидную последовательность каждого фрагмента ДНК определяли с использованием набора BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (фирмы Applied Biosystems, Inc.) и секвенатора ДНК ABI PRISM 3700 DNA Sequencer (фирмы Applied Biosystems, Inc.) по методике, описанной в руководстве по эксплуатации, прилагаемом к прибору. Фрагменты CDR и FR варибельного домена H цепи CE115 (SEQ ID NO: 13) и варибельного домена L-цепи CE115 (SEQ ID NO: 14) определяли согласно системе нумерации Кабата.

Ген, кодирующий H-цепь химерного антитела, содержащего варибельный домен H-цепи антитела крысы, присоединенный к консервативному домену антитела IgG1 человека, и ген, кодирующий L-цепь химерного антитела, содержащего варибельный домен L-цепи антитела крысы, присоединенный к консервативному домену каппа цепи антитела человека, встраивали в экспрессионные векторы клеток животных. Полученные экспрессионные векторы использовали для экспрессии и очистки химерного антитела CE115 (пример сравнения 1).

(2-3) Получение антитела EGFR_ERY22_CE115.

Затем IgG против ракового антигена (EGFR) использовали в качестве основной цепи для получения молекулы в форме, содержащей один Fab-фрагмент, замененный на CD3ε-связывающие домены. При проведении указанной операции в качестве Fc основной цепи IgG использовали молчащий Fc, характеризующийся сниженной связывающей активностью с FcγR (с рецептором Fcγ), как в упомянутом выше случае. Цетуксимаб VH (SEQ ID NO: 15) и цетуксимаб VL (SEQ ID NO: 16), входящие в состав варибельного домена цетуксимаба, использовали в качестве EGFR-связывающих доменов. В качестве консервативных доменов H цепи антитела использовали Gld, полученный из IgG1 при делеции C-концевых остатков Gly и Lys, A5, полученный из Gld при включении мутаций D356K и H435R, а также B3, полученный из Gld при включении мутации K439E, и каждый комбинировали с цетуксимабом VH, при этом получали цетуксимаб VH-Gld (SEQ ID NO: 17), цетуксимаб VH-A5 (SEQ ID NO: 18) и цетуксимаб VH-B3 (SEQ ID NO: 19) по методике, описанной в примере сравнения 1. При обозначении консервативного домена H-цепи антитела как H1, последовательность, соответствующую H-цепи антитела, включающей цетуксимаб VH в качестве варибельного домена, обозначали как цетуксимаб VH-H1.

В данном контексте изменение аминокислоты, представлено, например, как D356K. Первый символ (т.е. D) обозначает аминокислотный остаток до изменения в однобуквенном коде. Число (т.е. 356), следующее за символом, обозначает положение указанного измененного остатка согласно нумерации Кабата. Последний символ (т.е. K) обозначает символ, который представляет собой аминокислотный остаток после изменения в однобуквенном коде.

Антитело EGFR_ERY22_CE115 (фиг. 8) получали обменом между VH-доменом и VL-доменом в составе Fab против EGFR. Более подробно, серии экспрессионных векторов, включающих вставку каждого полинуклеотида, кодирующего EGFR_ERY22_Hk (SEQ ID NO: 20), EGFR_ERY22_L (SEQ ID NO: 21), CE115_ERY22_Hh (SEQ ID NO: 22) или CE115_ERY22_L (SEQ ID NO: 23),

получали известным методом, таким как метод ПЦР, используя праймеры, включающие соответствующую последовательность, добавленную тем же способом, как указано выше.

Экспрессионные векторы переносили в следующей комбинации в клетки FreeStyle 293-F, где временно экспрессировали каждую исследуемую молекулу.

Исследуемая молекула: EGFR_ERY22_CE115.

Полипептиды, кодируемые полинуклеотидами, встроенными в экспрессионные векторы: EGFR_ERY22_Hk, EGFR_ERY22_L, CE115_ERY22_Hh и CE115_ERY22_L.

(2-4) Очистка антитела EGFR_ERY22_CE115

Полученный культуральный супернатант наносили на колонку Anti FLAG M2 (фирмы Sigma-Aldrich Corp.) и колонку промывали, затем исследуемое антитело элюировали раствором пептида FLAG (0,1 мг/мл, фирмы Sigma-Aldrich Corp.). Фракцию, содержащую требуемое антитело, наносили на колонку HisTrap HP (фирмы GE Healthcare Japan Corp.) и колонку промывали, затем элюировали в градиенте концентрации имидазола. Фракцию, содержащую требуемое антитело, концентрировали методом ультрафильтрации. Затем указанную фракцию наносили на колонку Superdex 200 (фирмы GE Healthcare Japan Corp.). Из элюата выделяли только мономерную фракцию, при этом получали исследуемую очищенную молекулу.

(2-5) Измерение цитотоксической активности с использованием моноклеарных клеток периферической крови человека.

(2-5-1) Получение раствора моноклеарных клеток периферической крови человека (МКПК).

У каждого здорового добровольца (взрослого) отбирали 50 мл периферической крови с использованием шприца, предварительно наполненного 100 мкл раствора гепарина (1000 ед./мл, Novo-Heparin 5000 единиц для инъекций, фирмы Novo Nordisk A/S). Периферическую кровь 2-кратно разбавляли фосфатно-солевым буферным раствором ФСБ(-) и затем разделяли на 4 равные части, которые затем добавляли в пробирки для выделения лимфоцитов Leucosep (номер по каталогу 227290, фирмы Greiner Bio-One GmbH), предварительно наполненные 15 мл Ficoll-Paque PLUS и заранее центрифугировали. После центрифугирования (2150 об/мин, 10 мин, комнатная температура) в пробирках для выделения отделяли слой фракции моноклеарных клеток. Клетки во фракции моноклеарных клеток промывали один раз средой Игла, модифицированной Дульбекко (D-MEM), содержащей 10% ФБС (фирмы Sigma-Aldrich Corp., в данном контексте 10% ФБС/D-MEM). Затем клетки разбавляли 10% ФБС/D-MEM до плотности 4×10^6 клеток/мл. Полученный таким образом раствор клеток использовали в качестве МКПК человека при проведении следующего анализа.

(2-5-2) Измерение цитотоксической активности.

Цитотоксическую активность оценивали на основе скорости подавления роста клеток с использованием анализатора клеток в режиме реального времени xCELLigence real-time cell analyzer (фирмы Roche Diagnostics). В качестве клеток-мишеней использовали линию клеток SK-pc13a, созданную в результате вынужденной экспрессии EGFR человека клетками линии SK-HEP-1. Клетки SK-pc13a отдели от чашки, и высевали в количестве 100 мкл/лунку (1×10^4 клеток/лунку) в 96-луночный планшет E-Plate (фирмы Roche Diagnostics), при этом начинали анализ живых клеток с использованием анализатора клеток в режиме реального времени xCELLigence real-time cell analyzer. На следующий день планшет вынимали из анализатора xCELLigence real-time cell analyzer и в планшет добавляли 50 мкл каждого антитела при каждой концентрации: 0,004 нМ, 0,04 нМ, 0,4 нМ и 4 нМ. Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 15 мин, затем в планшет добавляли 50 мкл (2×10^5 клеток/лунку) раствора МКПК человека, полученного, как описано в предыдущем разделе (2-5-1). Указанный планшет снова помещали в анализатор xCELLigence real-time cell analyzer и начинали анализ живых клеток. Реакцию проводили при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Через 72 ч после добавления МКПК человека определяли степень подавления роста клеток (%) по значению клеточного индекса, согласно приведенному ниже уравнению. При расчете в качестве значения клеточного индекса использовали численное значение, полученное после нормализации на значение клеточного индекса, полученное непосредственно перед добавлением антитела, которое определяли как равное 1.

Степень подавления роста клеток (%) = $(A-B) \times 100 / (A-1)$, где А обозначает среднее значение клеточного индекса, полученное для лунок, в которые не добавляли антитело (содержат только клетки-мишени и МКПК человека), а В обозначает среднее значение клеточного индекса, полученное для лунок, в которые добавляли каждое антитело. Испытание проводили в трех повторях.

Цитотоксическую активность антитела CE115, содержащего EGFR_ERY22_CE115, определяли с использованием МКПК, полученных из крови человека, в качестве эффекторных клеток. В результате была подтверждена чрезвычайно высокая активность (фиг. 9).

Пример 3.

Получение антитела, которое связывается с CD3 и с интегрином $\alpha v \beta 3$ человека, но не связывается с указанными антигенами одновременно.

Как показано на фиг. 1-6, Fab с двойной связывающей активностью представляет собой молекулу, которая связывается с CD3 (первым антигеном) и исследуемым антигеном (вторым антигеном) через свой вариабельный домен (Fab), но не связывается с CD3 (первым антигеном) и исследуемым антигеном (вторым антигеном) одновременно. В случае включения изменения аминокислотных остатков для связы-

вания со вторым антигеном в Fab-область антитела, связывающегося с CD3 (первым антигеном), изменение аминокислотных остатков обычно проводят в обеих Н-цепях или L-цепях. В результате включения изменения в обе Н-цепи или L-цепи две Fab-области антитела приобретают способность связываться с двумя антигенами, соответственно. Таким образом, указанные две Fab-области могут связываться с CD3 (первым антигеном) и исследуемым антигеном (вторым антигеном) одновременно и сшивать их. В связи с этим, одну Fab-область антитела получают в виде Fab-области, связывающейся с третьим антигеном или не связывающейся ни с одним антигеном, а другую Fab-область получают в виде Fab с двойной связывающей активностью, чтобы предотвратить реакцию сшивки между CD3 (первым антигеном) и исследуемым антигеном (вторым антигеном).

(3-1) Получение антитела, которое связывается с CD3 и с интегрином $\alpha v \beta 3$ человека, но не связывается с указанными антигенами одновременно.

Интегрин $\alpha v \beta 3$, известный как молекула клеточной адгезии, экспрессируется во многих раковых клетках и окружающих опухоль кровеносных сосудах и, в связи с этим, его можно использовать в качестве молекулы-мишени при направленной доставке лекарственного средства в опухоль, несмотря на то, что указанная молекула, как известно, также экспрессируется в различных нормальных клетках (Thromb. Haemost., 80 (5), с. 726-734 (1998 Nov.))- Таким образом, одновременное связывание с CD3 и с интегрином $\alpha v \beta 3$ может повредить нормальные клетки из-за сильной цитотоксической активности, опосредованной Т-клетками. Соответственно, было предположено, что молекула антитела против EGFR может направленно поражать опухолевые клетки, экспрессирующие интегрин $\alpha v \beta 3$, не повреждая нормальные клетки, если можно получить молекулу, которая не связывается с CD3 и интегрином $\alpha v \beta 3$ одновременно. В связи с этим, было проведено исследование для получения молекулы Fab с двойной связывающей активностью, которая способна связываться с EGFR через один вариабельный домен (Fab) и связываться с первым антигеном CD3 и вторым антигеном, интегрином $\alpha v \beta 3$, через другой вариабельный домен, но не способна связываться с CD3 и с интегрином $\alpha v \beta 3$ одновременно.

При условии, что "молекулу, которая связывается с CD3 через одну Fab-область в отсутствие интегрин $\alpha v \beta 3$ и связывается с интегрином $\alpha v \beta 3$ через другую Fab-область в отсутствие CD3" можно представить как "молекулу, которая не связывается с интегрином $\alpha v \beta 3$ в состоянии связывания с CD3 или не связывается с CD3 в состоянии связывания с интегрином $\alpha v \beta 3$ ", можно сделать вывод об успешном конструировании молекулы Fab с двойной связывающей активностью, с требуемыми свойствами исследуемой Fab с двойной связывающей активностью (т.е. характеризующейся способностью связываться с CD3 и вторым антигеном и отсутствием способности одновременно связываться с CD3 и вторым антигеном).

(3-2) Получение антитела, включающего Fab-область, связывающуюся с интегрином $\alpha v \beta 3$

Возможные способы получения молекулы Fab с двойной связывающей активностью включают метод использования библиотек и метод вставки пептида с известной связывающей активностью с белком. Пептид RGD (Arg-Gly-Asp) известен как пептид, проявляющий связывающую активность с интегрином $\alpha v \beta 3$. В связи с этим, пептид RGD встраивали в петлю тяжелой цепи CD3ε-связывающего антитела CE115 (вариабельный домен тяжелой цепи: SEQ ID NO: 13, вариабельный домен легкой цепи: SEQ ID NO: 14), при этом получали гетеродимеризованное антитело, которое включало EGFR-связывающие домены в одном Fab-фрагменте, а также CD3-связывающий домен и домен, связывающийся с интегрином $\alpha v \beta 3$, в другом Fab-фрагменте, как описано в примере сравнения 1. Более подробно, получали серии экспрессионных векторов таким образом, чтобы обеспечить встраивание каждого полинуклеотида, кодирующего

EGFR ERY22_Hk (SEQ ID NO: 20), EGFR ERY22_L (SEQ ID NO: 21) или CE115 ERY22_L (SEQ ID NO: 23), а также полинуклеотида, кодирующего любой из следующих фрагментов: CE115_2 ERY22_Hh (SEQ ID NO: 24, положения 52b и 53 согласно системе нумерации Кабата заменены на К и N, соответственно), CE115_4 ERY22_Hh (SEQ ID NO: 25, положения 52b и 54 согласно системе нумерации Кабата заменены на S и N, соответственно), CE115_9 ERY22_Hh (SEQ ID NO: 26, вставка RGD между положениями 52a и 52b согласно системе нумерации Кабата), CE115_10 ERY22_Hh (SEQ ID NO: 27, вставка RGD между положениями 52b и 52c согласно системе нумерации Кабата), CE115_12 ERY22_Hh (SEQ ID NO: 28, вставка RGD между положениями 72 и 73 согласно системе нумерации Кабата), CE115_17 ERY22_Hh (SEQ ID NO: 29, положения 52b и 52c согласно системе нумерации Кабата заменены на К и S, соответственно), CE115_47 ERY22_Hh (SEQ ID NO: 30, вставка RGD между положениями 98 и 99 согласно системе нумерации Кабата), CE115_48 ERY22_Hh (SEQ ID NO: 31, вставка RGD между положениями 99 и 100 согласно системе нумерации Кабата), и CE115_49 ERY22_Hh (SEQ ID NO: 32, вставка RGD между положениями 100 и 100a согласно системе нумерации Кабата).

Антитело (EH240-Knl25/EH240-H1076/L73, SEQ ID NO: 33/34/35) со вставкой пептида RGD (Arg-Gly-Asp) в CH3 области антитела, описанное в статье J. Biotech., 155, с. 193-202 (2011), также получали в

качестве контроля, как описано в примере сравнения 1. Можно предположить, что указанная молекула, связывающаяся с интегрином $\alpha v\beta 3$ через ее СНЗ область, способна одновременно связываться с CD3 и с интегрином $\alpha v\beta 3$.

(3-3) Подтверждение связывания антитела с интегрином $\alpha v\beta 3$.

Связывание каждой молекулы, включающей вставку RGD (Arg-Gly-Asp) в Fab-области, с интегрином $\alpha v\beta 3$ оценивали методом электрохемолуминесценции (методом ECL). Более подробно, биотин-конъюгированное антитело Ab против IgG человека (фирмы Southern Biotech), разбавленное раствором TBS, содержащим 0,1% бычьего сывороточного альбумина (БСА), 0,1 г/л хлорида кальция и 0,1 г/л хлорида магния (в данном контексте раствор для разбавления(+)), при этом концентрацию раствора каждого антитела доводили до 5 мкг/мл или 1 мкг/мл, а также интегрин $\alpha v\beta 3$ (фирмы R&D Systems, Inc.), содержащий сульфо-метку, каждый из указанных растворов добавляли в количестве 25 мкл/лунку в 96-луночный микропланшет с круглым дном Nunc-Immuno(TM) MicroWell(TM) (фирмы Nunc) и перемешивали, затем планшет инкубировали при 4°C в течение ночи, при этом получали комплекс антитело-антиген. Раствор TBS, содержащий 0,5% БСА, 0,1 г/л хлорида кальция и 0,1 г/л хлорида магния (в данном контексте блокирующий(+) раствор) добавляли в количестве 150 мкл/лунку в планшет с иммобилизованным стрептавидином (фирмы MSD K.K.) и планшет инкубировали при 4°C в течение ночи. Блокирующий раствор удаляли и затем каждую лунку промывали три раза по 250 мкл раствора TBS, содержащего 0,1 г/л хлорида кальция и 0,1 г/л хлорида магния (в данном контексте раствор TBS(+)). В планшет добавляли раствор комплекса антитело-антиген в количестве 75 мкл/лунку и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч, при этом биотин-конъюгированное антитело Ab против IgG человека связывалось со стрептавидином, иммобилизованным на планшете. Раствор комплекса антитело-антиген удаляли, затем каждую лунку промывали три раза раствором TBS(+) и в каждую лунку добавляли буферный раствор READ (фирмы MSD K.K.) в количестве 150 мкл/лунку, затем регистрировали люминесцентный сигнал сульфо-метки с использованием прибора Sector Imager 2400 (фирмы MSD K.K.).

Результаты, показанные на фиг. 11, свидетельствуют о том, что исходное антитело EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115 ERY22_Hh/CE115 ERY22_L не проявляет связывающей активности с интегрином $\alpha v\beta 3$, в то время как все антитела

EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_2

ERY22_Hh/CE115 ERY22_L, EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_4

ERY22_Hh/CE115 ERY22_L, EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_9

ERY22_Hh/CE115 ERY22_L, EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_10

ERY22_Hh/CE115 ERY22_L, EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_12

ERY22_Hh/CE115 ERY22_L, EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_17

ERY22_Hh/CE115 ERY22_L, EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_47

ERY22_Hh/CE115 ERY22_L, EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_48

ERY22_Hh/CE115 ERY22_L и EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_49

ERY22_Hh/CE115 ERY22_L

связываются с интегрином $\alpha v\beta 3$.

(3-4) Подтверждение связывания антитела с CD3 (CD3ε).

Затем методом ECL оценивали способность каждого антитела, включающего Fab-область, связывающуюся с интегрином $\alpha v\beta 3$, полученного, как описано в предыдущем разделе, сохранять связывающую активность с CD3. Более подробно, биотин-конъюгированное антитело Ab против IgG человека (фирмы Southern Biotech), разбавленное раствором TBS, содержащим 0,1% БСА (в данном контексте раствор для разбавления(-)), при этом концентрацию каждого из указанных растворов антитела доводили до 5 мкг/мл или 1 мкг/мл, а также гомодимерный белок CD3ε, содержащий сульфо-метку, каждый добавляли в количестве 25 мкл/лунку в 96-луночный микропланшет с круглым дном Nunc-Immuno(TM) MicroWell(TM) (фирмы Nunc) и перемешивали, затем планшет инкубировали при 4°C в течение ночи, при этом получали комплекс антитело-антиген. Раствор TBS, содержащий 0,5% БСА (в данном контексте блокирующий(-) раствор) добавляли в количестве 150 мкл/лунку в планшет с иммобилизованным стрептавидином (фирмы MSD K.K.) и планшет инкубировали при 4°C в течение ночи. Блокирующий раствор удаляли и затем каждую лунку промывали три раза по 250 мкл раствора TBS(-). В планшет добавляли раствор комплекса антитело-антиген в количестве 75 мкл/лунку и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч, при этом конъюгированное антитело Ab против IgG человека связывалось со стрептавидином, иммобилизованным на планшете. Раствор комплекса антитело-антиген удаляли, затем каждую лунку промывали три раза раствором TBS(-) и в каждую лунку добавляли буферный раствор READ (фирмы MSD K.K.) в количестве 150 мкл/лунку, затем регистрировали люминесцентный сигнал сульфо-метки с использованием прибора Sector Imager 2400 (фирмы MSD K.K.).

Результаты, показанные на фиг. 12, свидетельствуют о том, что исходное антитело EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, а также антитела

EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_2

ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_4

ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_9

ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_10

ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_12

ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_17

ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_47

ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_48

ERY22_Hh/CE115_ERY22_L и EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_49

ERY22_Hh/CE115_ERY22_L

связываются с CD3.

(3-5) Подтверждение отсутствия одновременного связывания Fab-области с интегрином $\alpha v \beta 3$ и с CD3 методом ECL.

Как очевидно из результатов, представленных в разделах выше, полученные молекулы проявляют связывающую активность с интегрином $\alpha v \beta 3$ и связывающую активность с CD3. Затем каждую Fab-область, полученную, как описано в представленных выше разделах, оценивали для выявления одновременного связывания с CD3 (CD3 ϵ) и с интегрином $\alpha v \beta 3$.

При одновременном связывании молекулы со вставкой пептида RGD (Arg-Gly-Asp) в Fab-области с интегрином $\alpha v \beta 3$ и с CD3, ее связывание с обоими антигенами можно регистрировать методом ECL при добавлении интегрин $\alpha v \beta 3$ и биотинилированного CD3 в раствор антитела. Более подробно, биотинилированный гомодимерный белок CD3 ϵ человека, разбавленный раствором для разбавления(+), при этом концентрацию каждого раствора антитела доводили до 10 мкг/мл или 5 мкг/мл, а также интегрин $\alpha v \beta 3$ (фирмы R&D Systems, Inc.), содержащий сульфo-метку, каждый добавляли в количестве 25 мкл/лунку в 96-луночный микропланшет с круглым дном Nunc-Immuno(TM) MicroWell(TM) (фирмы Nunc) и перемешивали, затем планшет инкубировали при 4°C в течение ночи, при этом получали комплекс антитело-антиген.

Блокирующий(+) раствор добавляли в количестве 150 мкл/лунку в планшет с иммобилизованным стрептавидином (фирмы MSD K.K.) и планшет инкубировали при 4°C в течение ночи. Блокирующий раствор удаляли и затем каждую лунку промывали три раза по 250 мкл раствора TBS(+), содержащего 0,1 г/л хлорида кальция и 0,1 г/л хлорида магния. В планшет добавляли раствор комплекса антитело-антиген в количестве 75 мкл/лунку, и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч, при этом биотин-конъюгированное антитело Ab против IgG человека связывалось со стрептавидином, иммобилизованным на планшете. Раствор комплекса антитело-антиген удаляли, затем каждую лунку промывали три раза раствором TBS(+) и в каждую лунку добавляли буферный раствор READ (фирмы MSD K.K.) в количестве 150 мкл/лунку, затем регистрировали люминесцентный сигнал сульфo-метки с использованием прибора Sector Imager 2400 (фирмы MSD K.K.).

Результаты, показанные на фиг. 13 и 14, свидетельствуют о том, что антитела

EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_2

ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_12

ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, а также EGFR ERY22_Hk/EGFR

ERY22_L/CE115_17 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L,

включающие пептид RGD (Arg-Gly-Asp), встроенный в Fab-область, связываются с интегрином $\alpha v \beta 3$ и с CD3 одновременно, вызывая сильный сигнал, регистрируемый методом анализа ECL. Напротив, антитела

EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_9

ERY22_Hh/CE115_ERY22_L и EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_48

ERY22_Hh/CE115_ERY22_L

продуцируют только слабый сигнал при проведении указанного анализа (фиг. 13). Все антитела

EGFR ERY22_Hk/EGFR

ERY22_L/CE115_4 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, EGFR ERY22_Hk/EGFR

ERY22_L/CE115_10 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, EGFR ERY22_Hk/EGFR

ERY22_L/CE115_47 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, а также EGFR

ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_49 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L

в редких случаях продуцируют сигнал, регистрируемый методом анализа ECL (фиг. 14). Указанные результаты свидетельствуют о том, что указанные антитела не связываются с интегрином $\alpha\beta 3$ в состоянии связывания с CD3.

(3-6) Обсуждение результатов анализа методом ECL, демонстрирующих, что Fab-область не связывается с интегрином $\alpha\beta 3$ и с CD3 одновременно.

Как следует из представленных выше результатов, полученное антитело характеризуется свойствами молекулы Fab с двойной связывающей активностью, связывающейся с каждым из компонентов - с CD3 (CD3 ϵ) и с интегрином, $\alpha\beta 3$ через одну Fab-область, но которая не связывается с CD3 (CD3 ϵ) и с интегрином $\alpha\beta 3$ одновременно. В данном примере пептид RGD, связывающийся со вторым антигеном, интегрином $\alpha\beta 3$, встраивали в вариабельный домен (Fab) антитела, включающего указанный вариабельный домен, связывающийся с первым антигеном CD3, при этом успешно получали молекулу, у которой была обеспечена связывающая активность со вторым антигеном, но которая не связывалась с CD3 и вторым антигеном одновременно. Аналогичными методами пептид, характеризующийся связывающей активностью с белком, как описано в заявке WO 2006/036834, можно встраивать в петлю Fab, при этом получают молекулу Fab с двойной связывающей активностью, которая связывается с произвольным вторым антигеном. Пептид, проявляющий связывающую активность с белком, можно получить при создании библиотеки пептидов по известной методике и выбирая из библиотеки пептид, характеризующийся требуемой активностью (Pasqualini R., Nature, 380 (6572) сс. 364-366 (1996)). Кроме того, библиотеку антигенсвязывающих молекул, полученную при изменении за счет удлинения (расширения) петель в Fab, как описано в примере 5, можно использовать для получения молекулы Fab с двойной связывающей активностью, которая связывается с произвольным вторым антигеном. Вариабельные домены, связывающиеся с первым антигеном, можно получить различными известными методами. Следовательно, можно сделать вывод, что такие библиотеки можно использовать для получения молекул Fab с двойной связывающей активностью, которые связываются с произвольным первым антигеном и произвольным вторым антигеном, но которые не способны связываться с первым антигеном и вторым антигеном одновременно.

Представленные выше результаты свидетельствуют о том, что антитела

EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_4 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, EGFR

ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_10 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, EGFR

ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_47 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, а также

EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_49 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L

связываются с CD3 и с интегрином $\alpha\beta 3$, но не связываются с CD3 и с интегрином $\alpha\beta 3$ одновременно. Указанные результаты свидетельствуют о том, что антитела

EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_4

ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_10

ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_47

ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, а также EGFR ERY22_Hk/EGFR

ERY22_L/CE115_49 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L

представляют собой молекулы Fab с двойной связывающей активностью, а также подтверждают возможность получения таких молекул.

Пример 4.

Получение антител, которые связываются с CD3 и Toll-подобным рецептором 2 (TLR2) человека, но не связываются с указанными антигенами одновременно.

(4-1) Получение антител, которые связываются с CD3 и TLR2 человека, но не связываются с указанными антигенами одновременно.

TLR2, как известно, относится к образ-распознающим рецепторам и в основном экспрессируется на иммунocyтах, таких как макрофаги, дендритные клетки или В-клетки, и является молекулярной мишенью, активирующей иммунocyты. Известно, что TLR2 экспрессируется также на нормальных клетках, которые не относятся к иммунocyтам, таких как эпителиальные клетки или эндотелиальные клетки. Связывание ракового антигена и CD3 одновременно вызывает миграцию (мобилизацию) Т-клеток, экспрессирующих CD3, в область локализации опухоли, при этом Т-клетки повреждают раковые клетки. В этом случае одновременное связывание ракового антигена и TLR2 также может вызывать миграцию иммунocyтов, экспрессирующих TLR2, в область локализации рака, по-видимому, в результате активации им-

муноцитов. Раковые клетки, поврежденные Т-клетками, захватываются мобилизованными в результате действия TLR2 иммунными клетками. Антиген может подвергаться процессингу и присутствовать на HLA, активируя Т-клетки. В этом случае может происходить более сильная активация Т-клеток и индукция, а также развитие приобретенного иммунитета. Однако связывание CD3 и TLR2 одновременно может приводить к повреждению иммунных и нормальных клеток вследствие высокой цитотоксической активности, опосредованной Т-клетками. Соответственно, предполагается, что иммунные и нормальные клетки, экспрессирующие TLR2, можно мобилизовать без повреждения указанных клеток, если можно получить молекулу, которая не связывается с CD3 и TLR2 одновременно. Таким образом, были проведены исследования, цель которых заключалась в разработке молекулы, содержащей Fab-фрагмент, с двойной связывающей активностью, которая связывается с EGFR (через одну варибельную область (Fab)) и связывается с первым антигеном, CD3, и со вторым антигеном, TLR2, через другую варибельную область, но которая не способна связываться с CD3 и TLR2 одновременно.

При условии, что "молекулу, которая связывается с CD3 через одну Fab-область в отсутствие TLR2, и связывается с TLR2 через другую Fab-область в отсутствие CD3," можно представить, как "молекулу, которая не связывается с TLR2 в состоянии связывания с CD3, или не связывается с CD3 в состоянии связывания с TLR2", можно сделать вывод об успешном конструировании молекулы, содержащую Fab-область с двойной связывающей активностью (т.е. молекулу, обладающую свойствами связывания с CD3 и вторым антигеном, но которая не связывается с CD3 и вторым антигеном одновременно).

(4-2) Получение антител, содержащих Fab-область, связывающуюся с TLR2

Известно, что пептид RWGYHLRDRKYKGVSRHKGVP (SEQ ID NO: 36) является пептидом, который характеризуется связывающей активностью с TLR2 человека. Таким образом, для получения каждого гетеродимеризованного антитела, содержащего EGFR-связывающие домены, в одной Fab-области, и CD3-связывающий домен и TLR2-связывающий домен в другой Fab-области, TLR2-связывающий пептид встраивали в петлю тяжелой цепи CD3ε-связывающего антитела CE115 (варибельный домен тяжелой цепи: SEQ ID NO: 13, варибельный домен легкой цепи: SEQ ID NO: 14), как описано в примере сравнения 1. Более подробно получали серии экспрессионных векторов таким образом, чтобы обеспечить встраивание каждого полинуклеотида, кодирующего

EGFR ERY22_Hk (SEQ ID №: 20), EGFR ERY22_L (SEQ ID №: 21) или

CE115_ERY22_L (SEQ ID №: 23),

а также полинуклеотида, кодирующего любой из следующих фрагментов: CE115_DU21 ERY22_Hh (SEQ ID №: 37, где между положениями 52b и 52c согласно нумерации по Кабату встроены TLR2-связывающий пептид), CE115_DU22 ERY22_Hh (SEQ ID №: 38, где между положениями 52b и 52c согласно нумерации по Кабату встроены TLR2-связывающий пептид), CE115_DU26 ERY22_Hh (SEQ ID №: 39, где между положениями 72 и 73 согласно нумерации по Кабату встроены TLR2-связывающий пептид), а также CE115_DU27 ERY22_Hh (SEQ ID №: 40, где между положениями 72 и 73 согласно нумерации по Кабату встроены TLR2-связывающий пептид).

Кроме того, в качестве контролей, как описано в примере сравнения 1, получали антитело (CE115_ERY22_DU42_Hh, SEQ ID №: 41), где TLR2-связывающий пептид присоединен к С-концу CH3 области, и антитело (CE115_ERY22_DU43_Hh, SEQ ID №: 42), где TLR2-связывающий пептид, содержащий остатки Cys на обоих концах, присоединен к С-концу CH3 области. Указанные молекулы, связывающиеся с TLR2 через их CH3 области, предположительно способны связываться с CD3 и TLR2 одновременно. (4-3) Подтверждение связывания антитела с TLR2 Связывающую активность каждой молекулы, содержащих TLR2-связывающий пептид, встроенный в Fab-область, в отношении TLR2 оценивали методом ECL. Более подробно биотин-конъюгированные антитела против IgG Ab человека (фирмы Southern Biotech) разбавляли раствором TBS, содержащим 0,1% BSA (раствор для разбавления (-)), каждый раствор антител, разбавленный до концентрации 5 мкг/мл или 1 мкг/мл, а также TLR2 (фирмы Abnova Corp.) с включенной сульфо-меткой добавляли в лунки 96-луночного планшета Nunc-Immuno MicroWell с круглым дном (фирмы Nunc), каждый в количестве 25 мкл/лунку, и перемешивали, затем планшет инкубировали в течение ночи при 4°C для формирования комплекса антитело-антиген. В планшет с иммобилизованным стрептавидином (фирмы MSD K.K.) добавляли раствор TBS, содержащий 0,5% BSA (блокирующий раствор (-)), в количестве 150 мкл/лунку и планшет инкубировали в течение ночи при 4°C. После удаления блокирующего раствора каждую лунку трижды промывали по 250 мкл раствора TBS(-). В планшет добавляли раствор, содержащий комплекс антитело-антиген, в количестве 75 мкл/лунку, и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч для связывания биотин-конъюгированных антител против IgG Ab человека с иммобилизованным стрептавидином на планшете. После удаления раствора, содержащего комплекс антитело-антиген, каждую лунку трижды промывали раствором TBS(-), и в них добавляли буферный раствор READ (фирмы MSD K.K.) в количестве 150 мкл/лунку, затем регистрировали флуоресцентный сигнал сульфо-метки с использованием прибора Sector Imager 2400 (фирмы MSD K.K.).

Результаты представлены на фиг. 15. Исходное антитело EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L не проявляло связывающую активность с TLR2, тогда как все

EGFR ERY22_Hk/EGFR

ERY22_L/CE115_DU21 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, EGFR ERY22_Hk/EGFR

ERY22_L/CE115_DU22 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, EGFR ERY22_Hk/EGFR

ERY22_L/CE115_DU26 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, а также EGFR

ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_DU27 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L

связывались с TLR2.

(4-4) Подтверждение связывания антител с CD3 (CD3ε).

Затем сохранение связывающей активности каждого типа антител, содержащих TLR2-связывающие Fab-области, полученных, как описано в предыдущем разделе, в отношении CD3 (CD3ε) оценивали методом ECL. Более подробно, биотинилированные антитела против IgG Ab человека (фирмы Southern Biotech), разбавляли раствором TBS, содержащим 0,1% BCA (раствор для разбавления (-)), затем каждый раствор антител, разбавленный до концентрации 5 мкг/мл или 1 мкг/мл, а также белковый гомодимер CD3ε с включенной сульфo-меткой добавляли в лунки 96-луночного планшета Nunc-Immuno MicroWell с круглым дном (фирмы Nunc), каждый в количестве 25 мкл/лунку, и перемешивали, затем планшет инкубировали в течение ночи при 4°C для формирования комплекса антитело-антиген. В планшет с иммобилизованным стрептавидином (фирмы MSD K.K.) добавляли раствор TBS, содержащий 0,5% BCA (блокирующий раствор (-)), в количестве 150 мкл/лунку и планшет инкубировали в течение ночи при 4°C. После удаления блокирующего раствора каждую лунку трижды промывали по 250 мкл раствора TBS(-). В планшет добавляли раствор, содержащий комплекс антитело-антиген, в количестве 75 мкл/лунку, и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч, для связывания биотин-конъюгированных антител против IgG Ab человека с иммобилизованным стрептавидином на планшете. После удаления раствора, содержащего комплекс антитело-антиген, каждую лунку трижды промывали раствором TBS(-), и в них добавляли буферный раствор READ (фирмы MSD K.K.) в количестве 150 мкл/лунку, затем регистрировали флуоресцентный сигнал сульфo-метки с использованием прибора Sector Imager 2400 (фирмы MSD K.K.).

Результаты представлены на фиг. 16. Все антитела: исходные EGFR

ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, а также EGFR

ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_DU21 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, EGFR

ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_DU22 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, EGFR

ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_DU26 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L и EGFR

ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_DU27 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L

связывались с CD3.

(4-5) Подтверждение отсутствия связывания Fab-области с TLR2 и CD3 одновременно методом ECL.

Согласно данным, представленным в предшествующем разделе, полученные молекулы обладают связывающей активностью с TLR2, а также связывающей активностью с CD3. Затем каждую Fab-область, полученную, как описано в предыдущих разделах, оценивали по связыванию с CD3 и TLR2 одновременно.

Если молекула, содержащая TLR2-связывающий пептид, встроенный в Fab-область, связывается с TLR2 и CD3 одновременно, то их связывание с обоими антигенами можно детектировать методом ECL, добавляя TLR2 и биотин-конъюгированный CD3 в раствор антител. Более подробно, биотинилированный белковый гомодимер CD3ε человека, разбавленный раствором для разбавления (-), раствор каждого антитела, разбавленный до концентрации 10 мкл/мл или 5 мкл/мл, а также TLR2 (фирмы R&D Systems, Inc.) с включенной сульфo-меткой добавляли в лунки 96-луночного планшета Nunc-Immuno MicroWell с круглым дном (фирмы Nunc), каждый в количестве 25 мкл/лунку, и перемешивали, затем планшет инкубировали в течение ночи при 4°C для формирования комплекса антитело-антиген. В планшет с иммобилизованным стрептавидином (фирмы MSD K.K.) добавляли блокирующий раствор (-) в количестве 150 мкл/лунку и планшет инкубировали в течение ночи при 4°C.

После удаления блокирующего раствора каждую лунку трижды промывали по 250 мкл раствора TBS(-), который содержал 0,1 г/л хлорида кальция и 0,1 г/л хлорида магния. В планшет добавляли раствор, содержащий комплекс антитело-антиген, в количестве 75 мкл/лунку, и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч, для связывания биотин-конъюгированных антител против IgG Ab человека с иммобилизованным стрептавидином на планшете. После удаления раствора, содержащего комплекс антитело-антиген, каждую лунку трижды промывали раствором TBS(-), и в них добавляли буферный раствор READ (фирмы MSD K.K.) в количестве 150 мкл/лунку, затем регистрировали флуорес-

центный сигнал сульфo-метки с использованием прибора Sector Imager 2400 (фирмы MSD K.K.).

Результаты представлены на фиг. 17. Антитела

EGFR ERY22_Hk/EGFR

ERY22_L/CE115_DU42 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L и EGFR ERY22_Hk/EGFR

ERY22_L/CE115_DU43 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L,

содержащие TLR2-связывающий пептид, встроенный в CH3 область, связывались с TLR2 и CD3 одновременно, о чем свидетельствовал сильный сигнал, детектируемый в ходе проведения анализа ECL. И наоборот для всех

EGFR ERY22_Hk/EGFR

ERY22_L/CE115_DU21 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, EGFR ERY22_Hk/EGFR

ERY22_L/CE115_DU22 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, EGFR ERY22_Hk/EGFR

ERY22_L/CE115_DU26 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L и EGFR ERY22_Hk/EGFR

ERY22_L/CE115_DU27 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L

в редких случаях детектировали сигнал в ходе проведения анализа ECL. Указанные результаты свидетельствуют о том, что эти антитела не связываются с TLR2 в состоянии связывания с CD3.

(4-6) Обсуждение результатов, полученных методом ECL, свидетельствующих о том, что Fab-область не связывается с TLR2 и CD3 одновременно.

Согласно результатам, описанным выше, полученные антитела обладают свойствами молекулы, в которой Fab-область характеризуется двойной связывающей активностью, и связывается с каждым CD3 и TLR2 через одну Fab-область, но не связывается с CD3 и TLR2 одновременно. В указанном примере пептид RWGYHLRDRKYKGVRSKGVPR, связывающийся со вторым антигеном, TLR2, встраивали в вариabельную область (Fab) антитела, которое содержит вариabельную область, обеспечивающую связывание с первым антигеном, CD3, чтобы успешно сконструировать молекулу, которая обладает связывающей активностью со вторым антигеном, но которая не связывается с CD3 и вторым антигеном одновременно. Аналогичным способом пептид со связывающей активностью с белком, как описано в заявке WO2006036834, можно встроить в петлю Fab-области и получить Fab-область с двойной связывающей активностью, которая связывается с произвольным вторым антигеном. Пептид, проявляющий связывающую активность с белком, можно получить, создавая пептидную библиотеку по известной методике, и выбирая из библиотеки пептид, обладающий требуемой активностью (см. статью Pasqualini R., Nature, 380 (6572), 364-366 (1996)). Кроме того библиотеку антигенсвязывающих молекул, полученную при изменении длины петель в составе Fab-области, как описано в примере 5, можно использовать для получения Fab с двойной связывающей активностью, связывающегося с произвольным вторым антигеном. Вариabельные области, связывающиеся с первым антигеном, можно получить различными известными способами. Таким образом, можно сделать вывод, что указанные библиотеки можно использовать для получения Fab-области с двойной связывающей активностью, которая связывается с произвольным первым антигеном и произвольным вторым антигеном, но которая не связывается с первым антигеном и вторым антигеном одновременно.

Результаты, описанные выше, свидетельствуют о том, что антитела EGFR

ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_DU21 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, EGFR

ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_DU22 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, EGFR

ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_DU26 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L и EGFR

ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_DU27 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L

связываются с CD3 и TLR2, но не связываются с CD3 и TLR2 одновременно. Указанные результаты указывают на то, что

EGFR ERY22_Hk/EGFR

ERY22_L/CE115_DU21 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, EGFR ERY22_Hk/EGFR

ERY22_L/CE115_DU22 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L, EGFR ERY22_Hk/EGFR

ERY22_L/CE115_DU26 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L и EGFR ERY22_Hk/EGFR

ERY22_L/CE115_DU27 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L

представляют собой молекулы, в которых Fab-область обладает двойной связывающей активностью, а также подтверждают возможность получения таких молекул.

Пример 5.

Изменение антител для получения антител, связывающихся с CD3 и вторым антигеном.

(5-1) Исследование сайта встраивания и длины пептида, способного связываться со вторым антигеном.

Были проведены исследования, направленные на получение молекулы, в которой Fab-область ха-

рактеризуется двойной связывающей активностью с раковым антигеном через одну вариабельную область (Fab), а также связываться с первым антигеном, CD3, и вторым антигеном через другую вариабельную область, но которая не способна связываться с CD3 и вторым антигеном одновременно. Пептид GGS встраивали в тяжелую цепь петли CD3ε-связывающего антитела CE115 для получения каждого гетеродимеризованного антитела, содержащего EGFR-связывающие домены в одной Fab-области и CD3-связывающие домены в другой Fab-области, как описано в примере сравнения 1.

Более подробно, были получены антитела EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_CE31 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L ((SEQ ID №: 20/21/43/23) со вставкой GGS между K52B и S52c в CDR2, антитела EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_CE32 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L ((SEQ ID №: 20/21/44/23) со вставкой пептида GGSGGS (SEQ ID NO: 90) в указанное положение, а также антитела EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_CE33 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L ((SEQ ID №: 20/21/45/23) со вставкой пептида GGSGGSGGS (SEQ ID №: 91) в указанное положение. Аналогичным образом были получены антитела EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_CE34 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L ((SEQ ID №: 20/21/46/23) со вставкой GGS между D72 и D73 (петля) в FR3, антитела EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_CE35 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L ((SEQ ID №: 20/21/47/23) со вставкой пептида GGSGGS (SEQ ID №: 90) в указанное положение, а также антитела EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_CE36 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L ((SEQ ID №: 20/21/48/23) со вставкой пептида GGSGGSGGS (SEQ ID №: 91) в указанное положение. Дополнительно были получены антитела EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_CE37 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L ((SEQ ID №: 20/21/49/23) со вставкой GGS между A99 и Y100 в CDR3, антитела EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_CE38 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L ((SEQ ID №: 20/21/50/23) со вставкой пептида GGSGGS в указанное положение, а также антитела EGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_CE39 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L ((SEQ ID №: 20/21/51/23) со вставкой пептида GGSGGSGGS в указанное положение.

(5-2) Подтверждение связывания антител CE115 со встроенным пептидом GGS с CD3ε.

Связывающую активность каждого полученного антитела с CD3ε подтверждали с использованием прибора Biacore T100. Биотин-конъюгированный пептидный эпитоп CD3ε иммобилизовали на чип CM5 через стрептавидин, обрабатывали полученными антителами, которые использовали в качестве анализируемого вещества, и определяли аффинность связывания.

Результаты представлены в табл. 2. Аффинность связывания CE35, CE36, CE37, CE38 и CE39 с CD3ε эквивалентна исходному антителу CE115. Указанные данные свидетельствуют о том, что пептид, связывающийся со вторым антигеном, можно встроить в петли указанных антител. Аффинность связывания не снижалась для CE36 или CE39, содержащих вставку GGSGGSGGS. Указанные данные свидетельствуют о том, что вставка пептида, содержащего по крайней мере 9 аминокислотных остатков, в указанные сайты не влияет на связывающую активность с CD3ε.

Таблица 2

Образец	ka	kd	KD	Положение вставки	Линкер
CE115_M	1. 5E+05	9. 8E-03	6. 7E-08		
CE31	2. 3E+05	3. 5E-02	1. 5E-07	K52b-S52c	GS3
CE32	8. 5E+04	1. 8E-02	2. 1E-07	K52b-S52c	GS6
CE33	4. 9E+05	1. 1E-01	2. 3E-07	K52b-S52c	GS9
CE34	1. 1E+05	1. 3E-02	1. 2E-07	D72-D73	GS3
CE35	1. 3E+05	1. 1E-02	8. 7E-08	D72-D73	GS6
CE36	1. 2E+05	1. 2E-02	9. 9E-08	D72-D73	GS9
CE37	2. 2E+05	2. 0E-02	9. 4E-08	A99-Y100	GS3
CE38	2. 0E+05	1. 7E-02	8. 7E-08	A99-Y100	GS6
CE39	1. 6E+05	1. 4E-02	9. 1E-08	A99-Y100	GS9

Указанные результаты свидетельствуют о том, что антитела, способные связываться с CD3 и вторым антигеном, но которые не связываются с указанными антигенами одновременно, можно получить в результате формирования антитела, связывающегося со вторым антигеном, используя такое антитело CE115, которое содержит вставку указанных пептидов.

В связи с этим библиотеку можно получить при внесении изменений в случайную аминокислотную последовательность пептида, используемого для вставки или замены, по известной методике, например,

такой как сайт-направленный мутагенез (см. статью Kunkel и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82, 488-492 (1985)) или ПЦР с перекрывающимися праймерами, и сравнение связывающей активности и т.п., каждой измененной формы по известной методике, для выявления сайта вставки или замены, которые позволяют проявлять требуемую активность даже после изменения аминокислотной последовательности, а также для выявления типа и длины аминокислотной последовательности указанного сайта.

Пример 6.

Получение библиотеки для получения антитела, связывающегося с CD3 и вторым антигеном.

(6-1) Библиотека антител для получения антитела, связывающегося с CD3 и вторым антигеном (библиотека Fab с двойной связывающей активностью).

В случае выбора CD3 (CD3ε) в качестве первого антигена, примеры метода получения антитела, связывающегося с CD3 (CD3ε) и с произвольным вторым антигеном, включают следующие 6 способов:

1) способ, который включает вставку пептида или полипептида, связывающегося со вторым антигеном, в Fab-домен, обеспечивающий связывание с первым антигеном (указанный метод предусматривает вставку пептида, как описано в примере 3 или 4, а также метод вставки G-CSF, как описано в работе *Angew Chem. Int. Ed. Engl.*, 52 (32), 8295-8298 (2013, 5 Aug.)), где связывающий пептид или полипептид можно получить из пептид- или полипептид-отображающей библиотеки или можно использовать полно-размерный природный белок или его часть;

2) способ, который включает получение библиотеки антител таким образом, что различные аминокислоты находятся в таких положениях, которые позволяют изменять длину (увеличивать) петлю в составе Fab-области, как описано в примере 5, и получать Fab-области со связывающей активностью с произвольным вторым антигеном из библиотеки антител, используя связывающую активность с антигеном в качестве индекса;

3) способ, который включает идентификацию аминокислот, которые поддерживают связывающую активность с CD3 с использованием антитела, полученного сайт-направленным мутагенезом антител, для которых предварительно известно, что их Fab-домен связывается с CD3, и получение Fab-домена со связывающей активностью с произвольным вторым антигеном из библиотеки антител, в которой отображены идентифицированные аминокислоты, используя связывающую активность с антигеном в качестве индекса;

4) способ 3, который дополнительно включает получение библиотеки антител, в которых отображены положения различных аминокислот в положениях, позволяющих изменять длину (увеличивать) петлю Fab-доменов, и получение Fab-доменов со связывающей активностью с произвольным вторым антигеном из библиотеки антител, используя связывающую активность с антигеном в качестве индекса;

5) способы 1, 2, 3 или 4, которые дополнительно включают изменение антител таким образом, что отображаются гликозилированные последовательности (например, NxS и NxT, где x обозначает аминокислоту, отличающуюся от P), к которым можно встроить углеводные цепи, которые распознаются рецепторами, распознающими углеводные цепи (например, встраивают углеводные цепи с высоким содержанием маннозы, которые распознаются рецепторами к соединениям с высоким содержанием маннозы, причем известно, что углеводные цепи с высоким содержанием маннозы получают за счет добавления кифунизина во время экспрессии антител (см. *mAbs.*, 4 (4), 475-487 (2012 Jul.-Aug.)); и

6) способ 1, 2, 3 или 4, который дополнительно включает встраивание доменов (полипептиды, углеводные цепи и нуклеиновые кислоты, типированные с использованием агонистов TLR), каждый связывающийся со вторым антигеном через ковалентную связь за счет вставки Cys, Lys или "неприродной" аминокислоты в петли или сайты, как было найдено, подлежащие изменению различных аминокислот или подлежащие замене указанных сайтов на Cys, Lys или "неприродную" аминокислоту (указанный метод был типирован с использованием конъюгатов с лекарственными средствами на основе антител и является методом конъюгации Cys, Lys или "неприродной" аминокислоты через ковалентную связь (см. *mAbs*, 6: 1, 34-45 (2014 Jan.-Fev.), заявку WO 2009/134891 A2 и статью *Bioconjug Chem.*, 25 (2), 351-361 (2014 19 Fev.)).

Fab-фрагмент, характеризующийся двойной связывающей активностью, который связывается с первым антигеном и вторым антигеном, но не связывается с указанными антигенами одновременно, получали с использованием любого из указанных способов, и эти Fab-домены могут быть объединены с доменами (другая вариабельная область, как описано в примере 1), связывающимися с произвольным третьим антигеном, по известной методике, например, общие L цепи, CrossMab или обмен Fab-областей.

(6-2) Получение антитела с одним измененным аминокислотным остатком в CD3 (CD3ε)-связывающем антителе с использованием сайт-направленного мутагенеза.

VH-домен CE115HA000 (SEQ ID NO: 52) и VL-домен GLS3000 (SEQ ID NO: 53) выбирали в качестве матричных последовательностей для CD3 (CD3ε)-связывающем антителе. В каждом домене осуществляли изменение аминокислотного остатка в сайте, который предположительно участвует в связывании антигена, как описано в примере сравнения 1. Кроме того, pE22Nh (последовательность получена из природного IgG1 CH1 и следующих последовательностей в результате замен L234A, L235A, N297A, D356C, T366S, L368A и Y407V, делеции С-концевой последовательности GK, и вставки последователь-

ности DYKDDDDK (SEQ ID NO: 89), SEQ ID NO: 54) использовали в качестве Н-цепи консервативного домена, а каппа-цепь (SEQ ID NO: 55) использовали в качестве L-цепи консервативного домена. Сайты для изменений представлены в табл. 3. Для оценки CD3 (CD3ε)-связывающей активности, каждое анти-тело с изменением одного аминокислотного остатка получали в виде антител с одним плечом (природные антитела IgG, содержащие только один из Fab-доменов). Более подробно, в случае изменения Н-цепи измененную Н-цепь присоединяли к консервативному домену pE22Hh, а Kn010G3 (аминокислотная последовательность природных IgG1 от положения 216 до С-конца с заменами C220S, Y349C, T366W и H435R, SEQ ID NO: 56) использовали в качестве Н-цепей, и GLS3000, присоединенную к 3'-концу каппа-цепи, использовали в качестве L-цепи. В случае изменения L-цепи измененную L-цепь, присоединенную к 3'-концу каппа-цепи, использовали в качестве L-цепи, а CE115HA000, присоединенное к 3'-концу pE22Hh, а также Kn010G3 использовали в качестве Н-цепей. Указанные последовательности экспрессировали и очищали в клетках FreeStyle 293 (которые применялись в способе, описанном в примере сравнения 1).

Таблица 3

Сайт замены в Н-цепи

Сегменты замещения в H1-цепи																																			
Домен							FR1						CDR1						FR2	CDR2															
Нумерация по Кабату							11	16	19	28	29	30	31	32	33	35	43	50	51	52	52a	52b	52c	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	64	65
Аминокислота до замены							V	R	R	T	F	S	N	A	W	H	K	Q	I	K	A	K	S	N	N	Y	A	T	Y	Y	A	E	S	K	G

Домен	FR3								CDR3										FR4	
Нумерация по Кабату	72	73	74	75	76	77	78	82a	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	101	102	105
Аминокислота до замены	D	D	S	K	N	S	L	N	V	H	Y	G	A	Y	Y	G	V	D	A	Q

Сайт замены в L-цепи

Домен	CDR1																FR2
Нумерация по Кабату	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	28	29	30	31	32	33	34	45
Аминокислота до замены	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	R	N	T	Y	L	H	Q

Домен	CDR2							FR3		CDR3									FR4
Нумерация по Кабату	50	51	52	53	54	55	56	74	77	89	90	91	92	93	94	95	96	97	107
Аминокислота до замены	K	V	S	N	R	F	S	K	R	G	Q	G	T	Q	V	P	Y	T	K

(6-3) Оценка связывания антител с одним измененным аминокислотным остатком с CD3.

Каждую форму антитела с одним измененным аминокислотным остатком, полученную, экспрессированную и очищенную, как описано в разделе (6-2), исследовали с использованием прибора Biacore T200 (фирмы GE Healthcare Japan Corp.). Соответствующее количество белкового гомодимера CD3ε иммобилизовали на сенсорном чипе CM4 (фирмы GE Healthcare Japan Corp.) методом аминоконденсации. Затем иммобилизованные гомодимеры обрабатывали антителами, используемыми в качестве анализируемого вещества, в требуемой концентрации для оценки их взаимодействия с белковым гомодимером CD3ε на поверхности сенсорного чипа. Затем сенсорный чип регенерировали, прокачивая через него раствор глицина-HCl (10 ммоль/л, pH 1,5). Анализ проводили при 25°C, в качестве рабочего буферного раствора использовали буферный раствор HBS-EP+ (фирмы GE Healthcare Japan Corp.). В ходе анализа получали сенсограммы, результаты анализов использовали для расчета константы диссоциации ($K_D(M)$), используя модель кинетики одного цикла взаимодействия для определенного количества связанного вещества (связывание 1:1, RI=0). Каждый параметр рассчитывали, используя программное обеспечение Biacore T200 Evaluation Software (фирмы GE Healthcare Japan Corp.).

(6-3-1) Изменение Н-цепи.

В табл. 4 представлены результаты соотношения количества каждой связанной измененной формы Н-цепи и определенного количества связанного соответствующего неизмененного антитела CE115HA000. Более подробно, если количество связавшегося антитела, содержащего CE115HA000, обозначает X, а количество связавшейся формы, в которой в составе Н-цепи изменен один аминокислотный остаток обозначает Y, то значение Z (соотношение количеств связанных компонентов) можно рассчитать по уравнению $Z=Y/X$. Как показано на фиг. 8, на сенсограмме наблюдается связывание очень малого количества анализируемого вещества при Z менее 0,8, что указывает на невозможность правильного расчета константы диссоциации $K_D(M)$. В табл. 5 представлено соотношение константы диссоциации $K_D(M)$ каждой формы с измененной Н-цепью и для CE115HA000 (= значение K_D CE115HA000/значение K_D измененной формы).

Если значение Z, представленное в табл. 4, равно 0,8 или более, то считается, что измененная форма сохраняет связывающую активность на уровне соответствующего неизмененного антитела CE115HA000. Таким образом, библиотеку антител с таким отображением указанных аминокислот можно рассматривать в качестве библиотеки двойных Fab.

Таблица 4

Домен	FR1						CDR1				FR2	CDR2																	
Нумерация по Кабату	11	16	19	28	29	30	31	32	33	35	43	50	51	52	52a	52b	52c	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	64	65
Аминокислота до замены	V	R	R	T	F	S	N	A	W	H	K	Q	I	K	A	K	S	N	N	Y	A	T	Y	Y	A	E	S	K	G
(Дикий тип)																													
A							0.5		0.1	0.17		0.24				0.67	0.96	0.7	0.85			0.98	0.22	0.85		1.09		0.82	
D				0.56		0.86	0.37		0.1	0.2		0.27	0.29	0.25	1.34	0.27	0.6	0.39	0.62	0.45	0.51		0.11	0.7	0.99	0.91	0.92	0.72	0.76
E		0.88									0.9	0.26	0.55	0.26	0.57									0.66	0.94		0.92	0.74	0.78
F							0.62		0.65	0.21				0.17			1.13		1.12										
G						1.01	0.39			0.22					0.81		0.97	0.5	0.98	0.55	0.61								
H							0.68		0.13					0.22			0.76												
I							0.81			0.12		0.4		0.33			0.68					0.61							
K							1.01			0.15		0.33			0.33			1.19	0.78	1.2		1.35	1.32	0.3			1.19		
L		1							0.1	0.11		0.23				0.61	0.98		0.94		0.8		0.27						
M										0.29												0.87	0.97	0.33					
N										0.35		0.17			0.34		0.27												
P																0.15													
Q							0.45			0.13	0.99					0.6	1.04	1.1	0.84		0.76		0.19			1.07	1		
R		0.9					1.14			0.14				0.91		1.11										1.07		0.89	
S				0.91			0.81			0.23		0.24		0.28	1.05	0.68		0.83	0.84	0.26			0.18	0.94				0.84	
T			0.8				0.26																						
V					0.36					0.22					0.52		0.93												
W							0.63			0.22				0.22			0.88												
Y							0.64	0.33	0.66	0.16		0.25		0.18	0.31	0.74	1.11	0.63	1.09		0.66								

Домен	FR3								CDR3											FR4
Нумерация по Кабату	72	73	74	75	76	77	78	82a	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	101	102	105
Аминокислота до замены	D	D	S	K	N	S	L	N	V	H	Y	G	A	Y	Y	G	V	D	A	Q
(Дикий тип)																				
A	1.41	0.83	1.05						0.11	0.39	0.16	1.1		0.9	0.62			1.25		
D								0.73	0.24	0.09	0.24	0.26	0.28	0.52	0.31	0.27	0.44			
E	1.05	0.73							0.24								0.26	0.46		0.94
F													1.43		0.87	0.3		0.75		
G			1.07						0.19	0.43	0.18			1.07	1.23			1.38		
H												1.58						1.21		
I							1.34											1.18	1.48	
K		0.87							0.64	0.35		2.83	1.48	1.07	0.9			0.63		
L										0.14			1.13	0.7	0.48	0.27		0.62		
M																		1.2		
N			0.94															2.02		
P				0.91						0.12	0.11	1.02		0.48			0.2	0.2	0.14	
Q										0.42		1.22	0.91	0.8	0.56			2.35		
R		1.04		1.01						0.46	0.27	2.96						0.24		
S					0.92				0.22	0.44	0.18	1.01	0.82	0.81	0.64	0.52		1.16		
T		0.63		0.84		0.9						1.05	0.84					0.79		
V	1.43													0.6				1.33	1.43	
W														1.03						
Y									0.17		2.22	1.59				0.23		0.49	0.91	

Таблица 5

Домен	FR1						CDR1				FR2	CDR2																		
Нумерация по Кабату	11	16	19	28	29	30	31	32	33	35	43	50	51	52	52a	52b	52c	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	64	65	
Аминокислота до замены	V	R	R	T	F	S	N	A	W	H	K	Q	I	K	A	K	S	N	N	Y	A	T	Y	Y	A	E	S	K	G	
(Дикий тип)																														
A							0.98		29.99	25.04		22.63					0.58	0.67	0.55	0.58		0.87	1.06	0.74		0.94		0.81		
D				0.93		0.79	1.14		1693.03	68.99		75.37		6.37	166.47	1.35	0.56	0.55	0.55	0.59	0.89	0.71		4.81	0.86	0.94	0.9	0.87	0.76	0.61
E		0.74								70.35	0.88	16738.09	0.84		19.38	0.89									0.81	0.88		0.82	0.84	0.61
F							1.24		0.86	63.69					4.04		0.93		0.97											
G						0.93	1.37			45.77						0.61	0.81	0.95	0.84	0.99	0.69									
H							0.96		4.96							2.65	0.55													
I							0.62			7.23			1.21			3.54		0.57				0.81								
K							0.97			14.45			0.71					0.68	0.79	0.82	1.32	1.22	0.66				0.99			
L	0.83						585/3.23			4.8			1.41				0.61	0.94	0.91	0.77		1.21								
M										3.96																				
N										2.86			1.48		3.29		0.43					0.84	0.9	1.86						
P																5											0.82	0.77		
Q		0.87					0.94			4.8	0.89						0.62	0.97	1.05	0.8	0.74		1.24		0.85		0.87			
R							0.98			15429.77					0.8		0.91													
S				0.79			0.67			2.93		47.38			92.1	0.82	0.58	0.59	0.57	5.65			1.22	0.79			0.85			
T			0.81							4.4																				
V				2.94						23.08							0.95	0.82												
W							1.07			50.42						2.69		0.69												
Y							1.1	2.11	0.69	119458.13		49.09		0.47	7.71	0.61	0.87	0.94	1.03		0.63									

Домен	FR3										CDR3										FR4	
Нумерация по Кабату	72	73	74	75	76	77	78	82a	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	101	102	105		
Аминокислота до замены	D	D	S	K	N	S	L	N	V	H	Y	G	A	Y	Y	G	V	D	A	Q		
(Дикий тип)																						
A	1.19	0.73	0.77						3.15	1	41309	0.98						0.92	0.86	0.85		
D									0.55	108.01	7.27	64.7	2.36	1.03				0.63	1.2	6.25	1.84	
E	0.73	0.56							80.46									7.29	1.31		0.89	
F													1.15					0.98	4.37	0.73		
G			0.78						76296.33	0.8	47213							0.97	1.01	3.18		
H							1.08					1.14								0.91		
I																				1.73	1.29	
K		0.74							1.15	1.56		4.85	1.4					0.93	0.79	4.37		
L									3.14				1					0.67	0.57	5.84	0.71	
M																				1.94		
N		0.7																		2.28		
P			0.7							87044.4	12429	0.88						1.3		0.97	43.42	3.61
Q										1.36		1.04	0.85					0.77	0.61	3.55		
R		0.79		0.88						1.59	23180	4.69								5.66		
S					0.84				4.61	1.15	1178	0.58	0.76				0.7	0.56	1.25	0.91		
T		0.78		0.75		0.83						0.93	0.93							0.62		
V	1.17																	0.92		1.18	1.27	
W																		0.96				
Y										6.67		2.75	1.25							51.41	0.62	1

диссоциации K_D (М). В табл. 7 представлено соотношение константы диссоциации K_D (М) каждой формы с измененной L-цепью и GLS3000.

Если значение Z, представленное в табл. 4, равно 0,8 или более, то считается, что измененная форма сохраняет связывающую активность на уровне соответствующего неизмененного антитела GLS3000. Таким образом, библиотеку антител с таким отображением указанных аминокислот можно рассматривать в качестве библиотеки двойных Fab.

Таблица 6

Домен	CDR1																	FR2
Нумерация по Кабату	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	28	29	30	31	32	33	34	45	
Аминокислота до замены	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	R	N	T	Y	L	H	Q	
A	0.86	0.92						0.48	1.03	0.25	0.63	0.5		0.24	0.85	1.06		
D	0.75	0.18	0.86	0.85	0.79	0.17	0.32	0.22	0.89	0.19	0.41	0.34	0.23	0.23	0.17	0.22	0.77	
E	0.83	0.21	0.74	0.88	0.81	0.17	0.61	0.23	0.76	0.4		0.44	0.49		0.72	0.23	0.75	
F						0.42		0.63	1.32	0.46		1.1		0.29	0.78	0.27		
G	0.89				1.03			0.3	1.04	0.46	0.67	0.47				1.02		
H									1.23	0.42		0.98						
I		0.53			1	1.19	0.96	0.26	1.07	0.44	0.37	0.61	0.97		0.83	0.65		
K								0.29	1.59	0.44		1.65	1.04			2.17		
L		0.24		0.92			0.84	0.3	1.17	0.39	0.56	0.7				0.59		
M		0.31				0.71		0.3	1.23	0.39		0.8			0.93	0.35		
N					1.1			0.3	1.16				0.32			0.65		
P	0.7	1.01	0.78	0.29	0.99	0.91	0.3	0.24	1.26	0.36	0.31	0.31	0.31	0.24	0.3	0.34		
Q	0.9							0.25	1.1	0.37		0.87				0.25	0.86	
R				1.19				0.31	1.58			1.86				0.2		
S	0.89					0.71	0.51	0.32		0.32	0.68	0.29				0.78		
T	0.88	0.83						0.29	0.97	0.45	0.63	0.29				0.89		
V		0.73				1.12		0.3	1.08	0.36	0.34	0.61			1.05	0.85		
W						0.26		0.39	1.55	0.41		0.99				0.24		
Y	0.87				1.1	0.25	0.77	0.64	1.2	0.26	0.69	1.04				0.59		

Домен	CDR2							FR3		CDR3										FR4
Нумерация по Кабату	50	51	52	53	54	55	56	74	77	89	90	91	92	93	94	95	96	97	107	
Аминокислота до замены	K	V	S	N	R	F	S	K	R	G	Q	G	T	Q	V	P	Y	T	K	
A	0.23		0.93	0.61	0.69	1.13	1.16			1.13	0.5	0.27	0.63	0.85	1.05	0.63				
D	0.22	0.33	0.63	0.34	0.36	0.65	0.77			0.33	0.19	0.16	0.18	0.72	0.89	0.24	0.17			
E	0.24	0.64		0.54	0.58	0.72	0.71			0.26	0.86	0.16	0.17	0.75	0.5	0.39	0.17		0.94	
F				0.69			1.32			1.09					0.71		1.17			
G	0.16	0.84		0.76	0.67	1.31	0.92								0.48	0.37				
H				1.18		0.94	1.05			0.7					0.78		0.23			
I		0.81		0.5		0.82	0.99			1.07			0.34		0.66					
K				1.08		1.33	1.46			0.4					0.57					
L	0.24			0.56	0.76	1.02				0.94			0.42		0.44	0.24	0.32			
M				0.62	0.8	1.05				0.52					0.44					
N						0.98	0.92			0.8					1.05					
P	0.3	0.32	0.33	0.81	0.84	1.16	0.95			0.35	0.27	0.27	0.26	0.25	1.26			0.31		
Q	0.18		1.05	0.77	0.68	0.91	1.04			0.38					0.76					
R	0.5			1.58		1.31	1.36			0.19				1.13	0.66					
S	0.23			0.69	0.79	0.69		0.92		0.73	0.26	0.96	0.96	0.93	0.43					
T	0.19			0.56	0.65	0.41	0.97	0.84		1.03		0.26			0.93					
V				0.56		0.71	0.95			1.63										
W				0.81	0.78	0.69	1.38			0.5					0.58					
Y	0.24		1.12	0.67		0.92	1.46			1.19	0.17	0.17	0.33	0.87	0.63					

Таблица 7

Домен	CDR1																	FR2
Нумерация по Кабату	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	28	29	30	31	32	33	34	45	
Аминокислота до замены	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	R	N	T	Y	L	H	Q	
Повышенная аффинность	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	28	29	30	31	32	33	34	45	
A	1	0.73						2.57	1.01	4.18	1.15	1.16		66.77	0.82	1.18		
D	0.83	8.86	1.06	0.89	0.94	25.07	3.21	13841	1.23	4455.11	1.58	3.82	30.86	25.92	37.53	2100	0.86	
E	0.89	6.54	0.9	0.99	0.94	26.75	1.1	42.28	1.04	5.47		2.83	1.59		0.83	8.03	1.01	
F						2.67		2.05	1.16	2.59		f		4.51	0.65	3.5		
G	0.92				0.8			3.51	1.03	2.41	0.62	2.1				1.08		
H									1.09	3		1.08						
I		0.67			0.87	1.17	1.03	7.77	1.05	2.81	1.6	1.24	1.1		0.86	0.89		
K								3.8	1.32	2.34		1.35	0.88			4.1		
L		4.93		0.86			0.81	3.37	1.06	3.34	0.9	1.19				1.03		
M		1.6				1.31		3.43	1.11	3.29		1.2			0.9	3.16		
N					0.98			3.43	1.01				4.46			2.84		
P	0.34	0.79	0.67	2.16	1.01	0.96	3.71	9.21	1.06	4.18	14.01	12.14	10.82	61.98	32.66	1.22		
Q	0.87							7.48	1.08	3.48		1				4.6	0.98	
R				1.06				2.35	1.35			1.73				85764		
S	0.97					0.9	3.04	3.05		4.3	1.05	10.64				1.24		
T	1.03	0.75						12973	0.98	2.67	1.02	12.72				1.1		
V		0.74				1.11		353.86	0.95	3.73	2.25	2.62			1.26	1.04		
W						23.6		1.86	1.32	3.17		0.97				8.45		
Y	0.94				0.93	22.2	1.25	1.98	1.1	3.89	1.08	1.03				2.44		

Домен	CDR2								FR3		CDR3								FR4
Нумерация по Кабату	50	51	52	53	54	55	56	74	77	89	90	91	92	93	94	95	96	97	107
Аминокислота до замены	K	V	S	N	R	F	S	K	R	G	Q	G	T	Q	V	P	Y	T	K
Повышенная аффинность	50	51	52	53	54	55	56	74	77	89	90	91	92	93	94	95	96	97	107
A	59.5		0.9	0.82	0.85	1.16	1.18			1.1	0.89	28.14	1.35	0.65	1.05	0.87			
D	114	1.5	0.94	2.8	1.8	1.02	1.11			1.96	11.13	44.76	11.19	0.72	1.05	2.37	40.88		
E	57.2	0.88		2.47	0.84	0.92	0.91			34.63	0.91	48.54	19.56	1.05	1.18	1.01	46.81	0.95	
F				0.96			1.12			3.34					1.75		0.66		
G	42.4	0.83		1.33	0.86	1.15	0.99								2.59	1.94			
H				1.31		1.02	0.96			1.44					1.16		80.34		
I		0.69		2.69		1.28	1.01			1.11			1.91		1.46				
K				1.05		1.22	1.21			1.8					0.91				
L	36.4			1.62		1.43	1.03			2.38			1.61		3.06	11.66	1.84		
M				1.21		1.29	0.93			1.96					2.74				
N						0.91	0.9			1.2					0.96				
P	27.7	6	7.38	0.98	1.05	1.15	0.98			1.8	15.86	23.05	26.71	39.54	1.1			3.35	
Q	8.13		1.01	1.28	1.04	1.09	0.97			2.11					1.1				
R	1.83			1.56		1.27	1.15			4127.4				0.79	1.11				
S	45.3			0.88	0.78	1.15		0.94			0.96	72076	0.81	0.75	0.81	1.19			
T	25.1			2.68	0.89	2.42	1.01	0.85		1.1		39.87			1.06				
V				2.14		1.12	0.94			1.4									
W				1.01	0.65	1.72	1.12			2.2					1.81				
Y	195		1.02	0.99		1.13	1.1			1.12	36.29	33.84	2.55	0.76	2.45				

(6-4) Оценка связывания антитела с одним измененным аминокислотным остатком с ВКМ (внеклеточный матрикс).

ВКМ (внеклеточный матрикс) представляет собой внеклеточный компонент и присутствует на различных сайтах в условиях *in vivo*. Следовательно, антитела с высокой связывающей активностью с ВКМ, как известно, характеризуются слабой кинетикой в крови (короткий период полураспада) (WO2012093704 A1).

Таким образом, аминокислоты, которые не усиливают связывание с ВКМ, предпочтительно выбирают в качестве аминокислот, которые отображаются в библиотеке антител.

Каждое антитело получали в форме с измененной Н-цепью или L-цепью по методике, описанной в разделе (6-2). Затем оценивали их связывающую активность в отношении ВКМ по методике, описанной в примере сравнения 2. Значение связывающей активности в отношении ВКМ (реакция ECL) каждой измененной формы делили на значение связывающей активности в отношении ВКМ антитела MRA (Н-цепь: SEQ ID NO: 57, L-цепь: SEQ ID NO: 58), полученное в том же планшете или в тот же день, полученные значения представлены в табл. 8 (Н-цепь) и 9 (L-цепь). Согласно данным, представленным в табл. 8 и 9, некоторые изменения приводили к усилению связывания с ВКМ.

Исходя из значений, представленных в табл. 8 (Н-цепь) и 9 (L-цепь), эффективное значение вплоть до 10 кратного включали в библиотеку двойных Fab, с учетом эффекта усиления связывания с ВКМ в результате множества изменений.

Таблица 8

Домен	FR1					CDR1					FR2					CDR2														
Нумерация по Кабату	11	16	19	28	29	30	31	32	33	36	43	50	51	52	52a	52b	52c	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	64	65	
Аминокислота до замены	V	R	R	T	F	S	N	A	W	H	K	Q	I	K	A	K	S	N	N	Y	A	T	Y	Y	A	E	S	K	G	
A																	2.95		4.5			4.67			5.82	4.02	3.23	4.4	2.08	
D				0.91		1.11				1.1		1.06	4.75	1.07	1.66										2.77	4.02	3.23	4.4	1.23	0.91
E		1.14								1.04		1.08	4.55	1.18	1.19															
F										2.62							10.46				15.16									
G						3.32				8.82					4.72		5.41				4.43									
H							2.51																							
I							41.37																							
K																	58.7		85.86		32.07	16.29					4.07			
L	3.41																4.07		6.02		3.56									
M										4.69																				
N										3.06												4.07	4.49							
P										51.18																	9.99	3.83		
Q											2																9.29	1.91		
R										71.66					11.19	7.28		4.99	3.18	3.23										
S					2.32		0.95								3.34				3.71	4.33					6.58			1.89		
T			1.17							3.49																				
V				17.13						7.32								3.23												
W										8.6																				
Y																	19.56		17.47											

Домен	FR3					CDR3										FR4				
Нумерация по Кабату	72	73	74	75	76	77	78	82a	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	101	102	105
Аминокислота до замены	D	D	S	K	N	S	L	N	V	H	Y	G	A	Y	Y	G	V	D	A	Q
A	22.3												2.7		1.46			66.85		
D									1.12	0.96		0.65					0.98	1.18		
E									0.76								1.2	1.3		1.33
F													16.97		2.81					
G														1	2.61			56.66		
H												2.12						16.16		
I																		63.16	6.63	
K												32.29	57.13	8.2	10.3			38.94		
L												6.94						123.87		
M																		90.66		
N																				
P													3							
Q													2.99	2.12	0.94			130.29		
R												48.83								
S			2.92									2.41	3.34	1				58.7		
T				1.93								1.6	2.54							
V				1.2		2.31												48.47	6.29	
W																				
Y													27.01	30.37					2.82	

Таблица 9

Домен	CDR1															FR2	
Нумерация по Кабату	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	28	29	30	31	32	33	34	45
Аминокислота до замены	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	R	N	T	Y	L	H	Q
A	2.62	2.28							3.25		0.87			2.21	5.92	2.61	
D	1.86	1.01	1.31	1.3	1.03	1.16	0.76				0.84		0.66	0.98	0.6		0.99
E	2.02	1.16	1.22	1.24	1.12	1.04	0.72		1.19				0.79		1.45		1.16
F									16.43				5.79				
G	1.53					10.04			5.42							3.9	
H									13.64				8.6				
I						11.11	2.68	56.75	4.28				2.87		4.74		
K									34.74				31.93	59.62		84.66	
L				11.8			3.16		5.89								
M									6.53				3.32		19.8		
N						48.45			4.63								
P			2.83			2.3	2.7		7.26								
Q	1.26								2.58				3.45				2.31
R						18.19			74.03				69.62				
S	2.65						3.3										2.17
T	1.8	2.7							2.32		0.63						4.51
V							2.82		2.31						2.68	6.43	
W									46.73				11.21				
Y	1.89					42.7			30.66				3.08				

Домен	CDR2							FR3		CDR3							FR4		
Нумерация по Кабату	50	51	52	53	54	55	56	74	77	89	90	91	92	93	94	95	96	97	107
Аминокислота до замены	K	V	S	N	R	F	S	K	R	G	Q	G	T	Q	V	P	Y	T	K
A	0.83		3.65		1.78	2.41	16.89			8.43	3.14		3.11	3.34	3.22				
D	0.64	1.01			1.44						1.37	0.6	0.84		0.88	4.38	0.66		
E		0.95			0.94						2.55	1	0.67	0.85		3.71	0.59		2.96
F							10.25			31.93							3.44		
G	0.67	3.5			1.19	6.49	3.26												
H				4.88		7.39	6.83												
I		2.11				23.25	5.1			14.58									
K				19.31		5.18	31.33												
L							5.65			18.53									
M						12.14	5.15												
N						7.83	3.96			4.96					3.01				
P				4.72	5.49	5.16	6								10.7				
Q	0.76		2.37		1.33	35.06	2.96												
R				34.13		16.5	19.76								44.29				
S	0.84																		
T	1.03				1.39		2.48	2.05		4.37			3.12	3.82	3.78				
V							4			26.88					2.63				
W				2.19			26.63												
Y	0.88		6.28			6.18	3.87			28.25	3.75	3.26	2.96	14.49					

(6-5) Исследование роли сайта встраивания и длины пептида для повышения разнообразия библиотеки.

Согласно данным, представленным в примере 5, пептид можно встраивать в каждый сайт, используя последовательность GGS, без изменения связывающей активности в отношении CD3 (CD3ε). Если существует возможность удлинения петли для библиотеки двойных Fab, то полученная библиотека может включать большее число типов молекул (или характеризоваться большим разнообразием) и обеспечить получение Fab-фрагментов, связывающихся с разнообразными вторыми антигенами. В связи с этим, учитывая предполагаемое снижение связывающей активности в результате вставки пептида, в последо-

вательность CE115HA000 вводили вставки V11L/D72A/L78I/D101Q для повышения связывающей активности с CD3ε, которую затем присоединяли к pE22Hh. Молекулу получали за счет вставки в указанную последовательность линкера GGS, как описано в примере 5, и оценивали связывание полученных молекул с CD3. Последовательность GGS встраивали между положениями 99 и 100 согласно нумерации Кабата. Антитела экспрессировали в виде антитела с одним плечом. Более подробно, Н-цепь, содержащая линкер GGS, и описанная выше, и Kn010G3 (SEQ ID NO: 56) использовали в качестве Н-цепей, а GLS3000 (SEQ ID NO: 53), присоединенная к каппа-последовательности (SEQ ID NO: 55), использовали в качестве L-цепи. Указанные последовательности экспрессировали и очищали, как описано в примере сравнения 1.

(6-6) Подтверждение связывания антитела CE115, содержащего вставку пептида GGS, с CD3.

Связывание измененного антитела, содержащего вставку пептида GGS, с CD3ε подтверждали, используя прибор Biotec, по методике, описанной в примере 6. Данные, представленные в табл. 10, указывают на то, что линкер GGS можно встраивать в петли. Более подробно, линкер GGS можно встраивать в CDR3 область Н-цепи, которая играет важную роль для связывания антигена, и связывание с CD3ε сохранялось при осуществлении 3-, 6- или 9-членных аминокислотных вставок. Несмотря на то, что указанное исследование проводили с использованием линкера GGS, библиотека антител с отображением различных аминокислот, отличающихся от GGS, является приемлемой.

Таблица 10

Встраиваемая аминокислотная последовательность	CD3_KD[M]
GGS	6.31E-08
GGSGGS (SEQ ID NO: 90)	3.46E-08
GGSGGS (SEQ ID NO: 90)	3.105E-08
GGSGGS (SEQ ID NO: 92)	4.352E-08
GGSGGS (SEQ ID NO: 92)	3.429E-08
GGSGGS (SEQ ID NO: 93)	4.129E-08
GGSGGS (SEQ ID NO: 93)	3.753E-08
GGSGGS (SEQ ID NO: 91)	4.39E-08
GGSGGS (SEQ ID NO: 91)	3.537E-08
Без вставки	6.961E-09
CE115HA000	1.097E-07

(6-7) Исследование влияния вставки для библиотеки к Н-цепи CDR3 с использованием нуклеотидной последовательности NNS.

В разделе (6-6) показано, что 3-, 6- или 9-членные аминокислотные последовательности можно встраивать с использованием линкера GGS, и можно сделать вывод, что библиотеку, содержащую 3-, 6- или 9-членные аминокислотные последовательности, можно использовать для получения антител, связывающихся со вторым антигеном, используя стандартный метод получения антител, например, метод фагового дисплея. Таким образом, было проведено исследование влияния 6-членной аминокислотной вставки в CDR3 на сохранение связывания с CD3, даже если различные аминокислоты отображаются в сайте 6-членной аминокислотной вставки, при использовании нуклеотидной последовательности NNS (что позволяет отображать каждый тип аминокислот). С учетом предполагаемого снижения связывающей активности, получали праймеры с использованием нуклеотидной последовательности NNS таким образом, что 6 аминокислотных остатков встраивали между положениями 99 и 100 (нумерация по Кабату) в CDR3 последовательности CE115HA340 (SEQ ID NO: 59), которая характеризуется более высокой CD3ε-связывающей активностью по сравнению с CE115HA000. Антитело экспрессировали в форме антител с одним плечом. Более подробно, измененную Н-цепь, описанную выше, и Kn010G3 (SEQ ID NO: 56) использовали в качестве Н-цепей, а GLS3000 (SEQ ID NO: 53), присоединенную к каппа-последовательности (SEQ ID NO: 55), использовали в качестве L-цепи. Указанные последовательности экспрессировали и очищали, как описано в примере сравнения 1. Связывающую активность полученного измененного антитела оценивали по методике, описанной в разделе (6-3). Результаты представлены в табл. 11. Результаты свидетельствуют о том, что связывающая активность с CD3 (CD3ε) сохраняется, даже если различные аминокислоты отображаются в сайте, удлиненном аминокислотными остатками. В табл. 12 представлены результаты последующей оценки наличия или отсутствия усиления неспецифического связывания по методике, описанной в примере сравнения 2. Результаты свидетельствуют о том, что связывание с ВКМ усиливается, если удлиненная петля CDR3 обогащена аминокислотными остатками, которые содержат положительно заряженную боковую цепь. Таким образом, желательно чтобы три или более аминокислотных остатков, которые содержат положительно заряженную боковую цепь, не присутствовали в петле.

Таблица 11

VH	CD3_ KD[M]	C D R 3																			
		9								1	0										
CE115HA340	2.0E-08	5	6	7	8	9	0	a	b	c	d	e	f	g	h	i	k	1	1	2	
CE115HA340	2.7E-08	V	H	Y	A	A	X	X	X	X	X	X	Y	Y	G	V	-	-	D	A	
NNS6f17	7.4E-08	.	.	.	.	.	W	G	E	G	V	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f27	3.8E-08	.	.	.	.	.	V	W	G	S	V	W	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f29	9.0E-08	.	.	.	.	.	I	Y	Y	P	T	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f47	3.1E-08	.	.	.	.	.	H	F	M	W	W	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f50	7.1E-08	.	.	.	.	.	L	T	G	G	L	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f51	3.1E-08	.	.	.	.	.	G	F	L	V	L	W	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f52	5.2E-08	.	.	.	.	.	Y	M	L	G	L	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f54	2.9E-08	.	.	.	.	.	F	E	W	V	G	W	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f55	3.1E-08	.	.	.	.	.	A	G	R	W	L	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f56	2.1E-08	.	.	.	.	.	R	E	A	T	R	W	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f58	4.4E-08	.	.	.	.	.	S	W	Q	V	S	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f59	2.0E-07	.	.	.	.	.	L	L	V	Q	E	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f62	6.1E-08	.	.	.	.	.	N	G	G	T	R	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f63	6.9E-08	.	.	.	.	.	G	G	G	G	W	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f64	7.8E-08	.	.	.	.	.	L	V	S	L	T	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f67	3.6E-08	.	.	.	.	.	G	L	L	R	A	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f68	4.5E-08	.	.	.	.	.	V	E	W	G	R	W	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f71	5.1E-08	.	.	.	.	.	G	W	V	L	G	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f72	1.5E-07	.	.	.	.	.	E	G	I	W	W	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f73	2.6E-08	.	.	.	.	.	W	V	V	G	V	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Таблица 12

				C D R 3																	
H-цепь	Реакция ECL		Соотношение	9						1	0										
	ВКМ, 3 нМ	MRA																			
CE115HA340	394	448	0.9	V	H	Y	A	A	X	X	X	X	X	Y	Y	G	V	-	-	D	A
NNS6f17	409	448	0.9	.	.	.	.	.	W	G	E	G	V	V	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f27	3444	448	7.7	.	.	.	.	.	V	W	G	S	V	W	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f29	481	448	1.1	.	.	.	.	.	I	Y	Y	P	T	N	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f47	94137	448	210.3	.	.	.	.	.	H	F	M	W	W	G	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f50	385	564	0.7	.	.	.	.	.	L	T	G	G	L	G	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f51	20148	564	35.7	.	.	.	.	.	G	F	L	V	L	W	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f52	790	564	1.4	.	.	.	.	.	Y	M	L	G	L	G	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f54	1824	564	3.2	.	.	.	.	.	F	E	W	V	G	W	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f55	14183	564	25.1	.	.	.	.	.	A	G	R	W	L	A	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f56	6534	564	11.6	.	.	.	.	.	R	E	A	T	R	W	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f58	2700	564	4.8	.	.	.	.	.	S	W	Q	V	S	R	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f59	388	564	0.7	.	.	.	.	.	L	L	V	Q	E	G	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f62	554	564	1.0	.	.	.	.	.	N	G	G	T	R	H	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f63	624	564	1.1	.	.	.	.	.	G	G	G	G	W	V	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f64	603	564	1.1	.	.	.	.	.	L	V	S	L	T	V	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f67	1292	564	2.3	.	.	.	.	.	G	L	L	R	A	A	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f68	2789	564	4.9	.	.	.	.	.	V	E	W	G	R	W	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f71	618	564	1.1	.	.	.	.	.	G	W	V	L	G	S	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f72	536	564	0.9	.	.	.	.	.	E	G	I	W	W	G	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f73	2183	564	3.9	.	.	.	.	.	W	V	V	G	V	R	.	.	.	.	.	.	.

(6-7) Конструирование и создание библиотеки двойных Fab.

На основании исследований, описанных в примере 6, библиотеку антител (библиотека двойных Fab), предназначенную для получения антитела, связывающегося с CD3 и вторым антигеном, конструировали следующим образом:

стадия 1: выбор аминокислот, которые обеспечивают сохранение связывания с CD3 (CD3ε) (обеспечивают 80% или более уровень связывания CE115HA000 с CD3),

стадия 2: выбор аминокислот, которые обеспечивают связывание с ВКМ на уровне в 10 раз больше по сравнению с уровнем для антитела MRA до введения замен, и

стадия 3: вставка 6 аминокислотных остатков между положениями 99 и 100 (нумерация по Кабату) в H-цепи CDR3.

Расширить разнообразие антигенсвязывающего сайта Fab-фрагментов можно, просто осуществляя стадию 1. Полученную библиотеку можно использовать для идентификации антигенсвязывающей молекулы, связывающейся со вторым антигеном. Расширить разнообразие антигенсвязывающего сайта Fab-фрагментов можно, просто осуществляя стадии 1 и 3. Полученную библиотеку можно использовать для идентификации антигенсвязывающей молекулы, связывающейся со вторым антигеном. Даже библиотека, созданная без выполнения стадии 2, позволяет получить молекулу, пригодную для проведения иссле-

тиц использовали частицы NeutrAvidin с иммобилизованным авидином (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin) или частицы с иммобилизованным стрептавидином (Dynabeads M-280).

Более подробно, 250 пмолей биотинилированного антигена добавляли к раствору полученной фаговой библиотеки, при этом контактирование антигена с раствором фаговой библиотеки осуществляли при комнатной температуре в течение 60 мин. После добавления магнитных частиц, блокированных БСА, комплексы антиген-фаг иммобилизовали на магнитные частицы при комнатной температуре в течение 15 мин. Частицы трижды промывали TBST (TBS (фирмы Takara Bio Inc.), содержащий 0,1% Твин 20), затем дополнительно дважды промывали 1 мл TBS. После добавления 0,5 мл раствора трипсина (1 мг/мл) частицы суспендировали в течение 15 мин при комнатной температуре, после чего частицы немедленно отделяли, используя магнитную подставку для регенерации раствора фагов. Регенерированный раствор фагов добавляли к *E. coli* (штамм ER2738, 10 мл) в логарифмической фазе роста (OD 600: 0,4-0,5).

Штамм *E. coli* инфицировали фагами, при этом клетки инкубировали при 37°C в течение 1 ч при постоянном медленном перемешивании. Инфицированные *E. coli* переносили в планшет 225 мм×225 мм. Затем из культуральной среды инфицированных *E. coli* выделяли фаги, при этом получали раствор фаговой библиотеки. Указанный цикл (другое название пэннинг) повторяли несколько раз. Во втором и последующих циклах пэннинга использовали 40 пмолей биотинилированного антигена. В четвертом цикле пэннинга фаги обогащали способностью связываться с CD3 в качестве индекса. Более подробно, 250 пмолей биотинилированного пептидного антигена CD3ε (аминокислотная последовательность: SEQ ID NO: 60) добавляли к полученному раствору фаговой библиотеки и контактирование антигена и раствора фаговой библиотеки осуществляли в течение 60 мин при комнатной температуре. После добавления магнитных частиц, блокированных БСА, комплексы антиген-фаг иммобилизовали на магнитные частицы в течение 15 мин при комнатной температуре. Частицы промывали 1 мл TBS, содержащим 0,1% Твин 20, и TBS. Частицы, обработанные 0,5 мл трипсина (1 мг/мл), суспендировали при комнатной температуре в течение 15 мин, затем частицы немедленно отделяли, используя магнитную подставку, при этом регенерировали раствор фагов. Фаги, выделенные из раствора фагов, обработанного трипсином, добавляли к *E. coli* (штамм ER2738, 10 мл) в логарифмической фазе роста (OD 600: 0,4-0,7). Штамм *E. coli* инфицировали фагами, при этом клетки инкубировали при 37°C в течение 1 ч при постоянном медленном перемешивании. Инфицированные *E. coli* переносили в планшет 225 мм×225 мм. Затем из культуральной среды инфицированных *E. coli* выделяли фаги, при этом получали раствор фаговой библиотеки.

Для предотвращения получения множества фагов из одной клетки *E. coli* раствор фаговой библиотеки, полученный из *E. coli*, инфицированных с использованием фагов, выделенных в пятом цикле пэннинга, снова разбавляли в 100000 раз, и *E. coli* инфицировали, используя полученный раствор фагов, при этом получали единичные колонии.

(7-2) Связывание Fab-домена, полученного из фагового дисплея, с CD3 или IL6R (ИФА с использованием фагов).

Культуральный супернатант, содержащий фаги, получали по стандартной методике (см. статью *Methods Mol. Biol.*, 178, 133-145 (2002)) из каждой единичной колонии *E. coli*, полученной, как описано выше. После добавления БСА (конечная концентрация: 4%), культуральный супернатант, содержащий фаги, анализировали методом твердофазного ИФА по следующей методике: микротитрационный 96-луночный планшет (StreptaWell 96, фирмы F. Hoffmann-La Roche Ltd.) обрабатывали в течение ночи при 4°C или в течение 1 ч при комнатной температуре 100 мкл ФСБ, содержащим биотинилированный антиген (биотинилированный CD3ε пептид или биотинилированный IL6R человека). Каждую лунку планшета промывали PBST для удаления несвязавшихся антигенов. Затем лунки блокировали 250 мкл 4% БСА-TBS в течение 1 ч или более. После удаления 4% БСА-TBS в каждую лунку добавляли полученный культуральный супернатант, и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч для связывания антитела, полученного с использованием фагового дисплея, с антигеном, присутствующим в каждой лунке. Каждую лунку промывали TBST, затем в каждую лунку добавляли конъюгат пероксидазы хрена и антител к M13 (фирмы Amersham Pharmacia Biotech Inc.), разбавленный TBS, содержащим БСА (конечная концентрация: 4%). Планшет инкубировали в течение 1 ч. После промывки TBST в лунки добавляли раствор TMB (фирмы ZYMED Laboratories, Inc.). Хромогенную реакцию в растворе в каждой лунке останавливали добавлением серной кислоты. Затем окрашивание оценивали по оптической плотности при 450 нм. Результаты представлены на фиг. 19. Клоны #50 и #62 проявляют связывающую активность с CD3ε и IL6R человека. Другими словами, используя библиотеку двойных Fab можно успешно выбрать клоны, проявляющие связывающую активность в отношении второго антигена (в примере 7, IL6R человека). Клоны, проявляющие связывающую активность, можно выбрать из библиотеки при дальнейшем увеличении числа входящих в нее компонентов и их оценки, с последующим превращением в IgG (VH и VL последовательности каждого клона присоединяют к Н-цепи и L-цепи консервативных доменов антител человека, соответственно), и оценивать их связывающую активность с CD3ε и вторым антигеном (IL6R человека). Кроме того, связывание полученной молекулы с CD3ε и вторым антигеном (IL6R человека) одновременно или ее отсутствие можно определить способом, описанным в примерах 3 или 4 или методом конкурентного связывания. Метод конкурентного связывания свидетельствует о том, что анти-

тела не связываются с CD3ε и вторым антигеном одновременно, например, если уровень их связывания с CD3ε снижается в присутствии второго антигена по сравнению с уровнем при использовании только одного антитела.

Пример 8.

Получение Fab-домена, связывающегося с CD3 и вторым антигеном (IgA человека) из библиотеки двойных Fab.

(8-1) Получение Fab-домена, связывающегося с IgA человека.

Иммуноглобулин IgA относится к изотипу антител, который присутствует в избытке *in vivo*, и, как известно, принимает участие в неспецифических иммунных реакциях кишечника и слизистых оболочек различных органов, а также связывается с FcαR (Fc альфа-рецептор) (см. статью J. Pathol., 208, 270-282 (2006)).

Fab-домены (фрагменты антител), связывающиеся с IgA человека, выбирали из библиотеки двойных Fab, спроектированной и сконструированной, как описано в примере 6. Биотинилированный IgA человека (как описано в примере сравнения 3) использовали в качестве антигена, и накапливали фрагменты антител, способные связываться с IgA человека.

Фаги получали из *E. coli*, содержащих сконструированные фагмиды для фагового дисплея. 2,5 М NaCl/10% ПЭГ добавляли к культуральной среде *E. coli*, где продуцировали фаги, осажденный пул фагов разбавляли TBS, при этом получали раствор фаговой библиотеки. Затем к раствору фаговой библиотеки добавляли БСА (конечная концентрация: 4%). Пэннинг проводили по стандартной методике со ссылкой на общую методику, используя антигены, иммобилизованные на магнитных частицах (см. статьи J. Immunol. Methods., 332 (1-2), 2-9 (2008), J. Immunol. Methods., 247 (1-2), 191-203 (2001), Biotechnol. Prog., 18 (2), 212-220 (2002) и Mol. Cell Proteomics 2 (2), 61-69 (2003)). В качестве магнитных частиц использовали частицы NeutrAvidin с иммобилизованным авидином (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin) или частицы с иммобилизованным стрептавидином (Dynabeads M-280).

Более подробно, 250 пмоль биотинилированного антигена добавляли к раствору полученной фаговой библиотеки, при этом контактирование антигена с раствором фаговой библиотеки осуществляли при комнатной температуре в течение 60 мин. После добавления магнитных частиц, блокированных БСА, комплексы антиген-фаг иммобилизовали на магнитные частицы при комнатной температуре в течение 15 мин. Частицы трижды промывали TBST (TBS (фирмы Takara Bio Inc.)), содержащий 0,1% Твин 20), затем дополнительно дважды промывали 1 мл TBS. После добавления 0,5 мл раствора трипсина (1 мг/мл) частицы суспендировали в течение 15 мин при комнатной температуре, после чего частицы немедленно отделяли, используя магнитную подставку для регенерации раствора фагов. Регенерированный раствор фагов добавляли к *E. coli* (штамм ER2738, 10 мл) в логарифмической фазе роста (OD 600: 0,4-0,5). Штамм *E. coli* инфицировали фагами, при этом клетки инкубировали при 37°C в течение 1 ч при постоянном медленном перемешивании. Инфицированные *E. coli* переносили в планшеты 225 мм×225 мм. Затем из культуральной среды инфицированных *E. coli* выделяли фаги, при этом получали раствор фаговой библиотеки. Указанный цикл (другое название пэннинг) повторяли 4 раза. Во втором и последующих циклах пэннинга использовали 40 пмоль IgA человека.

(8-2) Связывание Fab-домена, полученного из фагового дисплея, с CD3 или IgA человека.

Культуральный супернатант, содержащий фаги, получали по стандартной методике (см. статью Methods Mol. Biol., 178, 133-145 (2002)) из каждой единичной колонии *E. coli*, полученной, как описано выше. После добавления БСА (конечная концентрация: 4%), культуральный супернатант, содержащий фаги, анализировали с использованием твердофазного ИФА по следующей методике: микротитрационный 96-луночный планшет (StreptaWell 96, фирмы F. Hoffmann-La Roche Ltd.) обрабатывали в течение ночи при 4°C или в течение 1 ч при комнатной температуре 100 мкл ФСБ, содержащим биотинилированный антиген (биотинилированный CD3ε пептид или биотинилированные IgA человека, как описано в примере сравнения 3). Каждую лунку планшета промывали PBST для удаления несвязавшихся антигенов. Затем лунки блокировали 250 мкл 0,1×TBS/150 мМ NaCl/0,02 % обезжиренное молоко в течение 1 ч или более. После удаления раствора 0,1×TBS/150 мМ NaCl/0,02 % обезжиренное молоко в каждую лунку добавляли полученный культуральный супернатант, и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч для связывания антитела, отображенного на фаговом дисплее, с антигеном, присутствующим в каждой лунке. Каждую лунку промывали 0,1×TBS/150 мМ NaCl/0,01 % Твин 20, затем в каждую лунку добавляли конъюгат пероксидазы хрена и антител к M13 (фирмы Amersham Pharmacia Biotech Inc.), разбавленный 0,1×TBS/150 мМ NaCl/0,01 % Твин 20. Планшет инкубировали в течение 1 ч. После промывки TBST в лунки добавляли раствор TMB (фирмы ZYMED Laboratories, Inc.). Хромогенную реакцию в растворе в каждой лунке останавливали добавлением серной кислоты. Затем окрашивание оценивали по оптической плотности при 450 нм. Результаты представлены на фиг. 20. Согласно данным, представленным на фиг. 20, некоторые клоны связываются с CD3 и IgA человека. Таким образом, используя библиотеку двойных Fab можно успешно выбрать клоны, проявляющие связывающую активность в отношении второго антигена (пример 8, IgA человека).

(8-3) Связывание IgG, содержащих полученный Fab-домен, с CD3 или IgA человека.

VH-фрагмент каждого клона, связывающегося с CD3 и IgA человека, как описано в разделе (8-2), амплифицировали из *E. coli*, содержащих указанную последовательность, методом ПЦР, используя праймеры, специфически связывающиеся с Н-цепью в библиотеке двойных Fab. Амплифицированный VH-фрагмент присоединяли к плазмидам, содержащим pE22Nh, для экспрессии в клетках животных методом, описанным в примере сравнения 1, экспрессию и очистку проводили, как описано в примере 6 (раздел 6-2) для антител с одним плечом. Название каждого клона и SEQ ID № последовательности их Н-цепи представлены в табл. 15. Более подробно, каждую Н-цепь, представленную в табл. 15, и Kn010G3 (SEQ ID NO: 56) использовали в качестве Н-цепей, а GLS3000 (SEQ ID NO: 53), присоединенную к каппа-последовательности (SEQ ID NO: 55), использовали в качестве L-цепи. Указанные последовательности экспрессировали и очищали, как описано в примере сравнения 1.

Таблица 15

Название образца	SEQ ID №
IGAR4C09#1	61
IGAR4C12#4	62
IGAR6(2)B02#1	63

Связывающую активность антител, содержащих полученный Fab-фрагмент, в отношении CD3ε и IgA человека оценивали электрохемилюминесцентным методом (метод ECL). Более подробно, биотинилированный CD3ε пептид (как описано в примере 7) или биотинилированные IgA человека (сравнительный пример 3) разбавляли раствором TBST (TBS (фирмы Takara Bio Inc.), содержащий 0,1% Твин 20), затем каждый раствор антител, разбавленный до концентрации 2 мкг/мл, а также антитела к IgG человека (фирмы Invitrogen Corp., #628400) с включенной сульфо-меткой добавляли в лунки 96-луночного планшета Nunc-Immuno MicroWell с круглым дном (фирмы Nunc), каждый в количестве 25 мкл/лунку, и перемешивали, затем планшеты инкубировали в темноте в течение 1 ч или более при комнатной температуре для формирования комплекса антитело-антиген. В планшет с иммобилизованным стрептавидином (фирмы MSD K.K.) добавляли раствор TBST, содержащий 0,5% БСА (другое название блокирующий раствор), в количестве 150 мкл/лунку и планшет инкубировали в течение 1 ч или более при комнатной температуре. После удаления блокирующего раствора каждую лунку трижды промывали по 250 мкл раствора TBS(-). В планшет добавляли раствор, содержащий комплекс антитело-антиген, в количестве 50 мкл/лунку, и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч для связывания комплекса биотинилированный антиген - антитело для детекции, содержащее сульфо-метку, через биотинилированный антиген с иммобилизованным стрептавидином на планшете. После удаления раствора, содержащего комплекс антитело-антиген, каждую лунку трижды промывали раствором TBST, и в них добавляли 4× буферный раствор READ (фирмы MSD K.K.), разбавленный водой в два раза, в количестве 150 мкл/лунку, затем регистрировали флуоресцентный сигнал сульфо-метки с использованием прибора Sector Imager 2400 (фирмы MSD K.K.).

Результаты представлены на фиг. 21. Клоны, обладающие связывающей активностью согласно данным твердофазного ИФА с использованием фагов, каждый превращали в IgG, а также включая клоны, которые содержали некоторые мутации аминокислот. Следовательно, указанные последовательности, обладающие связывающей активностью согласно данным твердофазного ИФА с использованием фагов, связываются с CD3ε и IgA человека даже в форме IgG.

Полученные результаты, свидетельствуют о том, что из библиотеки двойных Fab можно получить антитела, связывающиеся со вторым антигеном, и клоны с подтвержденным связыванием можно обогащать даже в виде IgG, содержащих Fc-область, несмотря на то, что с использованием фаговой библиотеки стандартным пэннингом обогащают только Fab-домены. Таким образом, можно сделать вывод, что библиотеку двойных Fab можно использовать в качестве библиотеки, которая позволяет получить Fab-домен, способный связываться со вторым антигеном, при сохранении способности связываться с CD3.

(8-4) Оценка связывания IgG, содержащих полученный Fab-домен, с CD3 (CD3ε) и IgA человека одновременно.

Согласно разделу (8-3) клоны, полученные из библиотеки двойных Fab, обладают связывающей активностью даже в форме IgG. В дальнейшем оценивали способность каждого полученного IgG связываться с CD3 (CD3ε) и IgA человека одновременно методом конкурентного связывания (электрохемилюминесцентным методом (метод ECL)). Можно ожидать, что если IgG связывается с CD3 (CD3ε) и IgA человека одновременно, то добавление CD3 (CD3ε) к антителам со связанным IgA не будет приводить к изменению сигнала ECL, а если IgG не связывается с указанными антигенами одновременно, то добавление CD3 (CD3ε) будет снижать сигнал ECL из-за связывания некоторого количества антител с CD3 (CD3ε).

Более подробно, 25 мкл биотинилированных IgA человека разбавляли раствором TBST, 12,5 мкл раствора каждого антител, разбавленного до 1 мкл/мл, 12,5 мкл TBST или белкового гомодимера CD3ε (9,4 пмоль/мкл) для конкурентного связывания, а также 25 мкл антител к IgG человека (фирмы Invitrogen Corp., #628400) с включенной сульфо-меткой добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета Nunc-

Immuno™ Micro Well™ с круглым дном (фирмы Nunc) и перемешивали, затем планшеты инкубировали в темноте в течение 1 ч или более при комнатной температуре для формирования комплекса антитело-антиген. В планшет с иммобилизованным стрептавидином (фирмы MSD K.K.) добавляли раствор TBST, содержащий 0,5% БСА (другое название блокирующий раствор, TBS (фирмы Takara Bio Inc.), содержащий 0,1% Твин 20)), в количестве 150 мкл/лунку и планшет инкубировали в течение 1 ч или более при комнатной температуре. После удаления блокирующего раствора, каждую лунку трижды промывали по 250 мкл раствора TBST. В планшет добавляли раствор, содержащий комплекс антитело-антиген, в количестве 50 мкл/лунку, и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч для связывания комплекса биотинилированный антиген - антитело для детекции, содержащее сульфо-метку, через биотинилированный антиген с иммобилизованным стрептавидином на планшете. После удаления раствора, содержащего комплекс антитело-антиген, каждую лунку трижды промывали раствором TBST, и в них добавляли 4× буферный раствор READ (фирмы MSD K.K.), разбавленный водой в два раза, в количестве 150 мкл/лунку, затем регистрировали флуоресцентный сигнал сульфо-метки с использованием прибора Sector Imager 2400 (фирмы MSD K.K.).

Результаты представлены на фиг. 22. Установлено, что добавление белкового гомодимера CD3ε для конкурентного связывания снижает сигнал ECL по сравнению с добавлением TBST. Полученные результаты свидетельствуют о том, что молекула, связывающаяся с CD3 и IgA человека, представляют собой молекулу с двумя Fab, которая не связывается с IgA человека, в состоянии, связанном с CD3. Таким образом, результаты свидетельствуют о том, что антитело, способное связываться со вторым антигеном, можно получить из библиотеки двойных Fab и, среди прочих можно получить в форме молекулы с двумя Fab, которая не связывается со вторым антигеном в состоянии, связанном с CD3 (или не связывается с CD3 в состоянии, если она связана со вторым антигеном), т.е. не может связываться с множеством типов антигенов одновременно.

Специалисту в данной области техники представляется очевидным, что разнообразие последовательностей связывающей молекулы, найденных при оценке связывающей активности с использованием фагов, как описано в разделе (8-2), можно расширить за счет увеличения числа компонентов библиотеки, предназначенных для оценки. Таким образом, был сделан вывод, что библиотеку двойных Fab можно использовать в качестве библиотеки, позволяющей получить Fab-домен со связывающей активностью со вторым антигеном при сохранении связывающей активности с CD3. В данном примере библиотеку двойных Fab расширяли только за счет Н-цепей. Увеличение размера библиотеки (другое название - разнообразие, обозначает, что библиотека включает множество различных последовательностей) обычно позволяет получить большее количество антигенсвязывающих молекул. Таким образом, в этом примере показано, что для получения молекул двойных Fab можно также использовать библиотеку двойных Fab с расширением за счет общих цепей Н и L.

При условии, что молекулы с двумя Fab можно получить, как описано в примере 8, Fab-фрагмент или антигенсвязывающий домен, связывающийся с третьим антигеном, можно идентифицировать способом, известным специалисту в данной области техники, например, способом с использованием гибридом или способом выбора связывающих антител (или связывающих доменов) из библиотеки антител. Антитело, содержащее идентифицированный антигенсвязывающий домен (например, Fab-фрагмент), связывающееся с третьим антигеном, и Fab-домен молекулы с двойным Fab можно получить в виде мультиспецифического антитела, используя известный способ получения мультиспецифических антител, например, способом получения антител с общими L-цепями и двумя различными Н-цепями (способ контроля взаимодействия каждого домена в Fc-области), CrossMab или способ обмена Fab-плечей. Другими словами, при условии, что молекулу с двумя Fab можно идентифицировать, требуемое мультиспецифическое антитело можно получить известным способом, комбинируя Fab, связывающиеся с третьим антигеном с двумя Fab, связывающимися с первым и вторым антигенами, как описано в примере 8.

(8-5) Молекула с двумя Fab, связывающаяся с CD3/IgA.

Согласно, данным, представленным в примере 8, полученная молекула с двумя Fab связывается с CD3ε и IgA человека, но не связывается с CD3ε и IgA человека одновременно. Антигенсвязывающий домен, связывающийся с третьим антигеном, можно дополнительно включить в ее состав известным способом.

В последние годы было установлено, что IgA, модифицированные для связывания с EGFR, т.е. с раковым антигеном, вызывают гибель раковых клеток, которые экспрессируют EGFR (J Immunol., 179: 2936-2943 (2007)). Такой механизм гибели заключается в том, что IgA рецептор FcαR экспрессируется на полиморфноядерных клетках и, как сообщается, индуцирует аутофагию раковых клеток (см. статью J. Immunol., 187, 726-732 (2011)). В данном примере было показано, что можно сконструировать молекул с двумя Fab, связывающуюся с CD3 и IgA. В ходе поиска молекул, связывающихся с FcαR через IgA, способом, известным специалисту в данной области техники (например, твердофазный ИФА или метод ECL), можно ожидать идентификацию молекул, которые проявляют противоопухолевые эффекты, опосредованные FcαR. Другими словами, указанные двойные Fab могут вызывать как опосредованную Т-клетками цитотоксическую реакцию за счет связывания с CD3ε, так и цитотоксическую реакцию, опосредованную FcαR.

средованную связыванием Fc α R-экспрессирующих клеток с IgA по сравнению с клетками, экспрессирующими произвольный третий антиген, в результате чего можно ожидать развитие сильной цитотоксической реакции.

Пример 9.

Получение Fab-домена, связывающегося с CD3 и вторым антигеном (CD154 человека) из библиотеки двойных Fab.

(9-1) Получение Fab-домена, связывающегося с CD154 человека.

Fab-домены (фрагменты антител), связывающиеся с CD154 человека, выбирали из библиотеки двойных Fab, спроектированной и сконструированной, как описано в примере 6. Фрагменты антител, обладающие способностью связываться с CD154 человека, обогащали, используя биотинилированный CD154 человека в качестве антигена.

Фаги получали из *E. coli*, содержащих сконструированные фагмиды для фагового дисплея. 2,5 М NaCl/10% ПЭГ добавляли к культуральной среде *E. coli*, где продуцировали фаги, осажденный пул фагов разбавляли TBS, при этом получали раствор фаговой библиотеки. Затем к раствору фаговой библиотеки добавляли БСА (конечная концентрация: 4%). Пэннинг проводили по стандартной методике, со ссылкой на общую методику, используя антигены, иммобилизованные на магнитных частицах (см. статьи J. Immunol. Methods., 332 (1-2), 2-9 (2008), J. Immunol. Methods., 247 (1-2), 191-203 (2001), Biotechnol. Prog., 18 (2), 212-220 (2002) и Mol. Cell Proteomics 2 (2), 61-69 (2003)). В качестве магнитных частиц использовали частицы NeutrAvidin с иммобилизованным авидином (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin) или частицы с иммобилизованным стрептавидином (Dynabeads M-280).

Более подробно, 250 пмолей биотинилированного антигена добавляли к раствору полученной фаговой библиотеки, при этом контактирование антигена с раствором фаговой библиотеки осуществляли при комнатной температуре в течение 60 мин. После добавления магнитных частиц, блокированных БСА, комплексы антиген-фаг иммобилизовали на магнитные частицы при комнатной температуре в течение 15 мин. Частицы трижды промывали TBST (TBS (фирмы Takara Bio Inc.)), содержащий 0,1% Твин 20), затем дополнительно дважды промывали 1 мл TBS. После добавления 0,5 мл раствора трипсина (1 мг/мл) частицы суспендировали в течение 15 мин при комнатной температуре, после чего частицы немедленно отделяли, используя магнитную подставку для регенерации раствора фагов. Регенерированный раствор фагов добавляли к *E. coli* (штамм ER2738, 10 мл) в логарифмической фазе роста (OD 600: 0,4-0,5). Штамм *E. coli* инфицировали фагами, при этом клетки инкубировали при 37°C в течение 1 ч при постоянном медленном перемешивании. Инфицированные *E. coli* переносили в планшеты 225 мм×225 мм. Затем из культуральной среды инфицированных *E. coli* выделяли фаги, при этом получали раствор фаговой библиотеки. Указанный цикл (другое название пэннинг) повторяли 5 раз. Во втором и последующих циклах пэннинга использовали 40 пмолей CD154 человека.

(9-2) Связывание Fab-домена, полученного из фагового дисплея, с CD3 или CD154 человека.

Культуральный супернатант, содержащий фаги, получали по стандартной методике (см. статью Methods Mol. Biol., 178, 133-145 (2002)) из каждой единичной колонии *E. coli*, полученной, как описано выше. После добавления БСА (конечная концентрация: 4%), культуральный супернатант, содержащий фаги, анализировали с использованием твердофазного ИФА по следующей методике: микротитрационный 96-луночный планшет (StreptaWell 96, фирмы F. Hoffmann-La Roche Ltd.) обрабатывали в течение ночи при 4°C или в течение 1 ч при комнатной температуре 100 мкл ФСБ, содержащим биотинилированный антиген (биотинилированный CD3ε пептид или биотинилированные CD154 человека). Каждую лунку планшета промывали PBST для удаления несвязавшихся антигенов. Затем лунки блокировали 250 мкл 0,1×TBS/150 mM NaCl/0,02 % обезжиренное молоко в течение 1 ч или более. После удаления раствора 0,1×TBS/150 mM NaCl/0,02 % обезжиренное молоко в каждую лунку добавляли полученный культуральный супернатант, и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч для связывания антитела, отображенного в фаговом дисплее, с антигеном, присутствующим в каждой лунке. Каждую лунку промывали 0,1×TBS/150 mM NaCl/0,01 % Твин 20, затем в каждую лунку добавляли конъюгат пероксидазы хрена и антител к M13 (фирмы Amersham Pharmacia Biotech Inc.), разбавленный 0,1×TBS/150 mM NaCl/0,01 % Твин 20. Планшет инкубировали в течение 1 ч. После промывки TBST в лунки добавляли раствор TMB (фирмы ZYMED Laboratories, Inc.). Хромогенную реакцию в растворе в каждой лунке останавливали добавлением серной кислоты. Затем окрашивание оценивали по оптической плотности при 450 нм. Результаты представлены на фиг. 23. Согласно данным, представленным на фиг. 23, некоторые клоны связываются с CD3 и CD154 человека. Таким образом, используя библиотеку двойных Fab можно успешно выбрать клоны, проявляющие связывающую активность со вторым антигеном (пример 9, CD154IgA).

Как показано в примерах 7, 8 и 9 можно получить Fab-домены, связывающиеся с 3 различными антигенами, что свидетельствует о том, что библиотеку двойных Fab можно использовать для получения молекулы, которая связывается со вторым антигеном.

(9-3) Связывание IgG, содержащих полученный Fab-домен, с CD3 или CD154 человека.

VH-фрагмент каждого клона, связывающегося с CD3 и CD154 человека, как описано в разделе (8-

2), амплифицировали из *E. coli*, содержащих указанную последовательность, методом ПЦР, используя праймеры, специфически связывающиеся с Н-цепью в библиотеке двойных Fab. Амплифицированный VH-фрагмент присоединяли к плазидам, содержащим pE22Nh, для экспрессии в клетках животных методом, описанным в примере сравнения 1, экспрессию и очистку проводили, как описано в примере 6 (раздел 6-2) для антител с одним плечом. Название каждой полученной последовательности и SEQ ID NO их Н-цепи представлены в табл. 16. Более подробно, каждую Н-цепь, представленную в табл. 16, и Kп010G3 (SEQ ID NO: 56) использовали в качестве Н-цепей, а GLS3000 (SEQ ID NO: 53), присоединенную к каппа-последовательности (SEQ ID NO: 55), использовали в качестве L-цепи. Указанные последовательности экспрессировали и очищали, как описано в примере сравнения 1.

Таблица 16

Название образца	SEQ ID №	Название образца	SEQ ID №
154R3A01#1	64	154R4B07#1	72
154R3A01#2	65	154R4F08#1	73
154R3A01#3	66	154R5A02#1	74
154R3A01#4	67	154R5A02#2	75
154R3B01#1	68	154R5F08#1	76
154R3F02#2	69	154R5F08#3	77
154R4B03#1	70	154R5E11#3	78
154R4B03#4	71		

Связывающую активность антител, содержащих Fab-область, связывающуюся с CD3ε и CD154 человека по данным твердофазного ИФА с использованием фагов, как описано в разделе (9-2), в отношении CD3 и CD154 человека оценивали электрохемилюминесцентным методом (метод ECL). Более подробно, 25 мкл биотинилированного CD3 или биотинилированного CD154 человека разбавляли раствором TBST, затем 25 мкл раствора каждого антитела, разбавленного до концентрации 2 мкг/мл, а также 25 мкл антител к IgG человека (фирмы Invitrogen Corp., #628400) с включенной сульф-меткой добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета Nunc-Immuno™ MicroWell™ с круглым дном (фирмы Nunc), и перемешивали, затем планшеты инкубировали в темноте в течение 1 ч или более при комнатной температуре для формирования комплекса антитело-антиген. Раствор TBST, содержащий 0,5% БСА (блокирующий раствор, раствор TBST представляет собой TBS (фирмы Takara Bio Inc.), содержащий 0,1% Твин 20), добавляли в планшет с иммобилизованным стрептавидином (фирмы MSD K.K.) в количестве 150 мкл/лунку, и планшет инкубировали в течение 1 ч или более при комнатной температуре. После удаления блокирующего раствора, каждую лунку трижды промывали по 250 мкл раствора TBST. В планшет добавляли раствор, содержащий комплекс антитело-антиген, в количестве 50 мкл/лунку, и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч для связывания комплекса биотинилированный антиген - антитело для детекции, содержащее сульф-метку, через биотинилированный антиген с иммобилизованным стрептавидином на планшете. После удаления раствора, содержащего комплекс антитело-антиген, каждую лунку трижды промывали раствором TBST, и в них добавляли 4× буферный раствор READ (фирмы MSD K.K.), разбавленный водой в два раза, в количестве 150 мкл/лунку, затем регистрировали флуоресцентный сигнал сульф-метки с использованием прибора Sector Imager 2400 (фирмы MSD K.K.).

Результаты представлены на фиг. 24. Клоны, обладающие связывающей активностью согласно данным твердофазного ИФА с использованием фагов, каждый превращали в IgG, а также включая клоны, которые содержали некоторые мутации аминокислот. Следовательно, указанные последовательности, обладающие связывающей активностью согласно данным твердофазного ИФА с использованием фагов, связываются с CD3ε и CD154 человека даже в форме IgG.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что антитело, связывающееся со вторым антигеном, можно получить из библиотеки двойных Fab, и клоны с подтвержденным связыванием можно обогащать не только для IgA человека, но и CD154 человека даже в виде IgG, содержащих Fc-область, несмотря на то, что с использованием фаговой библиотеки стандартным пэннингом обогащают только Fab-домены. Таким образом, можно сделать вывод, что библиотеку двойных Fab можно использовать в качестве библиотеки, которая позволяет получить Fab-домен, способный связываться со вторым антигеном, при сохранении способности связываться с CD3.

(9-4) Оценка одновременного связывания IgG, содержащих полученный Fab-домен, с CD3ε и CD154 человека.

Согласно разделу (9-3) клоны, полученные из библиотеки двойных Fab, обладают связывающей активностью даже в форме IgG. Затем оценивали способность каждого полученного IgG одновременно связываться с CD3 и CD154 человека методом конкурентного связывания (электрохемилюминесцентным методом (метод ECL)). Можно ожидать, что если IgG одновременно связывается с CD3 и CD154 человека, то добавление CD3 к антителам, которые связаны с CD154, не будет приводить к изменению сигнала ECL, а если IgG одновременно не связываются с указанными антигенами, то добавление CD3 будет снижать сигнал ECL из-за связывания некоторого количества антител с CD3.

Более подробно, 25 мкл биотинилированных CD154 человека разбавляли раствором TBST, 12,5 мкл раствора каждого антитела, разбавленного до 1 мкл/мл, 12,5 мкл TBST или белкового гомодимера CD3ε (9,4 пмоль/мкл) для конкурентного связывания, а также 25 мкл антител к IgG человека (фирмы Invitrogen Corp., #628400) с включенной сульфо-меткой добавляли в каждую лунку 96-луночного планшета Nunc-Immuno™ MicroWell™ с круглым дном (фирмы Nunc) и перемешивали, затем планшеты инкубировали в темноте в течение 1 ч или более при комнатной температуре для формирования комплекса антитело-антиген. В планшет с иммобилизованным стрептавидином (фирмы MSD K.K.) добавляли раствор TBST, содержащий 0,5% БСА (блокирующий раствор, TBS (фирмы Takara Bio Inc.), содержащий 0,1% Твин 20)), в количестве 150 мкл/лунку и планшет инкубировали в течение 1 ч или более при комнатной температуре. После удаления блокирующего раствора, каждую лунку трижды промывали по 250 мкл раствора TBST. В планшет добавляли раствор, содержащий комплекс антитело-антиген, в количестве 50 мкл/лунку, и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч для связывания комплекса биотинилированный антиген - антитело для детекции, содержащее сульфо-метку, через биотинилированный антиген с иммобилизованным стрептавидином на планшете. После удаления раствора, содержащего комплекс антитело-антиген, каждую лунку трижды промывали раствором TBST, и в них добавляли 4× буферный раствор READ (фирмы MSD K.K.), разбавленный водой в два раза, в количестве 150 мкл/лунку, затем регистрировали флуоресцентный сигнал сульфо-метки с использованием прибора Sector Imager 2400 (фирмы MSD K.K.).

Результаты представлены на фиг. 25. Установлено, что добавление белкового гомодимера CD3ε для конкурентного связывания снижает сигнал ECL по сравнению с добавлением TBST. Указанные результаты свидетельствуют о том, что молекула, связывающаяся с CD3 и CD154 человека, представляют собой молекулу с двумя Fab, которая не связывается с CD154 человека, в состоянии связывания с CD3. Таким образом, результаты свидетельствуют о том, что антитела, способные связываться со вторым антигеном, можно получить из библиотеки двойных Fab и, среди прочих можно получить в форме молекулы с двумя Fab, которая не связывается со вторым антигеном в состоянии, когда она связана с CD3 (или не связывается с CD3 в состоянии, когда она связана со вторым антигеном), т.е. не может одновременно связываться с множеством типов антигенов.

Специалисту в данной области техники представляется очевидным, что разнообразие последовательностей связывающей молекулы, найденных при оценке связывающей активности с использованием фагов, как описано в разделе (9-2), можно расширить за счет увеличения числа компонентов библиотеки, предназначенных для оценки. Таким образом, был сделан вывод, что библиотеку двойных Fab можно использовать в качестве библиотеки, позволяющей получить Fab-домен со связывающей активностью со вторым антигеном при сохранении связывающей активности с CD3. В данном примере была использована библиотека двойных Fab, расширенная только за счет H-цепей. Увеличение размера библиотеки (другое название - разнообразие, обозначает, что библиотека включает множество различных последовательностей) обычно позволяет получить большее число антигенсвязывающих молекул. Таким образом, в этом примере показано, что для получения молекул двойных Fab можно также использовать библиотеку двойных Fab с расширением за счет общих цепей H и L.

При условии, что молекулы с двумя Fab можно получить, как описано в примере 9, Fab-фрагмент или антигенсвязывающий домен, связывающийся с третьим антигеном, можно идентифицировать известным способом, например, способом с использованием гибридом или способом выбора связывающих антител или связывающих доменов из библиотеки антител. Антитела, содержащие идентифицированный антигенсвязывающий домен (например, Fab-фрагмент), связывающиеся с третьим антигеном, и Fab-домен молекулы с двойным Fab можно получить в виде мультиспецифического антитела, используя известный способ получения мультиспецифических антител, например, метод получения антител с общими L-цепями и двумя различными H-цепями (способ контроля взаимодействия каждого домена в Fc-области), CrossMab или способ обмена Fab-плечей. Другими словами, при условии, что молекулу с двумя Fab можно идентифицировать, требуемое мультиспецифическое антитело можно получить известным способом, комбинируя Fab, связывающиеся с третьим антигеном, с двумя Fab, связывающимися с первым и вторым антигенами, как описано в примере 9.

В этих примерах показано, что молекулу, которая связывается с CD3ε и вторым антигеном, можно получить, адаптируя библиотеку двойных Fab к множеству типов антигенов, а также показано, что молекула, полученная, как описано в примерах 8 или 9, связывается с первым антигеном (CD3ε) и вторым антигеном, но одновременно не связывается с первым антигеном и вторым антигеном. Как описано выше, Fab, который связывается с третьим антигеном, можно идентифицировать известным способом. Таким образом, требуемые антитела, описанные в примере 1, можно получить, используя библиотеку двойных Fab.

(9-5) Молекула с двумя Fab к CD3/CD154 человека.

Согласно, данным, представленным в примере 9, полученная молекула с двумя Fab связывается с CD3ε и CD154 человека, но одновременно не связывается с CD3ε и CD154 человека. Антигенсвязывающий домен, связывающийся с третьим антигеном, можно дополнительно включить в ее состав известным

способом.

В последние годы было установлено, что антитела - агонисты CD154 рецептора CD40 усиливают противоопухолевую активность в способе трансфекции Т-клеток, чувствительных к раковому антигену (см. статью J. Immunother., 35 (3), 276-282 (2012 Apr.)). В этом примере было показано, что можно сконструировать молекулу с двумя Fab, связывающуюся с CD3 и CD154. Можно ожидать, что будут наблюдаться противоопухолевые эффекты, опосредованные CD40, в ходе селекции антител, которые проявляют агонистическую активность к CD40 через CD154. Другими словами можно ожидать, что указанные двойные Fab могут вызывать опосредованную Т-клетками цитотоксическую реакцию за счет связывания с CD3ε по сравнению с клетками, экспрессирующими произвольный третий антиген, а также усиление противоопухолевых эффектов, опосредованных сигналами агонистов CD40 через связывание с CD154.

Примеры сравнения

Пример сравнения 1.

Получение экспрессионного вектора антитела, экспрессия и очистка антитела.

Замену аминокислот проводили известным способом, с использованием набора для сайт-направленного мутагенеза QuikChange (фирмы Stratagene Corp.), ПЦР или набора In fusion Advantage PCR cloning (фирмы Takara Bio Inc.) и т.п., для получения экспрессионного векторов. Полученные экспрессионные векторы секвенировали по известной методике. Полученные плазмиды сразу использовали для трансфекции клеточной линии HEK293H (фирмы Invitrogen Corp.), полученной из эмбриональных клеток рака почек человека, или клеток линии FreeStyle 293 (фирмы Invitrogen Corp.) для экспрессии антител. Каждое антитело очищали от компонентов полученного культурального супернатанта по известной методике, используя сефарозу rProtein A Sepharose(TM) Fast Flow (фирмы GE Healthcare Japan Corp.). Для определения концентрации очищенного антитела измеряли оптическую плотность его раствора при 280 нм, используя спектрофотометр, и концентрацию антител рассчитывали, используя коэффициент экстинкции, из значений, полученных методом PACE (см. статью Protein Science, 4, 2411-2423 (1995)).

Пример сравнения 2.

Оценка связывания антител с ВКМ (внеклеточный матрикс).

Связывание каждого антитела с ВКМ оценивали по следующим методикам, описанным в заявке WO 2012093704 A1. ВКМ, не содержащий феноловый красный (фирмы BD Matrigel, #356237), разбавляли TBS до концентрации 2 мг/мл и по каплям добавляли в центр каждой лунки (5 мкл/лунку) планшета для ECL анализа (L15XB-3, фирмы MSD K.K., высокий уровень связывания), при охлаждении льдом. Затем планшет закрывали крышкой и инкубировали при 4°C в течение ночи. Планшет с иммобилизованным ВКМ нагревали до комнатной температуры. Затем в лунки добавляли блокирующий буферный раствор для ECL (ФСБ, содержащий 0,5% БСА и 0,05% Твин 20) по 150 мкл/лунку, и планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч или более или в течение ночи при 4°C. Затем образец каждого антитела разбавляли ФСБ-Т (ФСБ, содержащий 0,05% Твин 20) до 9 мкг/мл. Вторые антитела разбавляли до концентрации 2 мкг/мл раствором ECLDB (ФСБ, содержащий 0,1% БСА и 0,01% Твин 20). Раствор антител (20 мкл) и раствор вторых антител (30 мкл) добавляли в каждую лунку планшета с круглым дном, содержащим в лунках раствор ECLDB (10 мкл/лунку), и перемешивали в темноте при комнатной температуре в течение 1 ч. Блокирующий буферный раствор для ECL удаляли, переворачивая планшет для ECM, содержащий блокирующий буферный раствор для ECL. В этот планшет добавляли смесь указанного выше антитела и второго антитела (50 мкл/лунку). Затем планшет инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 1 ч. Образец удаляли, переворачивая планшет, и затем в лунки добавляли буферный раствор READ (фирмы MSD K.K., 150 мкл/лунку), и детектировали флуоресцентный сигнал сульфо-метки, используя прибор Sector Imager 2400 (фирмы MSD K.K.).

Пример сравнения 3.

Получение IgA человека.

Fc-область последовательности природных IgA человека использовали в качестве IgA человека (Fc IgA человека). Для биотинилирования C-конца Fc IgA человека фрагмент гена, кодирующего специфическую последовательность (последовательность AviTag, SEQ ID NO: 79) для биотин-лигазы-опосредованного биотинилирования, присоединяли через линкер к фрагменту гена, кодирующему Fc IgA человека. Фрагмент гена, кодирующий белок, содержащий Fc IgA человека и присоединенную последовательность AviTag (SEQ ID NO: 80), встраивали в вектор для экспрессии в клетках животных, и сконструированными плазмидными векторами трансфицировали клетки FreeStyle 293 (фирмы Invitrogen Corp.), используя 293Fectin (фирмы Invitrogen Corp.). В ходе указанной операции клетки совместно трансфицировали с экспрессионным вектором и геном, кодирующим EBNA1 (SEQ ID NO: 81), и геном, кодирующим биотин-лигазу (BirA, SEQ ID NO: 82), и кроме того добавляли биотин для биотинилирования Fc IgA человека. Клетки, трансфицированные по методикам, описанным выше, культивировали при 37°C в течение 6 сут в атмосфере 8% CO₂, при этом требуемый белок секретировался в культуральный супернатант.

Раствор, содержащий клеточную культуру и содержащий требуемый Fc IgA человека, фильтровали через фильтр, размещаемый на горлышке флакона, с диаметром пор 0,22 мкм, при этом получали культуральный супернатант. Культуральный супернатант разбавляли 20 mM Трис-HCl (pH 7,4), наносили на

колонку HiTrap Q HP (фирмы GE Healthcare Japan Corp.), уравновешенную 20 mM Трис-HCl (pH 7,4), затем элюировали требуемый Fc IgA человека в градиенте NaCl. Затем элюат с колонки HiTrap Q HP разбавляли 50 mM Трис-HCl (pH 8,0) и наносили на колонку SoftLink Avidin column (фирмы Promega Corp.), уравновешенную 50 mM Трис-HCl (pH 8,0), затем требуемый Fc IgA человека элюировали 5 mM биотином, 150 mM NaCl и 50 mM Трис-HCl (pH 8,0). Затем ассоциаты (нежелательные примеси) удаляли гель-фильтрацией, используя Superdex 200 (фирмы GE Healthcare Japan Corp.) и после замены буферного раствора на раствор 20 mM гистидин-HCl и 150 mM NaCl (pH 6,0) получали очищенные Fc IgA человека.

Промышленная применимость

Настоящее изобретение может повысить активность антигенсвязывающих молекул и обеспечивает получение полипептида, который позволяет исключить сшивку различных клеток в результате связывания с антигенами, экспрессируемыми различными клетками, что, как известно, является причиной отрицательных реакций, причем указанные антигенсвязывающие молекулы можно использовать в качестве лекарственного средства.

Перечень последовательностей

```

<110>  ЧУГАИ СЕИЯКУ КАБУШИКИ КАИША
<120>  АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩАЯ МОЛЕКУЛА, СОДЕРЖАЩАЯ ВАРИАБЕЛЬНУЮ
        ОБЛАСТЬ АНТИТЕЛА
<130>  C1-A1309P
<140>  PCT/JP2014/079785
<141>  2014-11-11
<150>  JP 2013-232803
<151>  2013-11-11
<160>  93
<170>  PatentIn версия 3.5
<210>  1
<211>  330
<212>  БЕЛОК
<213>  Homo sapiens
<400>  1
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1          5          10          15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20        25        30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35        40        45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50        55        60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65        70        75        80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85        90        95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100       105       110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115       120       125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130       135       140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145       150       155       160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165       170       175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180       185       190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195       200       205

```

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330
 <210> 2
 <211> 326
 <212> EEF1OK
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

145 150 155 160
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

 <210> 3
 <211> 377
 <212> EELOK
 <213> Homo sapiens

 <400> 3
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro
 100 105 110
 Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg
 115 120 125
 Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys
 130 135 140
 Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro
 145 150 155 160
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 165 170 175
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 180 185 190
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
 195 200 205
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 210 215 220
 Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 225 230 235 240
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 245 250 255
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
 260 265 270
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 275 280 285
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 290 295 300
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 305 310 315 320
 Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 325 330 335
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
 340 345 350
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
 355 360 365
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 370 375
 <210> 4
 <211> 327
 <212> BEJOK
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 260 265 270
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 275 280 285
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 325

<210> 5
 <211> 4
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 5

Gly Gly Gly Ser
 1

<210> 6
 <211> 4
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 6

Ser Gly Gly Gly
 1

<210> 7
 <211> 5
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 7

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 8
 <211> 5
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 8

Ser Gly Gly Gly Gly
 1 5

<210> 9
 <211> 6
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 9

Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 10
<211> 6
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
<400> 10

Ser Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

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

<220>
<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
<400> 11

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 12
<211> 7
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
<400> 12

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 13
<211> 122
<212> БЕЛОК
<213> Rattus norvegicus

<400> 13

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr

85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp
100 105 110

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

<210> 14
<211> 112
<212> EEJOK
<213> Rattus norvegicus

<400> 14

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

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

Asn Gly Asn Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Ile Gln Lys Pro Ser Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ile Ser
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 Val Glu Pro Asp Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly
85 90 95

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

<210> 15
<211> 119
<212> EEJOK
<213> Mus musculus

<400> 15

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 16
<211> 107
<212> БЕЛОК
<213> Mus musculus

<400> 16

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

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

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 17
<211> 447
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 17

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
20 25 30

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

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
50 55 60

Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 <210> 18
 <211> 447
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 18
 Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
 65 70 75 80
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Lys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 <210> 19
 <211> 447
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 19
 Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30

Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
 65 70 75 80
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

340 345 350
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445
 <210> 20
 <211> 445
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 20
 Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30
 Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ser Ser Ala Ser Thr
 100 105 110
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 115 120 125
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 130 135 140
 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 145 150 155 160

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 180 185 190
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 195 200 205
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 210 215 220
 Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 225 230 235 240
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 245 250 255
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 260 265 270
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 275 280 285
 Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 290 295 300
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
 305 310 315 320
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 325 330 335
 Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
 340 345 350
 Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 355 360 365
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 370 375 380
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 385 390 395 400
 Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 405 410 415
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys Ser
 420 425 430
 Leu Ser Leu Ser Pro His His His His His His His His
 435 440 445
 <210> 21
 <211> 226
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 21
 Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
 65 70 75 80
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val
 130 135 140
 Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp
 145 150 155 160
 Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr
 165 170 175
 Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr
 180 185 190
 Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val
 195 200 205
 Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly
 210 215 220
 Glu Cys
 225
 <210> 22
 <211> 458
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 22

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Ser Leu Val Gln Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Asn
 65 70 75 80
 Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
 225 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr
 290 295 300

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 450 455
 <210> 23
 <211> 219
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 23
 Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Val Ser Met Ser Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Gln Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Asn
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Ile Gln Lys Pro Ser Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ile Ser
 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 Val Glu Pro Asp Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly
 85 90 95
 Thr Gln Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 24
 <211> 462
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 24
 Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Ser Leu Val Gln Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gln Ile Lys Ala Gly Cys Arg Gly Asp Cys Leu Asn Tyr Ala Thr
 50 55 60
 Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp
 65 70 75 80
 Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu Glu Asp
 85 90 95
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 130 135 140

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 145 150 155 160
 Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175
 His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190
 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 195 200 205
 Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 210 215 220
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 225 230 235 240
 Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 260 265 270
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315 320
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr
 355 360 365
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
 405 410 415
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

450 455 460

<210> 25
 <211> 462
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 25

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30

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

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

Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp
 65 70 75 80

Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu Glu Asp
 85 90 95

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly
 100 105 110

Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125

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

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

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 165 170 175

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 180 185 190

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 195 200 205

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 210 215 220

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 225 230 235 240

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255

042507

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 260 265 270
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 275 280 285
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300
 Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 305 310 315 320
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 325 330 335
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 340 345 350
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr
 355 360 365
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 370 375 380
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 385 390 395 400
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
 405 410 415
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 420 425 430
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 435 440 445
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 450 455 460
 <210> 26
 <211> 465
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 26
 Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Ser Leu Val Gln Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gln Ile Lys Ala Gly Cys Arg Gly Asp Cys Leu Lys Ser Asn Asn

042507

50	55	60
Tyr 65	Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys 70	Gly Arg Phe Thr Ile Ser 75 80
Arg Asp Asp Ser Lys 85	Ser Asn Ile Tyr 90	Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys 95
Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala 100 105 110		
Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser 115 120 125		
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser 130 135 140		
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp 145 150 155 160		
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr 165 170 175		
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr 180 185 190		
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln 195 200 205		
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp 210 215 220		
Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro 225 230 235 240		
Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro 245 250 255		
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr 260 265 270		
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn 275 280 285		
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg 290 295 300		
Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val 305 310 315 320		
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser 325 330 335		
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys 340 345 350		
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys 355 360 365		

042507

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
 370 375 380
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 405 410 415
 Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 420 425 430
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
 450 455 460
 Lys
 465
 <210> 27
 <211> 465
 <212> БЕЛЮК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 27
 Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Ser Leu Val Gln Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gln Ile Lys Ala Lys Gly Cys Arg Gly Asp Cys Leu Ser Asn Asn
 50 55 60
 Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Arg Asp Asp Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
 85 90 95
 Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala
 100 105 110
 Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 115 120 125
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 130 135 140

042507

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 145 150 155 160
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 165 170 175
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 195 200 205
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220
 Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 225 230 235 240
 Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 245 250 255
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 260 265 270
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 290 295 300
 Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
 370 375 380
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 405 410 415
 Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 420 425 430
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp

450
 Lys
 465

 <210> 28
 <211> 465
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

 <400> 28

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

 Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30

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

 Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60

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

 Cys Leu Asp Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys
 85 90 95

 Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala
 100 105 110

 Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 115 120 125

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

 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 145 150 155 160

 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 165 170 175

 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 180 185 190

 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 195 200 205

 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220

 Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 225 230 235 240

Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 245 250 255
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 260 265 270
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 290 295 300
 Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
 370 375 380
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 405 410 415
 Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 420 425 430
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
 450 455 460
 Lys
 465
 <210> 29
 <211> 463
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 29
 Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Ser Leu Val Gln Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala

042507

20										25					30															
Trp	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Glu	Lys	Gln	Leu	Glu	Trp	Val															
		35					40					45																		
Ala	Gln	Ile	Lys	Ala	Gly	Cys	Arg	Gly	Asp	Cys	Leu	Asn	Asn	Tyr	Ala															
		50				55					60																			
Thr	Tyr	Tyr	Ala	Glu	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp															
		65			70					75					80															
Asp	Ser	Lys	Ser	Asn	Ile	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Lys	Glu	Glu															
				85					90					95																
Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Arg	Tyr	Val	His	Tyr	Gly	Ala	Tyr	Tyr															
			100					105					110																	
Gly	Val	Asp	Ala	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala															
		115				120						125																		
Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser															
		130				135					140																			
Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe															
		145			150				155					160																
Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly															
				165				170					175																	
Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu															
			180					185					190																	
Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr															
		195				200						205																		
Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys															
		210				215					220																			
Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro															
		225			230					235				240																
Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys															
				245					250				255																	
Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val															
				260				265					270																	
Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr															
		275					280					285																		
Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu															
		290				295					300																			
Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His															
		305			310					315				320																
Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys															
			325						330					335																

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu
355 360 365

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro
370 375 380

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
385 390 395 400

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

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
420 425 430

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
435 440 445

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

<210> 30
<211> 465
<212> БЕЛЮК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 30

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asp Cys Leu Ala
100 105 110

Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 130 135 140
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 145 150 155 160
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 165 170 175
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 195 200 205
 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220
 Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 225 230 235 240
 Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 245 250 255
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 260 265 270
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 275 280 285
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 290 295 300
 Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 305 310 315 320
 Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 325 330 335
 Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 340 345 350
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys
 355 360 365
 Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
 370 375 380
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 385 390 395 400
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 405 410 415
 Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 420 425 430
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

435 440 445
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
 450 455 460

 Lys
 465

 <210> 31
 <211> 465
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

 <400> 31
 Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Ser Leu Val Gln Pro Gly Lys
 1 5 10 15

 Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30

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

 Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60

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

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

 Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Gly Cys Arg Gly Asp Cys Leu
 100 105 110

 Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 115 120 125

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

 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 145 150 155 160

 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 165 170 175

 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 180 185 190

 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 195 200 205

 Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 210 215 220

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

<210> 32
 <211> 465
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 32

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

042507

1	5	10	15
Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala	20	25	30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val	35	40	45
Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu	50	55	60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Asn	65	70	75
Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr	85	90	95
Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Gly Cys Arg Gly Asp Cys	100	105	110
Leu Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser	115	120	125
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser	130	135	140
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp	145	150	155
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr	165	170	175
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr	180	185	190
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln	195	200	205
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp	210	215	220
Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro	225	230	235
Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro	245	250	255
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr	260	265	270
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn	275	280	285
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg	290	295	300
Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val	305	310	315
			320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
325 330 335

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
340 345 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys
355 360 365

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe
370 375 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
385 390 395 400

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
405 410 415

Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
420 425 430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
450 455 460

Lys
465

<210> 33
<211> 444
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
<400> 33

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30

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

Gly Arg Ile Asp Pro Leu Arg Lys Gln Thr Lys Tyr Arg Glu Lys Phe
50 55 60

Glu Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Val Arg Ser Gly Arg Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Tyr Gln Trp Gly Pro Met Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Asp Glu Glu Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ala Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440
 <210> 34
 <211> 444
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 34
 Gln Asp Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Leu Arg Lys Gln Thr Lys Tyr Arg Glu Lys Phe
 50 55 60
 Glu Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Arg Ser Gly Arg Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Glu Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Asp Ala Leu Pro Met Pro Ile Glu Glu Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440
 <210> 35
 <211> 213
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 35
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile His Lys Tyr
 20 25 30
 Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

042507

35 40 45

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Glu Gln Leu Arg Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180 185 190

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 36
<211> 22
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
<400> 36

Arg Trp Gly Tyr His Leu Arg Asp Arg Lys Tyr Lys Gly Val Arg Ser
1 5 10 15

His Lys Gly Val Pro Arg
20

<210> 37
<211> 480
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
<400> 37

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Ser Leu Val Gln Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gln Ile Lys Ala Lys Arg Trp Gly Tyr His Leu Arg Asp Arg Lys
 50 55 60
 Tyr Lys Gly Val Arg Ser His Lys Gly Val Pro Arg Ser Asn Asn Tyr
 65 70 75 80
 Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 85 90 95
 Asp Asp Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu
 100 105 110
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr
 115 120 125
 Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 145 150 155 160
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 165 170 175
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 180 185 190
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 195 200 205
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 210 215 220
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 225 230 235 240
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 245 250 255
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 260 265 270
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 275 280 285
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 290 295 300
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

042507

[illegible]

<210>	38
<211>	482
<212>	БЛОК
<213>	Искусственная последовательность

<220>
<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 38

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Cys Arg Trp Gly Tyr His Leu Arg Asp Arg
50 55 60

Lys Tyr Lys Gly Val Arg Ser His Lys Gly Val Pro Arg Cys Ser Asn
65 70 75 80

Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 100 105 110
 Lys Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly
 115 120 125
 Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
 130 135 140
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 145 150 155 160
 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 165 170 175
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 180 185 190
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 195 200 205
 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 210 215 220
 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 225 230 235 240
 Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 245 250 255
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 260 265 270
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 275 280 285
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 290 295 300
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 305 310 315 320
 Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 325 330 335
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 340 345 350
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 355 360 365
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 370 375 380
 Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly
 385 390 395 400

042507

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
405 410 415

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
420 425 430

Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
435 440 445

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
450 455 460

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
465 470 475 480

Asp Lys

<210> 39
<211> 480
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 39

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Arg Trp Gly Tyr His
65 70 75 80

Leu Arg Asp Arg Lys Tyr Lys Gly Val Arg Ser His Lys Gly Val Pro
85 90 95

Arg Asp Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu
100 105 110

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr
115 120 125

Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
130 135 140

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
145 150 155 160

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
165 170 175

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 180 185 190
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 195 200 205
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 210 215 220
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 225 230 235 240
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 245 250 255
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 260 265 270
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 275 280 285
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 290 295 300
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 305 310 315 320
 Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 325 330 335
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 340 345 350
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 355 360 365
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
 370 375 380
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
 385 390 395 400
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 405 410 415
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 420 425 430
 Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 435 440 445
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 450 455 460
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 465 470 475 480

<210> 40
 <211> 482
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 40

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Cys Arg Trp Gly Tyr
 65 70 75 80

His Leu Arg Asp Arg Lys Tyr Lys Gly Val Arg Ser His Lys Gly Val
 85 90 95

Pro Arg Cys Asp Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
 100 105 110

Lys Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly
 115 120 125

Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val
 130 135 140

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 145 150 155 160

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 165 170 175

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
 180 185 190

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 195 200 205

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
 210 215 220

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
 225 230 235 240

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 245 250 255

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe

042507

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

Asp Lys

<210> 41
 <211> 477
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 41

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

Ser	Leu	Lys	Leu	Thr	Cys	Ala	Thr	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asn	Ala
			20					25					30		

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Asn
 65 70 75 80
 Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 225 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Glu Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Asp Ala Leu Pro Met Pro
 325 330 335

Ile Glu Glu Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Arg Trp Gly Tyr His Leu Arg Asp Arg
 450 455 460
 Lys Tyr Lys Gly Val Arg Ser His Lys Gly Val Pro Arg
 465 470 475
 <210> 42
 <211> 479
 <212> БЕЛЮК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 42
 Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Ser Leu Val Gln Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Asn
 65 70 75 80
 Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125

042507

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

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

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

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

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
195 200 205

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
210 215 220

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
225 230 235 240

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

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Glu Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
275 280 285

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

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315 320

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Asp Ala Leu Pro Met Pro
325 330 335

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

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
355 360 365

Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
370 375 380

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly Gly Gly Gly Ser Cys Arg Trp Gly Tyr His Leu Arg Asp
450 455 460

Arg Lys Tyr Lys Gly Val Arg Ser His Lys Gly Val Pro Arg Cys
465 470 475

<210> 43
<211> 461
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 43

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Gly Gly Ser Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
50 55 60

Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
65 70 75 80

Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu Glu Asp Thr
85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Val
100 105 110

Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

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

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

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

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu

042507

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

<210> 44
 <211> 464
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 44

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gln Ile Lys Ala Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asn Tyr
 50 55 60
 Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 65 70 75 80
 Asp Asp Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu
 85 90 95
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr
 100 105 110
 Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 130 135 140
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 145 150 155 160
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 165 170 175
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 180 185 190
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 195 200 205
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 210 215 220
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 225 230 235 240
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 245 250 255
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 260 265 270
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 275 280 285
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 290 295 300
 Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 305 310 315 320

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 325 330 335
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 340 345 350
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
 355 360 365
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
 370 375 380
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 385 390 395 400
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 405 410 415
 Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 420 425 430
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 435 440 445
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 450 455 460
 <210> 45
 <211> 467
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 45
 Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Ser Leu Val Gln Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gln Ile Lys Ala Lys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ser
 50 55 60
 Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 85 90 95
 Leu Lys Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr
 100 105 110
 Gly Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 115 120 125

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 130 135 140
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 145 150 155 160
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 165 170 175
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 180 185 190
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 195 200 205
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 210 215 220
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 225 230 235 240
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 245 250 255
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 260 265 270
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 275 280 285
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 290 295 300
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 305 310 315 320
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 325 330 335
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 340 345 350
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 355 360 365
 Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys
 370 375 380
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 385 390 395 400
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 405 410 415
 Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 420 425 430

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 435 440 445

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp
 450 455 460

Asp Asp Lys
 465

<210> 46
 <211> 461
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 46

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60

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

Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu Glu Asp Thr
 85 90 95

Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Val
 100 105 110

Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 115 120 125

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

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

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

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu

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

<210> 47
 <211> 464
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 47

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

042507

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

Ser Asp Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu
85 90 95

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr
100 105 110

Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145 150 155 160

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
180 185 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
195 200 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
210 215 220

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225 230 235 240

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
245 250 255

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
275 280 285

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
290 295 300

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305 310 315 320

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 325 330 335
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 340 345 350
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
 355 360 365
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
 370 375 380
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 385 390 395 400
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 405 410 415
 Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 420 425 430
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 435 440 445
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 450 455 460
 <210> 48
 <211> 467
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Ser Leu Val Gln Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Gly Ser Gly Gly
 65 70 75 80
 Ser Gly Gly Ser Asp Ser Lys Ser Asn Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser
 85 90 95
 Leu Lys Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr
 100 105 110
 Gly Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 115 120 125

042507

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
145 150 155 160

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
165 170 175

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
180 185 190

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
195 200 205

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
210 215 220

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
225 230 235 240

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
245 250 255

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
260 265 270

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
275 280 285

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
290 295 300

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
305 310 315 320

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
325 330 335

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
340 345 350

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
355 360 365

Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys
370 375 380

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
385 390 395 400

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
405 410 415

Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
420 425 430

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 435 440 445

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp
 450 455 460

Asp Asp Lys
 465

<210> 49
 <211> 461
 <212> БЕЛЮК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 49

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

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Gly Gly Ser Tyr Tyr Gly Val
 100 105 110

Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 115 120 125

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

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

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

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu

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

<210> 50
 <211> 464
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 50

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

042507

Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Tyr
100 105 110

Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145 150 155 160

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
180 185 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
195 200 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
210 215 220

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225 230 235 240

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
245 250 255

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
275 280 285

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
290 295 300

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305 310 315 320

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 325 330 335
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 340 345 350
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
 355 360 365
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
 370 375 380
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 385 390 395 400
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 405 410 415
 Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 420 425 430
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 435 440 445
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 450 455 460
 <210> 51
 <211> 467
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 51
 Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Ser Leu Val Gln Pro Gly Lys
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Thr Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gln Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Asn
 65 70 75 80
 Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Glu Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly
 100 105 110
 Gly Ser Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 115 120 125

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
 130 135 140
 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 145 150 155 160
 Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 165 170 175
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 180 185 190
 Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 195 200 205
 Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 210 215 220
 Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
 225 230 235 240
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 245 250 255
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 260 265 270
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 275 280 285
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 290 295 300
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 305 310 315 320
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 325 330 335
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 340 345 350
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 355 360 365
 Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys
 370 375 380
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 385 390 395 400
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 405 410 415
 Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 420 425 430

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 435 440 445

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp
 450 455 460

Asp Asp Lys
 465

<210> 52
 <211> 122
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 52

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

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

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

Ala Gln Ile Lys Ala Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp
 100 105 110

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

<210> 53
 <211> 112
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 53

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 Val His Ser
 20 25 30

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

042507

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

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

<210> 54
<211> 336
<212> БЕЛЮК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 54

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

042507

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

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

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
325 330 335

<210> 55
<211> 107
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 55

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 56
<211> 230
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 56
 Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 65 70 75 80
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125
 Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
 130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 225 230
 <210> 57
 <211> 449
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 57
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln

042507

1	5					10					15				
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Asp
			20					25					30		
His	Ala	Trp	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp
		35					40					45			
Ile	Gly	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Thr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu
	50				55						60				
Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Met	Leu	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser
65					70					75				80	
Leu	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly
			100					105					110		
Ser	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
		115					120					125			
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
	130					135					140				
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
145					150					155					160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
				165					170					175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
			180					185					190		
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
		195					200					205			
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
	210					215					220				
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
225					230					235					240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
				245					250					255	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
			260					265					270		
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
		275					280					285			
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
	290					295					300				
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
305					310					315					320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

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

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 58
<211> 214
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 58

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

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

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

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 59
<211> 458
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 59

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

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

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Ala Ala Tyr Tyr Gly Val Asp Ala Trp
100 105 110

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

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

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

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 210 215 220
 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
 225 230 235 240
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 245 250 255
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 275 280 285
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr
 290 295 300
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 305 310 315 320
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 325 330 335
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 340 345 350
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 355 360 365
 Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 450 455

<210> 60
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 60

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr
 1 5 10 15

<210> 61
 <211> 467
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 61

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

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

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Gly Asn Gly Tyr Asn Ala Tyr Tyr Ala Pro
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Thr Thr Ser Tyr Phe Gly Leu Phe Gly
 100 105 110

Gly Gly Gly Gly Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 115 120 125

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 145 150 155 160

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 165 170 175

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 180 185 190

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 195 200 205

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

<210> 62
 <211> 467
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 62

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

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

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Gly Asn Gly Tyr Asn Ala Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Thr Thr Ser Tyr Phe Gly Leu Phe Gly
100 105 110

Gly Gly Gly Gly Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
115 120 125

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
145 150 155 160

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
165 170 175

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
180 185 190

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
195 200 205

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
210 215 220

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
225 230 235 240

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
245 250 255

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
260 265 270

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
275 280 285

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys

290 295 300
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 305 310 315 320
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 325 330 335
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 340 345 350
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 355 360 365
 Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys
 370 375 380
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 385 390 395 400
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 405 410 415
 Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 420 425 430
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 435 440 445
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp
 450 455 460
 Asp Asp Lys
 465
 <210> 63
 <211> 464
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 63
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gln Ile Lys Asp Lys Gly Gln Gln Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Pro
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80

Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gln Thr Tyr Ser Asp Gly Ser Phe Tyr
 100 105 110
 Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 130 135 140
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 145 150 155 160
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 165 170 175
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 180 185 190
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 195 200 205
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 210 215 220
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 225 230 235 240
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 245 250 255
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 260 265 270
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 275 280 285
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 290 295 300
 Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 305 310 315 320
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 325 330 335
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 340 345 350
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
 355 360 365
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
 370 375 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
405 410 415

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

<210> 64
<211> 464
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 64

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

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

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Val Asn Gln Tyr Ala Asn Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Leu Thr Gly Tyr Phe Ser Gly Gln
100 105 110

Gly Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145 150 155 160

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
180 185 190

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

<210> 65
 <211> 464
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 65

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

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

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Val Asn Gln Tyr Ala Asn Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Leu Thr Gly Tyr Phe Ser Gly Gln
 100 105 110

Gly Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 145 150 155 160

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 180 185 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 195 200 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 210 215 220

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 225 230 235 240

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 245 250 255

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 275 280 285

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

60

290 295 300
 Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 305 310 315 320
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 325 330 335
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 340 345 350
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
 355 360 365
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
 370 375 380
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 385 390 395 400
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 405 410 415
 Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 420 425 430
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 435 440 445
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 450 455 460

 <210> 66
 <211> 464
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

 <400> 66
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Asn Ala
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gln Ile Lys Asp Arg Val Asn Gln Tyr Ala Asn Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Leu Thr Gly Tyr Phe Ser Gly Gln
 100 105 110
 Gly Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 130 135 140
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 145 150 155 160
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 165 170 175
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 180 185 190
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 195 200 205
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 210 215 220
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 225 230 235 240
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 245 250 255
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 260 265 270
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 275 280 285
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 290 295 300
 Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 305 310 315 320
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 325 330 335
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 340 345 350
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
 355 360 365
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
 370 375 380
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 385 390 395 400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 405 410 415
 Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 420 425 430
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 435 440 445
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 450 455 460
 <210> 67
 <211> 464
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 67
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gln Ile Lys Asp Arg Val Asn Gln Tyr Ala Asn Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Cys Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Leu Thr Gly Tyr Phe Ser Gly Gln
 100 105 110
 Gly Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 130 135 140
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 145 150 155 160
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 165 170 175
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 180 185 190
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 195 200 205

042507

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 210 215 220
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 225 230 240
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 245 250 255
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 260 265 270
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 275 280 285
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 290 295 300
 Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 305 310 315 320
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 325 330 335
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 340 345 350
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
 355 360 365
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
 370 375 380
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 385 390 395 400
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 405 410 415
 Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 420 425 430
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 435 440 445
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 450 455 460
 <210> 68
 <211> 464
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 68

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ala
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gln Ile Lys Asp Lys Gln Asn Gln Tyr Asn Ala Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Ala Thr Ser Asp Gly Phe Leu Pro Tyr
 100 105 110
 Phe Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 130 135 140
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 145 150 155 160
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 165 170 175
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 180 185 190
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 195 200 205
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 210 215 220
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 225 230 235 240
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 245 250 255
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 260 265 270
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 275 280 285
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 290 295 300
 Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

042507

305						310						315					320
His	Gln	Asp	Trp	Leu 325	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr 330	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn 335		
Lys	Ala	Leu	Pro 340	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys 345	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala 350	Lys	Gly		
Gln	Pro	Arg 355	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr 360	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser 365	Arg	Cys	Glu		
Leu	Thr 370	Lys	Asn	Gln	Val	Ser 375	Leu	Ser	Cys	Ala	Val 380	Lys	Gly	Phe	Tyr		
Pro 385	Ser	Asp	Ile	Ala	Val 390	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn 395	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn 400		
Asn	Tyr	Lys	Thr 405	Pro	Pro	Val	Leu	Asp 410	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe 415	Phe			
Leu	Val	Ser	Lys 420	Leu	Thr	Val	Asp	Lys 425	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln 430	Gly	Asn		
Val	Phe	Ser 435	Cys	Ser	Val	Met	His 440	Glu	Ala	Leu	His	Asn 445	His	Tyr	Thr		
Gln	Lys 450	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser 455	Pro	Asp	Tyr	Lys	Asp 460	Asp	Asp	Asp	Lys		
<210>	69																
<211>	464																
<212>	БЕЛОК																
<213>	Искусственная последовательность																
<220>																	
<223>	Искусственно синтезированная пептидная последовательность																
<400>	69																
Gln 1	Val	Gln	Leu 5	Val	Glu	Ser	Gly	Gly 10	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly 15	Arg		
Ser	Leu	Arg	Leu 20	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser 25	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser 30	Asn	Ala		
Trp	Met	His 35	Trp	Val	Arg	Gln 40	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly 45	Leu	Glu	Trp	Val		
Ala	Gln 50	Ile	Lys	Asp	Arg	Ala 55	Ser	Gly	Tyr	Asn 60	Asn	Tyr	Tyr	Ala	Glu		
Ser 65	Val	Lys	Gly	Arg 70	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg 75	Asp	Asp	Ser	Lys	Asn 80	Ser		
Ile	Tyr	Leu	Gln	Met 85	Asn	Ser	Leu	Lys 90	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Val 95	Tyr		
Tyr	Cys	Arg	Tyr 100	Val	His	Tyr	Ala	Gln 105	Ser	Val	Ser	Ala	Phe 110	Phe	Gln		

Tyr Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 130 135 140
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 145 150 155 160
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 165 170 175
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 180 185 190
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 195 200 205
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 210 215 220
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 225 230 235 240
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 245 250 255
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 260 265 270
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 275 280 285
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 290 295 300
 Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 305 310 315 320
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 325 330 335
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 340 345 350
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
 355 360 365
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
 370 375 380
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 385 390 395 400
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 405 410 415

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

<210> 70
<211> 464
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 70

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

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

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

Ala Gln Ile Lys Asp Lys Gln Ser Gln Tyr Ala Asn Tyr Tyr Ala Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gln Ser Thr Ser Tyr Ser Phe Tyr Gln
100 105 110

Gly Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145 150 155 160

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
180 185 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
195 200 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
210 215 220

042507

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 225 230 235 240
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 245 250 255
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 260 265 270
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 275 280 285
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 290 295 300
 Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 305 310 315 320
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 325 330 335
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 340 345 350
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
 355 360 365
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
 370 375 380
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 385 390 395 400
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 405 410 415
 Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 420 425 430
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 435 440 445
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 450 455 460
 <210> 71
 <211> 464
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 71
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gln Ile Lys Asp Lys Gln Ser Gln Tyr Ala Asn Tyr Tyr Ala Pro
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
 65 70 75 80
 Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gln Ser Thr Ser Tyr Ser Phe Tyr Gln
 100 105 110
 Gly Gly Val Asp Ala Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 130 135 140
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 145 150 155 160
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 165 170 175
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 180 185 190
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 195 200 205
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 210 215 220
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 225 230 235 240
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 245 250 255
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 260 265 270
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 275 280 285
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 290 295 300
 Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 305 310 315 320
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

325 330 335
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 340 345 350
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
 355 360 365
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
 370 375 380
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 385 390 395 400
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 405 410 415
 Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 420 425 430
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 435 440 445
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 450 455 460
 <210> 72
 <211> 464
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 72
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gln Ile Lys Asp Arg Gly Asn Asn Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ser Tyr Phe Phe Ala Ser Phe Tyr
 100 105 110
 Phe Gly Val Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 130 135 140
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 145 150 155 160
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 165 170 175
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 180 185 190
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 195 200 205
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 210 215 220
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 225 230 235 240
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 245 250 255
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 260 265 270
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 275 280 285
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 290 295 300
 Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 305 310 315 320
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 325 330 335
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 340 345 350
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
 355 360 365
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
 370 375 380
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 385 390 395 400
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 405 410 415
 Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

<210> 73
<211> 464
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 73

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

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

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Gly Asn Asn Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ser Tyr Phe Phe Ala Ser Phe Tyr
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145 150 155 160

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
180 185 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
195 200 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
210 215 220

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225 230 235 240

042507

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
245 250 255

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
275 280 285

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
290 295 300

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305 310 315 320

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
325 330 335

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
340 345 350

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
355 360 365

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
370 375 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
405 410 415

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

<210> 74
<211> 464
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 74

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

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

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gln Ile Lys Asp Arg Gly Asn Asn Tyr Asn Thr Tyr Tyr Ala Pro
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ser Tyr Phe Phe Ser Gly Ser Ser
 100 105 110
 Phe Gly Val Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 130 135 140
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 145 150 155 160
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 165 170 175
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 180 185 190
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 195 200 205
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 210 215 220
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 225 230 235 240
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 245 250 255
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 260 265 270
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 275 280 285
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 290 295 300
 Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 305 310 315 320
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 325 330 335
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

340 345 350
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
 355 360 365
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
 370 375 380
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 385 390 395 400
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 405 410 415
 Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 420 425 430
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 435 440 445
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 450 455 460
 <210> 75
 <211> 464
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность
 <400> 75
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gln Ile Lys Asp Arg Gly Asn Asn Tyr Asn Thr Tyr Tyr Ala Pro
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Ile Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Arg Tyr Ala His Tyr Gly Ser Tyr Phe Phe Ser Gly Ser Ser
 100 105 110
 Phe Gly Val Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 130 135 140

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 145 150 155 160
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 165 170 175
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 180 185 190
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 195 200 205
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 210 215 220
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 225 230 235 240
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 245 250 255
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 260 265 270
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 275 280 285
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 290 295 300
 Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 305 310 315 320
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 325 330 335
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 340 345 350
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
 355 360 365
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
 370 375 380
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 385 390 395 400
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 405 410 415
 Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 420 425 430
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 450 455 460

<210> 76
 <211> 464
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 76

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

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

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

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

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

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

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Thr Tyr Phe Phe Ala Leu Pro Ala
 100 105 110

Phe Gly Val Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 145 150 155 160

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 180 185 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 195 200 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 210 215 220

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 225 230 235 240

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 245 250 255

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
275 280 285

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
290 295 300

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305 310 315 320

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
325 330 335

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
340 345 350

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
355 360 365

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
370 375 380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385 390 395 400

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
405 410 415

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
420 425 430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435 440 445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450 455 460

<210> 77

<211> 464

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 77

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

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

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

042507

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

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

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

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Thr Tyr Phe Phe Ala Leu Pro Ala
100 105 110

Phe Gly Val Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145 150 155 160

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

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
180 185 190

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
195 200 205

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
210 215 220

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
225 230 235 240

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
245 250 255

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

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
275 280 285

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
290 295 300

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
305 310 315 320

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
325 330 335

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
340 345 350

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu

```

355              360              365
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
370              375              380

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
385              390              395

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
405              410              415

Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
420              425              430

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
435              440              445

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
450              455              460

<210> 78
<211> 464
<212> БЕЛОК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 78
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1              5              10              15

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

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

Ala Gln Ile Lys Asp Arg Gly Asn Asn Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ala Glu
50              55              60

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

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

Tyr Cys Arg Tyr Val His Tyr Gly Ser Tyr Phe Phe Ala Ser Phe Tyr
100             105             110

Phe Gly Val Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Ala Val Thr Val Ser Ser
115             120             125

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
145             150             155             160

```

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 165 170 175
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 180 185 190
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 195 200 205
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 210 215 220
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 225 230 235 240
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 245 250 255
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 260 265 270
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 275 280 285
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 290 295 300
 Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 305 310 315 320
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 325 330 335
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 340 345 350
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu
 355 360 365
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr
 370 375 380
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 385 390 395 400
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 405 410 415
 Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 420 425 430
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 435 440 445
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 450 455 460

<210> 79
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 79

Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
 1 5 10 15

<210> 80
 <211> 233
 <212> БЕЛОК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 80

Cys His Pro Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Gly Ser Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg Asp
 20 25 30

Ala Ser Gly Val Thr Phe Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser Ala
 35 40 45

Val Gln Gly Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val Ser
 50 55 60

Ser Val Leu Pro Gly Cys Ala Glu Pro Trp Asn His Gly Lys Thr Phe
 65 70 75 80

Thr Cys Thr Ala Ala Tyr Pro Glu Ser Lys Thr Pro Leu Thr Ala Thr
 85 90 95

Leu Ser Lys Ser Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro
 100 105 110

Pro Pro Ser Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys
 115 120 125

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

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

Gln Glu Pro Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu
 165 170 175

Arg Val Ala Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met
 180 185 190

Val Gly His Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp
 195 200 205

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

Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu
 225 230

<210> 81
 <211> 641
 <212> EELTK
 <213> Human herpesvirus 4
 <400> 81

Met Ser Asp Glu Gly Pro Gly Thr Gly Pro Gly Asn Gly Leu Gly Glu
 1 5 10 15

Lys Gly Asp Thr Ser Gly Pro Glu Gly Ser Gly Gly Ser Gly Pro Gln
 20 25 30

Arg Arg Gly Gly Asp Asn His Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly Arg Gly
 35 40 45

Arg Gly Gly Gly Arg Pro Gly Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ser Gly Pro
 50 55 60

Arg His Arg Asp Gly Val Arg Arg Pro Gln Lys Arg Pro Ser Cys Ile
 65 70 75 80

Gly Cys Lys Gly Thr His Gly Gly Thr Gly Ala Gly Ala Gly Ala Gly
 85 90 95

Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly
 100 105 110

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly
 115 120 125

Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala
 130 135 140

Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly
 145 150 155 160

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly
 165 170 175

Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly
 180 185 190

Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly
 195 200 205

Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Gly Ala
 210 215 220

Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala
 225 230 235 240

Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Ala Gly

245										250										255									
Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly											
			260						265								270												
Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly												
		275						280						285															
Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly													
	290					295							300																
Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Ala	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Gly											
305					310						315							320											
Gly	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly														
				325					330					335															
Arg	Gly	Arg	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly														
			340					345					350																
Arg	Arg	Gly	Arg	Gly	Arg	Glu	Arg	Ala	Arg	Gly	Gly	Ser	Arg	Glu	Arg														
		355					360					365																	
Ala	Arg	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Arg	Gly	Glu	Lys	Arg	Pro	Arg	Ser	Pro														
	370					375					380																		
Ser	Ser	Gln	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Pro	Pro	Arg	Arg	Pro	Pro	Pro														
	385				390					395					400														
Gly	Arg	Arg	Pro	Phe	Phe	His	Pro	Val	Gly	Glu	Ala	Asp	Tyr	Phe	Glu														
				405					410					415															
Tyr	His	Gln	Glu	Gly	Gly	Pro	Asp	Gly	Glu	Pro	Asp	Val	Pro	Pro	Gly														
			420					425					430																
Ala	Ile	Glu	Gln	Gly	Pro	Ala	Asp	Asp	Pro	Gly	Glu	Gly	Pro	Ser	Thr														
		435					440					445																	
Gly	Pro	Arg	Gly	Gln	Gly	Asp	Gly	Gly	Arg	Arg	Lys	Lys	Gly	Gly	Trp														
	450					455					460																		
Phe	Gly	Lys	His	Arg	Gly	Gln	Gly	Gly	Ser	Asn	Pro	Lys	Phe	Glu	Asn														
	465				470				475					480															
Ile	Ala	Glu	Gly	Leu	Arg	Ala	Leu	Leu	Ala	Arg	Ser	His	Val	Glu	Arg														
				485				490						495															
Thr	Thr	Asp	Glu	Gly	Thr	Trp	Val	Ala	Gly	Val	Phe	Val	Tyr	Gly	Gly														
			500					505					510																
Ser	Lys	Thr	Ser	Leu	Tyr	Asn	Leu	Arg	Arg	Gly	Thr	Ala	Leu	Ala	Ile														
		515				520					525																		
Pro	Gln	Cys	Arg	Leu	Thr	Pro	Leu	Ser	Arg	Leu	Pro	Phe	Gly	Met	Ala														
	530					535					540																		
Pro	Gly	Pro	Gly	Pro	Gln	Pro	Gly	Pro	Leu	Arg	Glu	Ser	Ile	Val	Cys														
545					550				555						560														

042507

Tyr Phe Met Val Phe Leu Gln Thr His Ile Phe Ala Glu Val Leu Lys
565 570 575

Asp Ala Ile Lys Asp Leu Val Met Thr Lys Pro Ala Pro Thr Cys Asn
580 585 590

Ile Arg Val Thr Val Cys Ser Phe Asp Asp Gly Val Asp Leu Pro Pro
595 600 605

Trp Phe Pro Pro Met Val Glu Gly Ala Ala Ala Glu Gly Asp Asp Gly
610 615 620

Asp Asp Gly Asp Glu Gly Gly Asp Gly Asp Glu Gly Glu Glu Gly Gln
625 630 635 640

Glu

<210> 82
<211> 321
<212> EEMOK
<213> Escherichia coli

<400> 82

Met Lys Asp Asn Thr Val Pro Leu Lys Leu Ile Ala Leu Leu Ala Asn
1 5 10 15

Gly Glu Phe His Ser Gly Glu Gln Leu Gly Glu Thr Leu Gly Met Ser
20 25 30

Arg Ala Ala Ile Asn Lys His Ile Gln Thr Leu Arg Asp Trp Gly Val
35 40 45

Asp Val Phe Thr Val Pro Gly Lys Gly Tyr Ser Leu Pro Glu Pro Ile
50 55 60

Gln Leu Leu Asn Ala Lys Gln Ile Leu Gly Gln Leu Asp Gly Gly Ser
65 70 75 80

Val Ala Val Leu Pro Val Ile Asp Ser Thr Asn Gln Tyr Leu Leu Asp
85 90 95

Arg Ile Gly Glu Leu Lys Ser Gly Asp Ala Cys Ile Ala Glu Tyr Gln
100 105 110

Gln Ala Gly Arg Gly Arg Arg Gly Arg Lys Trp Phe Ser Pro Phe Gly
115 120 125

Ala Asn Leu Tyr Leu Ser Met Phe Trp Arg Leu Glu Gln Gly Pro Ala
130 135 140

Ala Ala Ile Gly Leu Ser Leu Val Ile Gly Ile Val Met Ala Glu Val
145 150 155 160

Leu Arg Lys Leu Gly Ala Asp Lys Val Arg Val Lys Trp Pro Asn Asp
165 170 175

Leu Tyr Leu Gln Asp Arg Lys Leu Ala Gly Ile Leu Val Glu Leu Thr
 180 185 190
 Gly Lys Thr Gly Asp Ala Ala Gln Ile Val Ile Gly Ala Gly Ile Asn
 195 200 205
 Met Ala Met Arg Arg Val Glu Glu Ser Val Val Asn Gln Gly Trp Ile
 210 215 220
 Thr Leu Gln Glu Ala Gly Ile Asn Leu Asp Arg Asn Thr Leu Ala Ala
 225 230 235 240
 Met Leu Ile Arg Glu Leu Arg Ala Ala Leu Glu Leu Phe Glu Gln Glu
 245 250 255
 Gly Leu Ala Pro Tyr Leu Ser Arg Trp Glu Lys Leu Asp Asn Phe Ile
 260 265 270
 Asn Arg Pro Val Lys Leu Ile Ile Gly Asp Lys Glu Ile Phe Gly Ile
 275 280 285
 Ser Arg Gly Ile Asp Lys Gln Gly Ala Leu Leu Leu Glu Gln Asp Gly
 290 295 300
 Ile Ile Lys Pro Trp Met Gly Gly Glu Ile Ser Leu Arg Ser Ala Glu
 305 310 315 320

Lys

<210> 83
 <211> 549
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 83
 atggaacagg ggaagggcct ggctgtcctc atcctggcta tcattcttct tcaaggtact 60
 ttggcccagt caatcaaagg aaaccacttg gttaagggtg atgactatca agaagatggt 120
 tcggtacttc tgacttgtga tgcagaagcc aaaaatatca catgggttaa agatgggaag 180
 atgatcggtc tcctaactga agataaaaaa aatggaatc tgggaagtaa tgccaaggac 240
 cctcgaggga tgtatcagtg taaaggatca cagaacaagt caaaaccact ccaagtgtat 300
 tacagaatgt gtcagaactg cattgaacta aatgcagcca ccatactctgg ctttctcttt 360
 gctgaaatcg tcagcatttt cgtccttgct gttgggggtct acttcattgc tggacaggat 420
 ggagttcgcc agtcgagagc ttcagacaag cagactctgt tgcccaatga ccagctctac 480
 cagccctca aggatcgaga agatgaccag tacagccacc ttcaaggaaa ccagttgagg 540
 aggaattga 549

<210> 84
 <211> 182
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 84

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

042507

Leu Gln Gly Thr Leu Ala Gln Ser Ile Lys Gly Asn His Leu Val Lys
 20 25 30
 Val Tyr Asp Tyr Gln Glu Asp Gly Ser Val Leu Leu Thr Cys Asp Ala
 35 40 45
 Glu Ala Lys Asn Ile Thr Trp Phe Lys Asp Gly Lys Met Ile Gly Phe
 50 55 60
 Leu Thr Glu Asp Lys Lys Lys Trp Asn Leu Gly Ser Asn Ala Lys Asp
 65 70 75 80
 Pro Arg Gly Met Tyr Gln Cys Lys Gly Ser Gln Asn Lys Ser Lys Pro
 85 90 95
 Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala
 100 105 110
 Ala Thr Ile Ser Gly Phe Leu Phe Ala Glu Ile Val Ser Ile Phe Val
 115 120 125
 Leu Ala Val Gly Val Tyr Phe Ile Ala Gly Gln Asp Gly Val Arg Gln
 130 135 140
 Ser Arg Ala Ser Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr
 145 150 155 160
 Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly
 165 170 175
 Asn Gln Leu Arg Arg Asn
 180

<210> 85
 <211> 516
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens

<400> 85
 atggaacata gcacgtttct ctctggcctg gtactggcta cccttctctc gcaagtgagc 60
 cccttcaaga tacctataga ggaacttgag gacagagtgt ttgtgaattg caataccagc 120
 atcacatggg tagaggggaac ggtgggaaca ctgctctcag acattacaag actggacctg 180
 ggaaaacgca tcctggaccc acgaggaata tataggtgta atgggacaga tatatacaag 240
 gacaaagaat ctaccgtgca agttcattat cgaatgtgcc agagctgtgt ggagctggat 300
 ccagccaccg tggttgccat cattgtcact gatgtcattg ccactctgct ccttgctttg 360
 ggagtcttct gctttgctgg acatgagact ggaaggctgt ctggggctgc cgacacacaa 420
 gctctgttga ggaatgacca ggtctatcag ccctccgag atcgagatga tgctcagtac 480
 agccaccttg gaggaaactg ggctcggaac aagtga 516

<210> 86
 <211> 171
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 86

042507

Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu
1 5 10 15

Ser Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg
20 25 30

Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val
35 40 45

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

Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys
65 70 75 80

Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys
85 90 95

Val Glu Leu Asp Pro Ala Thr Val Ala Gly Ile Ile Val Thr Asp Val
100 105 110

Ile Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Gly Val Phe Cys Phe Ala Gly His
115 120 125

Glu Thr Gly Arg Leu Ser Gly Ala Ala Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg
130 135 140

Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Ala Gln Tyr
145 150 155 160

Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys
165 170

<210> 87
<211> 624
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 87
atgcagtcgg gcactcactg gagagttctg ggccctctgcc tcttatcagt tggcggttgg 60
gggcaagatg gtaatgaaga aatgggtggt attacacaga caccatataa agtctccatc 120
tctggaacca cagtaatatg gacatgccct cagtatcctg gatctgaaat actatggcaa 180
cacaatgata aaaacatagg cggatgatgag gatgataaaa acataggcag tgatgaggat 240
cacctgtcac tgaaggaatt ttcagaattg gagcaaagtg gttattatgt ctgctacccc 300
agaggaagca aaccagaaga tgcgaacttt tatctctacc tgagggcaag agtgtgtgag 360
aactgcatgg agatggatgt gatgtcgggt gccacaattg tcatagtga catctgcatc 420
actgggggct tgetgctgct ggtttactac tggagcaaga atagaaaggc caaggccaag 480
cctgtgacac gaggagcggg tgctggcggc aggcaaaggg gacaaaacaa ggagaggcca 540
ccacctgttc ccaaccaga ctatgagccc atccggaag gccagcggga cctgtattct 600
ggcctgaatc agagacgcat ctga 624

<210> 88
<211> 207
<212> EBJOK
<213> Homo sapiens

<400> 88

Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
 1 5 10 15

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
 20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
 35 40 45

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
 50 55 60

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
 65 70 75 80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
 85 90 95

Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
 100 105 110

Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
 115 120 125

Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu
 130 135 140

Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
 145 150 155 160

Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn
 165 170 175

Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
 180 185 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
 195 200 205

<210> 89

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 89

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 1 5

<210> 90

<211> 6

<212> БЕЛОК

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 90

Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 91

<211> 9

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 91

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser
1 5

<210> 92

<211> 7

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 92

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 93

<211> 8

<212> БЕЛОК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственно синтезированная пептидная последовательность

<400> 93

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антигенсвязывающая молекула для лечения рака, включающая
вариабельную область антитела, обладающую связывающей активностью с первым антигеном и вторым антигеном, который отличается от первого антигена, но не связывающуюся с первым антигеном и вторым антигеном одновременно, где любой из первого и второго антигенов представляет собой молекулу, специфически экспрессируемую на поверхности Т-клеток, а другой антиген представляет собой молекулу, экспрессируемую на поверхности Т-клеток или любого другого иммунocyта; и

вариабельную область, связывающуюся с третьим антигеном, который представляет собой раковый антиген,

при этом первым антигеном является CD3, а вариабельная область антитела, которая способна связывать первый и второй антигены, получена в результате замены части аминокислотной последовательности вариабельной области, связывающейся с первым антигеном, на аминокислотную последовательность, связывающуюся со вторым антигеном, или вставки такой части и наоборот, и является вариабельной областью, включающей от 1 до 25 аминокислотных замен или вставок, причем аминокислота, которая заменяется или встраивается, является аминокислотой в CDR1, CDR2, CD3 или FR3 области, или аминокислотой, выбранной из аминокислот, находящихся в положениях 31-35, 50-65, 71-74 и 95-102 в вариабельном домене Н-цепи антитела согласно нумерации по Кабату и в положениях 24-34, 50-56 и 89-97 в вариабельном домене L-цепи согласно нумерации по Кабату,

причем антигенсвязывающая молекула не содержит Fc-область или содержит Fc-область, обладающую пониженной связывающей активностью с FcγR.

2. Антигенсвязывающая молекула по п.1, где вариабельной областью, которая не связывается с первым антигеном и вторым антигеном одновременно, является вариабельная область, которая не связывается одновременно с первым антигеном и вторым антигеном, каждый из которых экспрессируется на различных клетках.

3. Антигенсвязывающая молекула по п.1 или 2, включающая Fc-область антитела, которая является Fc-областью со сниженной связывающей активностью с рецептором FcγR по сравнению с Fc-областью природного антитела IgG1 человека.

4. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп.1-3, где антигенсвязывающей молекулой явля-

ется мультиспецифическое антитело.

5. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп.1-4, где вариательной областью антитела, способной связываться с первым антигеном и вторым антигеном, является вариательная область с измененным по крайней мере одним аминокислотным остатком.

6. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп.1-5, где любым первым антигеном и вторым антигеном является CD3, а другим антигеном является FcγR, TLR, лектин, IgA, молекула иммунных контрольных точек, молекула подсемейства TNF, молекула подсемейства TNFR или молекула рецептора клеток-киллеров.

7. Антигенсвязывающая молекула по любому из пп.1-6, где третьим антигеном является молекула, специфически экспрессируемая в раковой ткани.

8. Фармацевтическая композиция для лечения рака, включающая антигенсвязывающую молекулу по любому из пп.1-7, и фармацевтически приемлемый носитель.

9. Способ получения антигенсвязывающей молекулы по любому из пп.1-7, где способ включает стадии (i)-(iv):

(i) получения библиотеки антигенсвязывающих молекул по крайней мере с одним измененным аминокислотным остатком в их вариательных областях антитела, каждая из которых связывается с первым антигеном или со вторым антигеном, при этом осуществляется замена части аминокислотной последовательности вариательной области, связывающейся с первым антигеном, на аминокислотную последовательность, связывающуюся со вторым антигеном, или вставка такой части и наоборот, а измененные вариательные области отличаются друг от друга по крайней мере одним аминокислотным остатком, где по крайней мере одним измененным аминокислотным остатком в вариательных областях является замещенный или вставленный аминокислотный остаток, причем изменением является изменение по крайней мере одного аминокислотного остатка, выбранного из положений аминокислот 31-35, 50-65, 71-74 и 95-102 согласно нумерации по Кабату в вариательном домене тяжелой цепи H, и 24-34, 50-56 и 89-97 согласно нумерации по Кабату в вариательном домене легкой цепи L,

(ii) выбора из полученной библиотеки антигенсвязывающей молекулы, включающей вариательную область, обладающую связывающей активностью с первым антигеном и со вторым антигеном, но которая не связывается с первым антигеном и со вторым антигеном одновременно,

(iii) культивирования клеток-хозяина, включающих нуклеиновую кислоту, кодирующую вариательную область антигенсвязывающей молекулы, выбранной на стадии (ii), и нуклеиновую кислоту, кодирующую вариательную область антигенсвязывающей молекулы, связывающейся с третьим антигеном, для экспрессии антигенсвязывающей молекулы, включающей вариательную область антитела, которая связывается с первым антигеном и со вторым антигеном, но не связывается с первым антигеном и вторым антигеном одновременно, и/или вариательную область, связывающуюся с третьим антигеном, причем клетки-хозяина, культивируемые на этой стадии, дополнительно могут включать нуклеиновую кислоту, кодирующую Fc-область антитела, которая является Fc-областью со сниженной связывающей активностью в отношении рецептора FcγR по сравнению с Fc-областью природного антитела IgG1 человека, и

(iv) выделение антигенсвязывающей молекулы из культур клеток-хозяина.

10. Способ по п.9, где вариательной областью, которая не связывается с первым антигеном и вторым антигеном одновременно, содержащейся в антигенсвязывающей молекуле, выбранной на стадии (ii), является вариательная область, которая не связывается одновременно с первым антигеном и со вторым антигеном, каждый из которых экспрессируется на различных клетках.

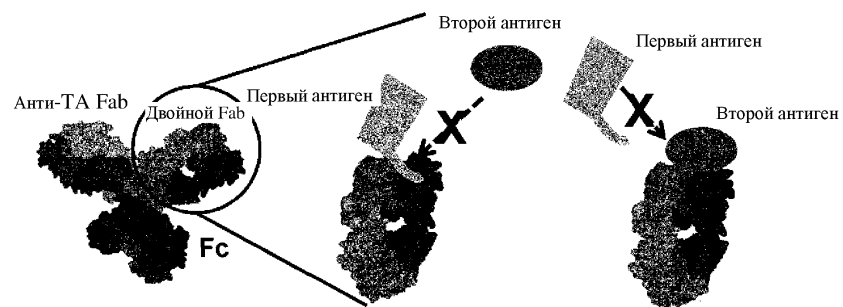
11. Способ по любому из пп.9-10, где продуцируемой антигенсвязывающей молекулой является мультиспецифическое антитело.

12. Способ по п.9, где число вставленных аминокислотных остатков составляет от 1 до 25.

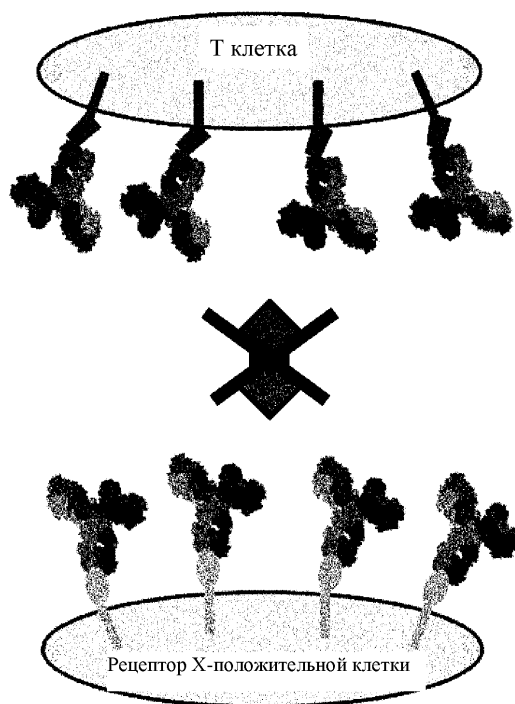
13. Способ по любому из пп.9-12, где изменением является изменение аминокислотного остатка в областях CDR1, CDR2, CDR3 или FR3 в вариательной области антитела.

14. Способ по любому из пп.9-13, где первым антигеном является CD3, а вторым антигеном является любой другой антиген, выбранный из FcγR, TLR, лектин, IgA, 274 молекула иммунных контрольных точек, молекула суперсемейства TNF, молекула суперсемейства TNFR или молекула рецептора клеток-киллеров.

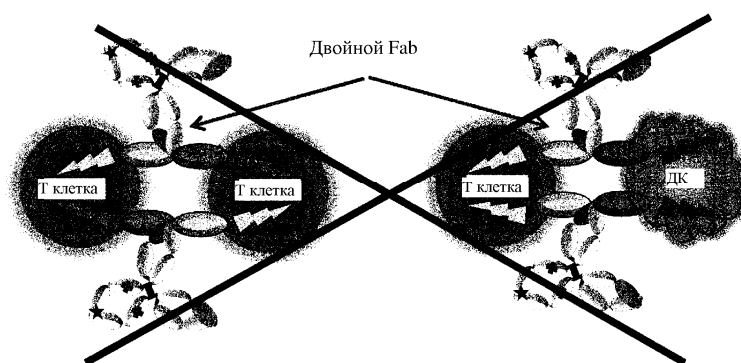
15. Способ по любому из пп.9-14, где третьим антигеном является молекула, специфически экспрессируемая в раковой ткани.



Фиг. 1

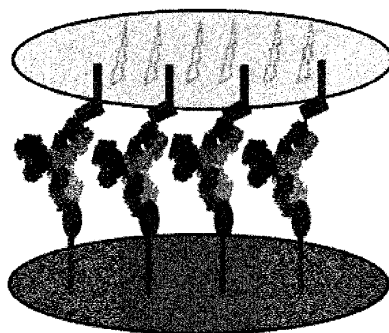


Фиг. 2



Фиг. 3

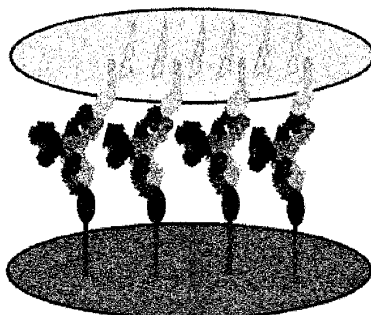
Т клетка (CD3-положительная клетка)



Раковая клетка

Фиг. 4

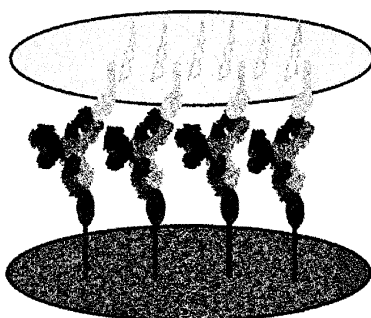
Рецептор X-положительной клетки



Раковая клетка

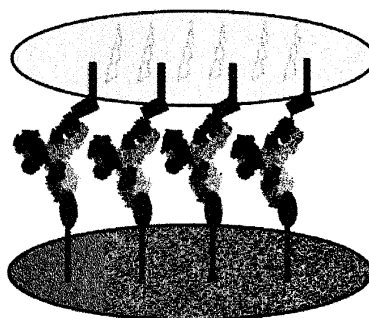
Фиг. 5

Рецептор X-положительной клетки

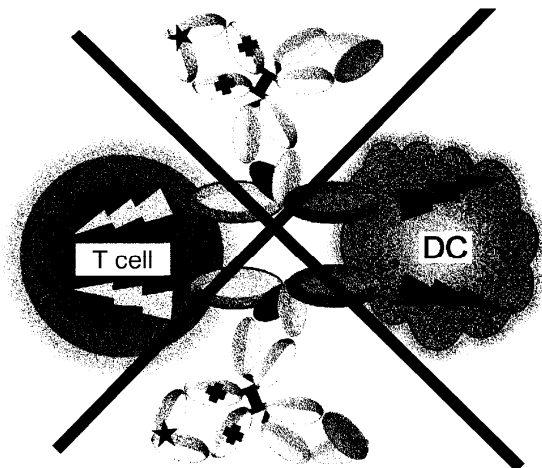


Раковая клетка

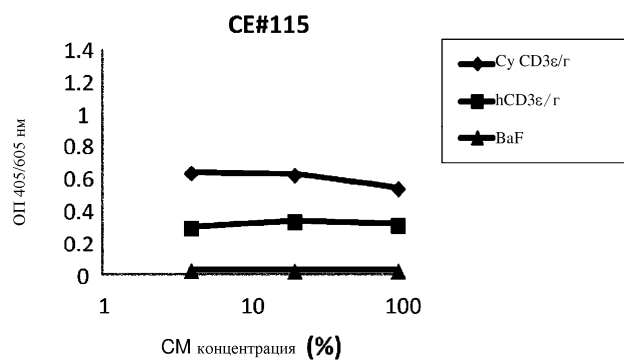
Т клетка (CD3-положительная клетка)



Раковая клетка



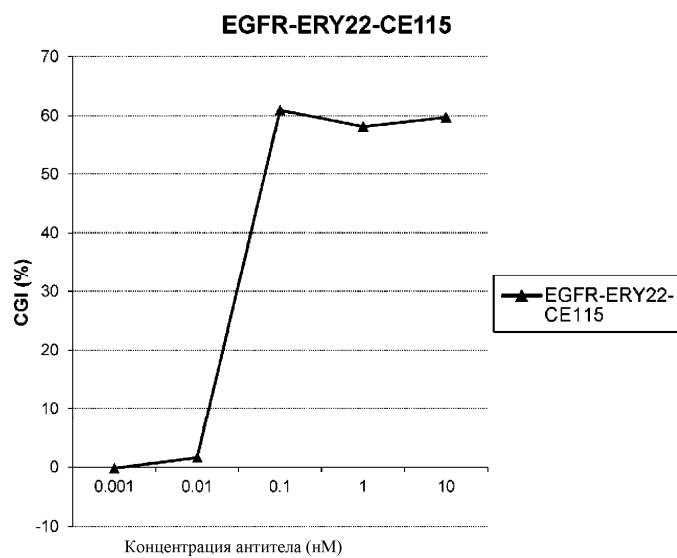
Фиг. 6



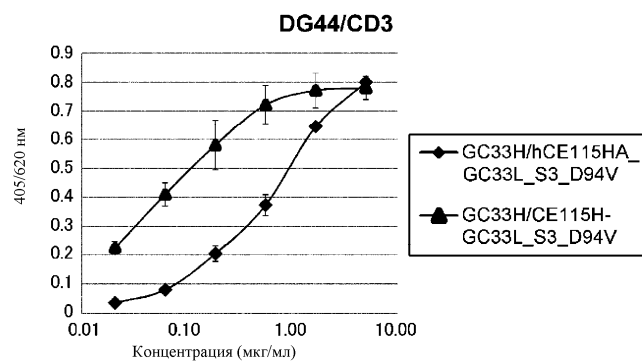
Фиг. 7



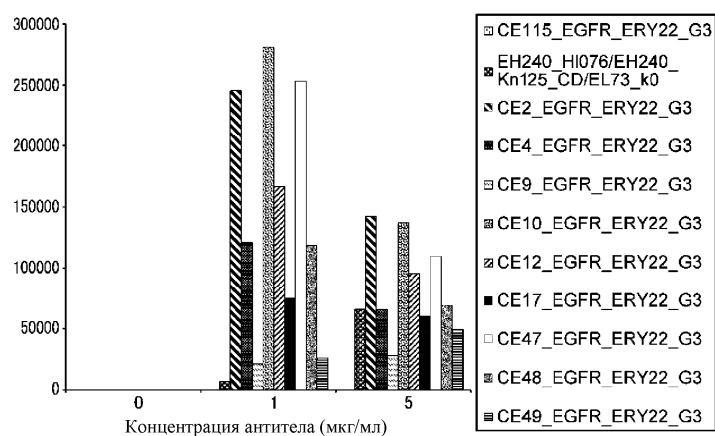
Фиг. 8



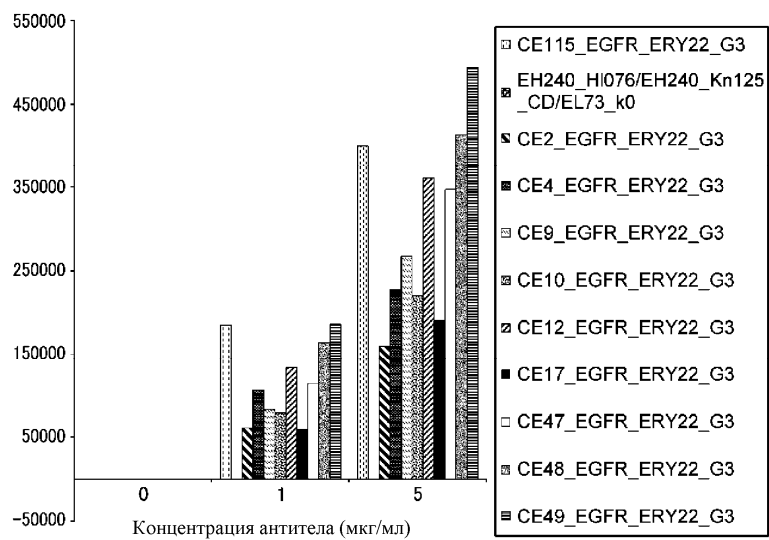
Фиг. 9



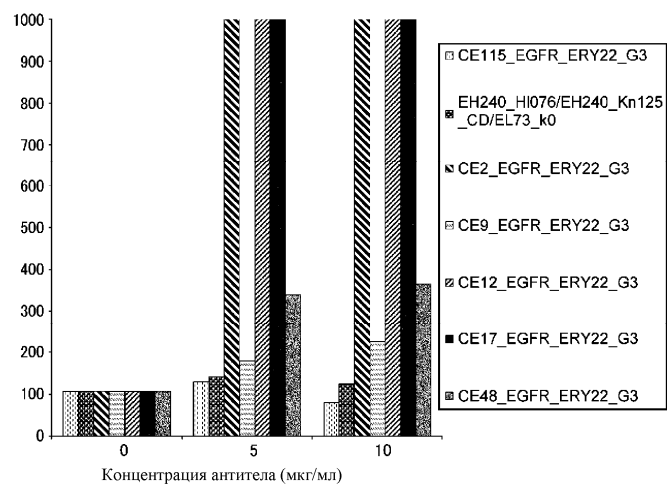
Фиг. 10



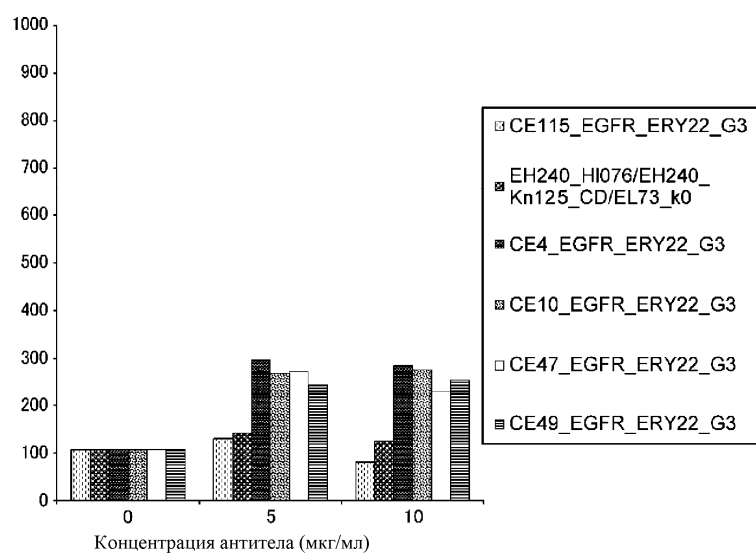
Фиг. 11



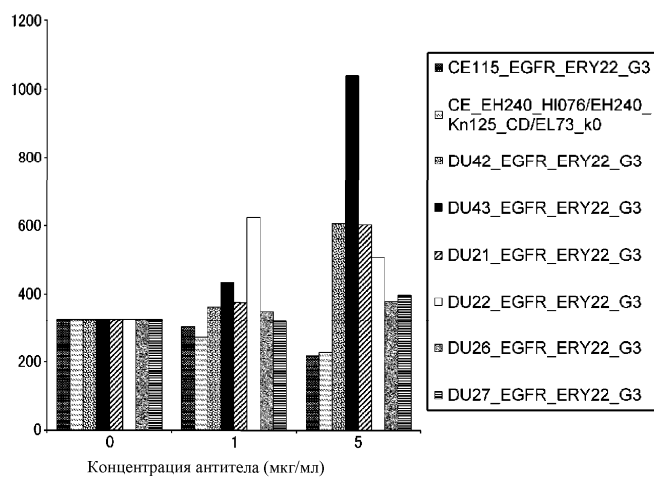
Фиг. 12



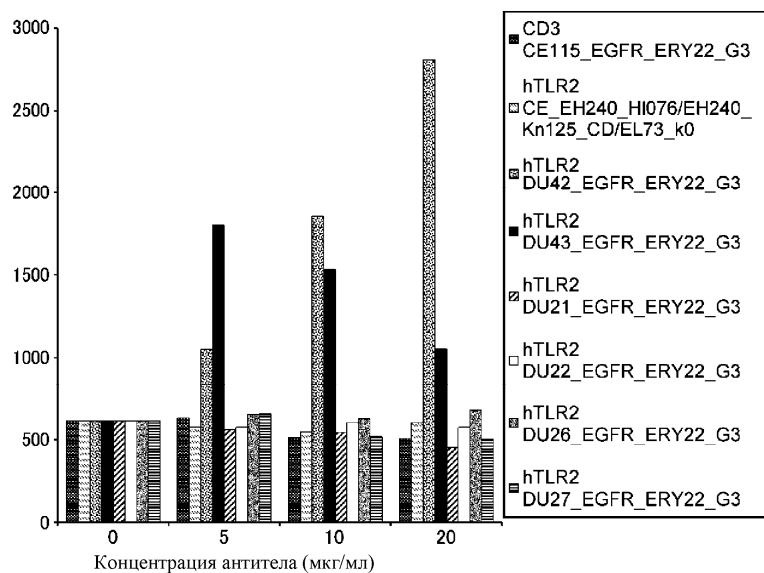
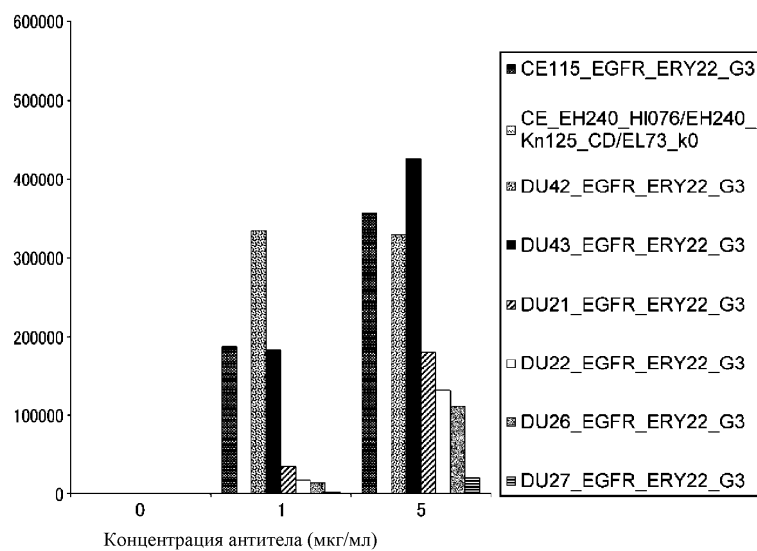
Фиг. 13



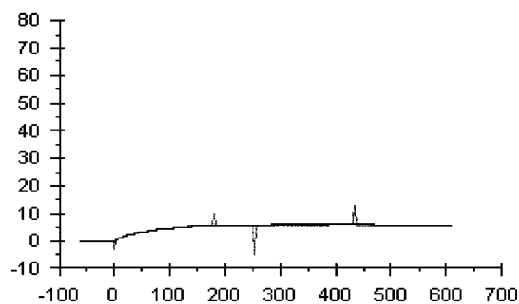
Фиг. 14



Фиг. 15

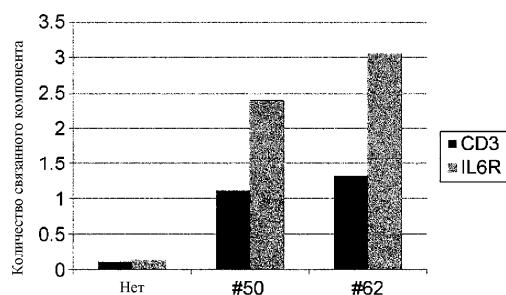


Файл: 121018E1
 Номер: HA029 1arm
 Лиганд: Образец: HA029 1arm
 Кривая: Fc=3-1 Температура: 25 °C



Подгонка: 1:1 Связывание -RI
ka (1/Ms): 4.559E+5
kd (1/s): 6.010E-4

Фиг. 18



Фиг. 19

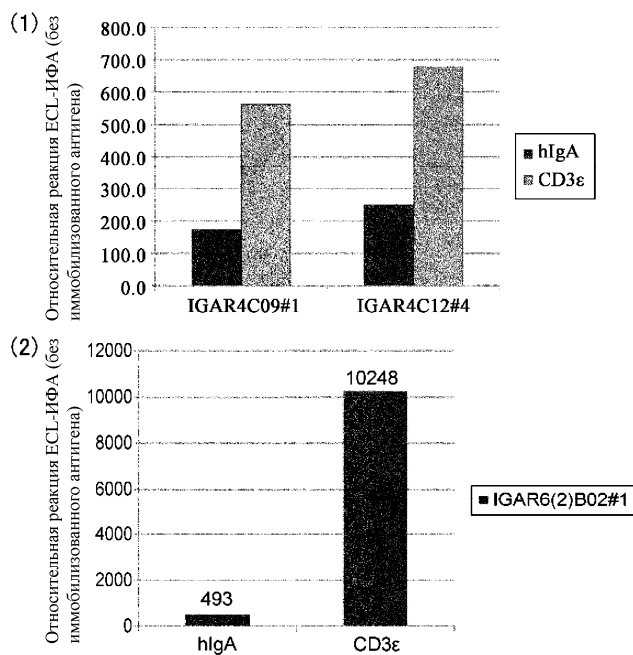
hADHB2b-4

#	Значение ИФА (ОП при 450 nm)			По отн. к ОК*	
	hlgA	CD3	NC	S/N of hlgA	S/N of CD3
1	0.069	0.049	0.065	1.1	0.8
2	0.064	0.053	0.061	1.0	0.9
3	0.058	0.057	0.056	1.0	1.0
4	0.066	0.053	0.064	1.0	0.8
5	0.067	0.061	0.065	1.0	0.9
6	0.102	0.545	0.056	1.8	9.7
7	0.110	0.624	0.054	2.0	11.6
8	0.077	0.075	0.077	1.0	1.0
9	0.123	0.806	0.052	2.4	15.5
10	0.051	0.372	0.051	1.0	7.3
11	0.056	0.055	0.053	1.1	1.0
12	0.054	0.053	0.052	1.0	1.0
13	0.056	0.052	0.056	1.0	0.9
14	0.063	0.059	0.062	1.0	1.0
15	0.069	0.060	0.062	1.1	1.0
16	0.066	0.062	0.063	1.0	1.0
17	0.067	0.057	0.061	1.1	0.9
18	0.061	0.055	0.057	1.1	1.0
19	0.067	0.060	0.067	1.0	0.9
20	0.058	0.526	0.057	1.0	9.2
21	0.059	0.051	0.054	1.1	0.9
22	0.064	0.059	0.061	1.0	1.0
23	0.067	0.063	0.069	1.0	0.9
24	0.065	0.062	0.062	1.0	1.0
25	0.068	0.056	0.062	1.1	0.9
26	0.055	0.051	0.053	1.0	1.0
27	0.061	0.061	0.060	1.0	1.0
28	0.065	0.063	0.063	1.0	1.0
29	0.065	0.061	0.063	1.0	1.0
30	0.067	0.060	0.062	1.1	1.0
31	0.066	0.060	0.064	1.0	0.9
32	0.071	0.070	0.067	1.1	1.0
33	0.071	0.061	0.063	1.1	1.0
34	0.053	0.063	0.052	1.0	1.2
35	0.051	0.049	0.048	1.1	1.0
36	0.121	0.794	0.049	2.5	16.2
37	0.050	0.346	0.049	1.0	7.1
38	0.071	0.061	0.060	1.2	1.0
39	0.063	0.059	0.061	1.0	1.0
40	0.069	0.067	0.067	1.0	1.0
41	0.075	0.067	0.071	1.1	0.9
42	0.051	0.391	0.048	1.1	8.1
43	0.121	0.820	0.048	2.5	17.1
44	0.126	0.816	0.053	2.4	15.4
45	0.054	0.050	0.052	1.0	1.0
46	0.067	0.063	0.063	1.1	1.0
47	0.054	0.051	0.053	1.0	1.0
48	0.083	0.081	0.092	0.9	0.9

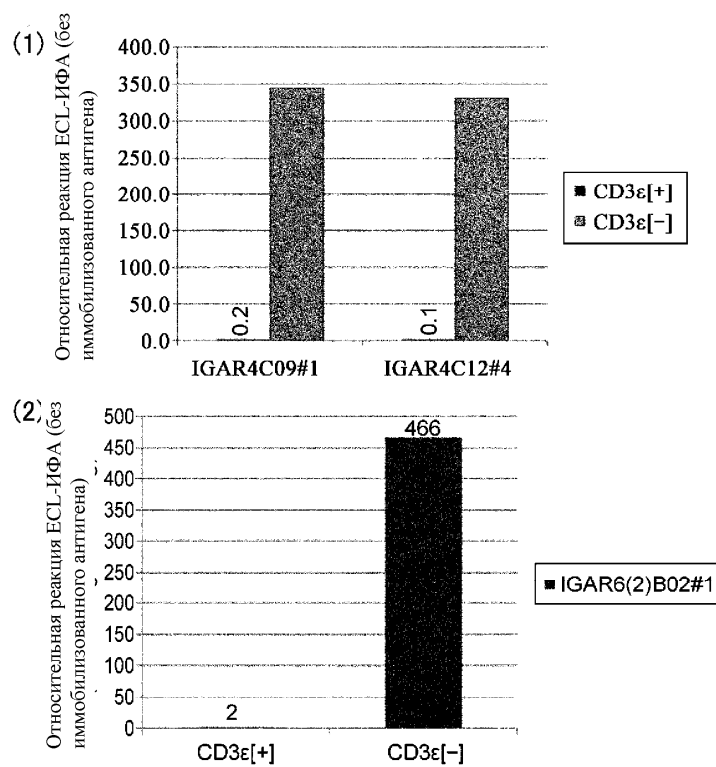
#	Значение ИФА (ОП при 450 nm)			По отн. к ОК*	
	hlgA	CD3	NC	S/N of hlgA	S/N of CD3
49	0.062	0.055	0.061	1.0	0.9
50	0.106	0.807	0.048	2.2	16.8
51	0.061	0.059	0.059	1.0	1.0
52	0.063	0.060	0.060	1.1	1.0
53	0.063	0.061	0.061	1.0	1.0
54	0.070	0.063	0.064	1.1	1.0
55	0.122	0.821	0.049	2.5	16.8
56	0.126	0.889	0.052	2.4	17.1
57	0.060	0.050	0.053	1.1	0.9
58	0.052	0.048	0.050	1.0	1.0
59	0.068	0.064	0.067	1.0	1.0
60	0.062	0.070	0.055	1.1	1.3
61	0.063	0.061	0.061	1.0	1.0
62	0.065	0.062	0.061	1.1	1.0
63	0.134	0.832	0.050	2.7	16.6
64	0.061	0.058	0.055	1.1	1.1
65	0.075	0.067	0.074	1.0	0.9
66	0.063	0.057	0.060	1.1	1.0
67	0.083	0.672	0.050	1.7	13.4
68	0.064	0.060	0.063	1.0	1.0
69	0.055	0.050	0.053	1.0	0.9
70	0.069	0.071	0.070	1.0	1.0
71	0.053	0.050	0.053	1.0	0.9
72	0.059	0.056	0.055	1.1	1.0
73	0.102	0.785	0.051	2.0	15.4
74	0.060	0.055	0.058	1.0	0.9
75	0.061	0.057	0.059	1.0	1.0
76	0.061	0.058	0.058	1.1	1.0
77	0.063	0.062	0.069	0.9	0.9
78	0.054	0.073	0.049	1.1	1.5
79	0.143	0.844	0.054	2.6	15.6
80	0.068	0.068	0.063	1.1	1.1
81	0.059	0.056	0.058	1.0	1.0
82	0.061	0.056	0.059	1.0	0.9
83	0.064	0.059	0.059	1.1	1.0
84	0.068	0.060	0.064	1.1	0.9
85	0.065	0.061	0.064	1.0	1.0
86	0.058	0.051	0.052	1.1	1.0
87	0.055	0.052	0.052	1.1	1.0
88	0.062	0.060	0.056	1.1	1.1
89	0.067	0.131	0.061	1.1	2.1
90	0.065	0.060	0.058	1.1	1.0
91	0.133	0.826	0.049	2.7	16.9
92	0.080	0.087	0.083	1.0	1.0
93	0.060	0.054	0.053	1.1	1.0
94	0.076	0.069	0.068	1.1	1.0
95	0.088	0.089	0.082	1.1	1.1
96	0.076	0.069	0.071	1.1	1.0

* - по отношению к отрицательному контролю (ОК)

Фиг. 20



Фиг. 21



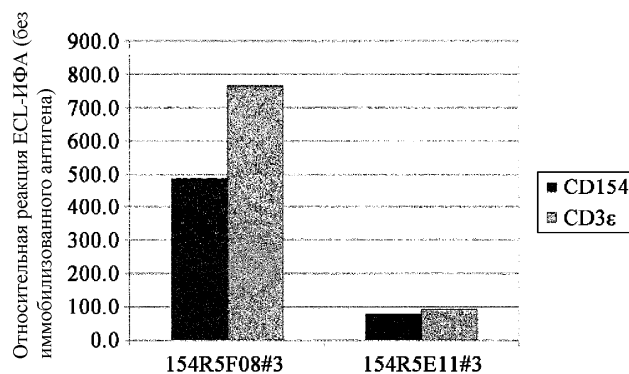
Фиг. 22

154DHB2b-4

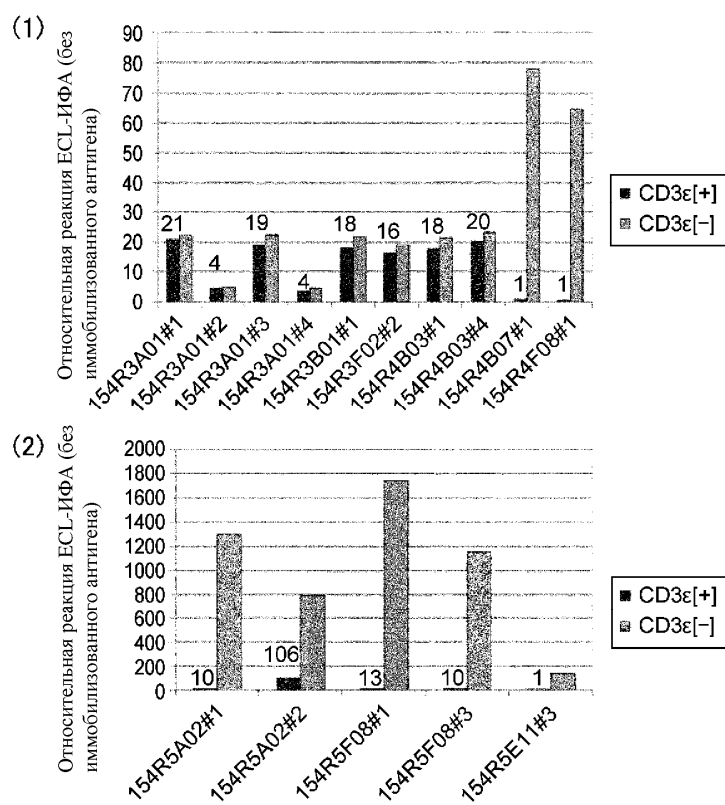
#	Значение ИФА (ОП при 450 nm)			По отн. к ОК*	
	CD154	CD3	NC	S/N of CD154	S/N of CD3
1	0.077	0.061	0.062	1.2	1.0
2	0.060	0.114	0.050	1.2	2.3
3	0.053	0.048	0.050	1.1	1.0
4	0.048	0.045	0.049	1.0	0.9
5	0.053	0.050	0.057	0.9	0.9
6	0.057	0.052	0.054	1.1	1.0
7	0.086	0.075	0.079	1.1	0.9
8	0.060	0.059	0.059	1.0	1.0
9	0.053	0.062	0.060	0.9	1.0
10	0.048	0.047	0.048	1.0	1.0
11	0.049	0.062	0.052	0.9	1.2
12	0.059	0.047	0.047	1.3	1.0
13	0.058	0.292	0.052	1.1	5.6
14	0.059	0.110	0.059	1.0	1.9
15	0.053	0.053	0.058	0.9	0.9
16	0.061	0.117	0.064	1.0	1.8
17	0.064	0.058	0.058	1.1	1.0
18	0.163	0.255	0.083	2.0	3.1
19	0.054	0.067	0.059	0.9	1.1
20	0.057	0.179	0.049	1.2	3.7
21	0.051	0.051	0.053	1.0	1.0
22	0.050	0.680	0.054	0.9	12.6
23	0.058	0.094	0.063	0.9	1.5
24	0.059	0.234	0.061	1.0	3.8
25	0.056	0.050	0.051	1.1	1.0
26	0.050	0.057	0.049	1.0	1.2
27	0.046	0.046	0.048	1.0	1.0
28	0.054	0.169	0.051	1.1	3.3
29	0.049	0.183	0.047	1.0	3.9
30	0.051	0.052	0.050	1.0	1.0
31	0.045	0.045	0.046	1.0	1.0
32	0.051	0.050	0.053	1.0	0.9
33	0.073	0.125	0.074	1.0	1.7
34	0.052	0.050	0.053	1.0	0.9
35	0.067	0.121	0.072	0.9	1.7
36	0.055	0.648	0.053	1.0	12.2
37	0.051	0.381	0.053	1.0	7.2
38	0.050	0.047	0.051	1.0	0.9
39	0.051	0.047	0.051	1.0	0.9
40	0.072	0.104	0.070	1.0	1.5
41	0.052	0.051	0.051	1.0	1.0
42	0.054	0.055	0.058	0.9	0.9
43	0.052	0.086	0.052	1.0	1.7
44	0.061	0.050	0.055	1.1	0.9
45	0.049	0.047	0.048	1.0	1.0
46	0.043	0.043	0.046	0.9	0.9
47	0.056	0.217	0.058	1.0	3.7
48	0.073	0.115	0.073	1.0	1.6

#	Значение ИФА (ОП при 450 nm)			По отн. к ОК*	
	CD154	CD3	NC	S/N of CD154	S/N of CD3
49	0.069	0.210	0.066	1.0	3.2
50	0.110	0.751	0.049	2.2	15.3
51	0.046	0.044	0.049	0.9	0.9
52	0.050	0.178	0.052	1.0	3.4
53	0.050	0.048	0.059	0.8	0.8
54	0.063	0.057	0.064	1.0	0.9
55	0.053	0.975	0.054	1.0	18.1
56	0.056	0.057	0.061	0.9	0.9
57	0.050	0.052	0.049	1.0	1.1
58	0.050	0.045	0.049	1.0	0.9
59	0.062	0.067	0.059	1.1	1.1
60	0.060	0.067	0.052	1.2	1.3
61	0.057	0.065	0.058	1.0	1.1
62	0.109	0.749	0.052	2.1	14.4
63	0.062	0.068	0.069	0.9	1.0
64	0.049	0.052	0.051	1.0	1.0
65	0.065	0.059	0.059	1.1	1.0
66	0.054	0.055	0.058	0.9	0.9
67	0.049	0.045	0.048	1.0	0.9
68	0.065	0.175	0.064	1.0	2.7
69	0.055	0.052	0.057	1.0	0.9
70	0.047	0.046	0.048	1.0	1.0
71	0.059	0.058	0.061	1.0	1.0
72	0.057	0.090	0.059	1.0	1.5
73	0.059	0.077	0.057	1.0	1.4
74	0.052	0.192	0.057	0.9	3.4
75	0.059	0.130	0.071	0.8	1.8
76	0.055	0.046	0.048	1.1	1.0
77	0.049	0.054	0.050	1.0	1.1
78	0.054	0.052	0.054	1.0	1.0
79	0.054	0.056	0.054	1.0	1.0
80	0.125	0.816	0.057	2.2	14.3
81	0.048	0.046	0.049	1.0	0.9
82	0.052	0.056	0.051	1.0	1.1
83	0.053	0.410	0.054	1.0	7.6
84	0.065	0.057	0.064	1.0	0.9
85	0.054	0.048	0.053	1.0	0.9
86	0.053	0.102	0.056	0.9	1.8
87	0.051	0.050	0.054	0.9	0.9
88	0.054	0.054	0.053	1.0	1.0
89	0.065	0.087	0.070	0.9	1.2
90	0.047	0.072	0.051	0.9	1.4
91	0.062	0.047	0.052	1.2	0.9
92	0.052	0.052	0.052	1.0	1.0
93	0.048	0.047	0.048	1.0	1.0
94	0.056	0.803	0.058	1.0	13.8
95	0.059	0.183	0.058	1.0	3.2
96	0.074	0.069	0.067	1.1	1.0

Фиг. 23



Фиг. 24



Фиг. 25

