(19) **RU** (11) **2 128 709** (13) **C1**

(51) МПК[6] **C 12 N 15/62, 15/13, C 07 K 16/46**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 94045249/13, 15.01.1993

(30) Приоритет: 23.01.1992 EP 92101069.0

(46) Дата публикации: 10.04.1999

(56) Ссылки: Protein Engineering. V. 4, no.4, p. 457 - 461, 1991. Trends in Biotechnology. V. 9, p. 132, 1991. EP 0369566 A1, 27.05.90. WO 91/07493 A1, 30.05.91. WO 91/04329 A1, 04.04.91. WO 91/07492 A1, 03.05.91.

(85) Дата перевода заявки PCT на национальную фазу: 22.07.94

(86) Заявка PCT:
EP 93/00082 (15.01.93)

(87) Публикация PCT:
WO 93/15210 (05.08.93)

(98) Адрес для переписки:
103735, Москва ул.Ильинка, 5/2 Союзпатент Лебедевой Н.Г.

(71) Заявитель:
Мерк Патент ГмбХ (DE)

(72) Изобретатель: Андреас Плюктун (DE), Петер Пак (DE)

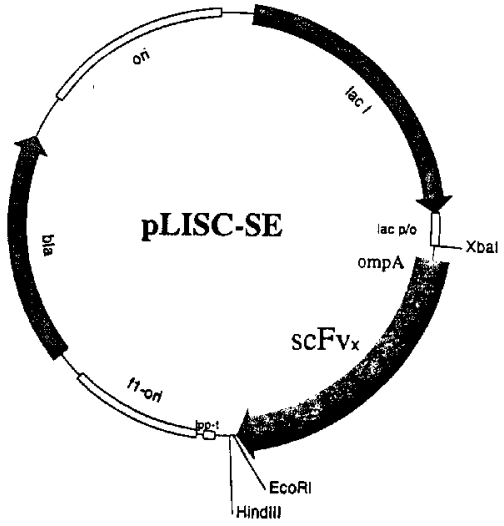
(73) Патентообладатель:
Мерк Патент ГмбХ (DE)

RU 2128709 C1

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ДИМЕРНОГО ОДНОЦЕПОЧЕЧНОГО СЛИТОГО БЕЛКА (ВАРИАНТЫ)

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано для создания слитых белков фрагментов антитела с би- или мультифункциональными сайтами связывания. ДНК последовательности первой и второй мономерных единиц, кодирующие одноцепочечный Fv фрагмент антитела и амфифильный спиральный пептид, клонируют в одном или двух экспрессирующих векторах. Хозяйские клетки трансформируют вектором (ами) экспрессии и культивируют с последующим выделением целевого продукта, экспрессированного в клетке или среде. Способ позволяет получить димерные слитые белки с высокой активностью против соответствующих антигенов. 2 с. и 1 з.п.ф-лы, 4 ил.



Фиг.1

RU 2128709 C1

(19) **RU** (11) **2 128 709** (13) **C1**

(51) Int. Cl.[6] **C 12 N 15/62, 15/13, C 07 K 16/46**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **94045249/13, 15.01.1993**

(30) Priority: **23.01.1992 EP 92101069.0**

(46) Date of publication: **10.04.1999**

(85) Commencement of national phase: **22.07.94**

(86) PCT application:
EP 93/00082 (15.01.93)

(87) PCT publication:
WO 93/15210 (05.08.93)

(98) Mail address:
103735, Moskva ul.Il'inka, 5/2 Sojuzpatent Lebedevoj N.G.

(71) Applicant:
Merk Patent GmbKh (DE)

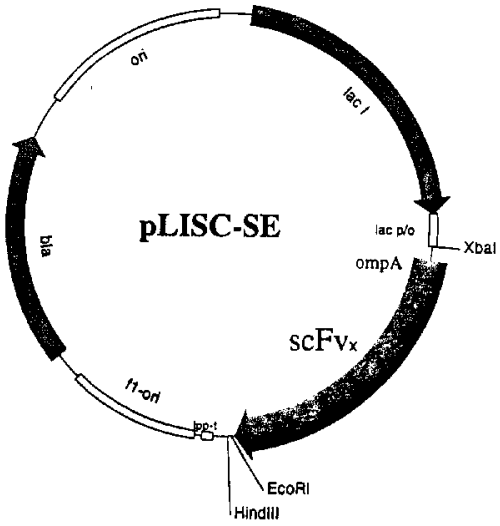
(72) Inventor: **Andreas Pljuktun (DE), Peter Pak (DE)**

(73) Proprietor:
Merk Patent GmbKh (DE)

(54) METHOD OF PREPARING DIMERIC SINGLE-CHAIN FUSED PROTEIN (VARIANTS)

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, chemistry of proteins. SUBSTANCE: DNA sequences of the first and the second monomeric units encoding a single-chain Fv-fragment of antibody and amphiphilic spiral peptide are cloned in one of two expressing vector. Host cells are transformed with an expression vector (amu) and cultured and the end product expressed in cells or medium is isolated. Method ensures to obtain dimeric fused proteins of high activity against the corresponding antigens. Invention can be used for making fused proteins of antibody fragment exhibiting bi- or multifunctional binding sites. EFFECT: improved method of preparing. 3 cl, 5 dwg, 8 ex



Фиг.1

RU 2128709 C1

RU 2128709 C1

Настоящее изобретение описывает новый класс связывающих антиген молекул, которые содержат Fv-фрагмент антитела, но не используют константные области антитела. Они также могут быть димеризованы с другими молекулами фрагментов антитела или с фрагментами молекул не-антитела с образованием би- или мультифункциональных антител-фрагментов слитых белков и так называемых миниантител соответственно. Новые слитые белки могут быть использованы в широкой области диагностической и терапевтической медицины.

В последние несколько лет проявляется большой интерес к биотехнологической области модификации антител природного происхождения, чтобы получить более специфические и более индивидуальные виды антител. Поэтому были сделаны попытки получить (модифицированные) фрагменты антител.

Все антитела природного происхождения любого класса имеют по крайней мере два сайта связывания. Это дает им возможность связываться с поверхностью с большим функциональным сродством (также называемой авидностью), чем одновалентные фрагменты, такие как Fab фрагменты. В последние несколько лет были описаны способы (Skerra and Pluckthun, 1988, Science 240, 1038 - 1040; Belter et al, 1988, Science 240, 1041 - 1043), с помощью которых могут быть получены функциональные фрагменты антител в Escherichia coli. Они включают Fv фрагмент (гетеродимер, состоящий из V_H и V_L) и Fab фрагмент (состоящий из полной легкой цепи с доменами V_L и C_L, а также первых двух доменов тяжелых цепей V_H и C_{H1}).

Однако Fv фрагмент имеет тенденцию диссоциировать на V_H и V_L и, следовательно, выгодно связывать два домена ковалентно. Одним конкретным путем их связывания является конструирование пептидного линкера между ними или в ориентации V_H -линкер- V_L или V_L -линкер- V_H (Bird et al, 1988, Science, 242, 423; Huston et al, 1988, Proc. Nate, Acad. Sci. USA 85, 5879). Полученные в результате фрагменты называют одноцепными Fv фрагментами.

Однако все эти фрагменты являются одновалентными. В этом изобретении мы описываем способ получения малых демиризационных доменов на основе пептидов, образующих амфипатические спирали. Эти пептиды будут упоминаться как "интеркалирующие", но этот термин означает только экспрессию способности нацеленной ассоциации, а не ограничение, относящееся к конкретной структуре поверхности раздела димеризации.

Хотя описанная здесь методология в принципе применима к любым Fab, Fv или scFv фрагментам, только для последних она является наиболее выгодной. В этом случае могут быть сконструированы двухвалентные фрагменты cf очень маленького размера и еще может быть предотвращена диссоциация в V_L и V_H, а также неправильное спаривание фрагментов цепей, например V_L-V_L. Фрагменты антител маленького размера являются особенно удобными для многих применений. При диагностических применениях (например, ЭЛАЙЗА, РИА и т.д.) меньшая поверхность молекул снижает проблемы неспецифического взаимодействия, которые, как известно, часто включают константные области. Это же справедливо для использования фрагментов антител в качестве лигандов в аффинной хроматографии. При диагностике или лечении опухолей важно, чтобы значительное количество инъецированного антитела проникало в ткани и локализовалось в опухоли, и это зависит от размеров молекул (Colcher et al, 1990, J. Natl. Cancer Inst., 82, 1191 - 1197). Выход экспрессии и эффективность секреции рекомбинантных белков также являются функцией размера цепи (Skerra and Pluckthun, 1991, Protein Eng, 4, 971), по этой причине предпочтительными являются маленькие белки. Следовательно, молекулы маленького размера являются выгодными по нескольким причинам.

Прежде всего уменьшение молекулярных размеров антитела означает получение протеолитических фрагментов. Самые маленькие двухвалентные фрагменты, $(Fab)'_2$ фрагменты, являются примерно в два раза большими, чем фрагменты настоящего изобретения. Следовательно, эти новые фрагменты сочетают три признака: (а) маленький размер, (б) двухвалентность или бифункциональность и (в) способность к функциональной экспрессии в E. coli

Имеется большой интерес к бифункциональным антителам в широком круге областей. Бифункциональные антитела могут быть определены как имеющие две различные специфичности или для двух различных антигенов или для двух эпитопов одного и того же антигена.

В настоящее время имеется несколько способов получения бифункциональных антител. Однако ни один из существующих способов не позволяет получать исключительно бифункциональные антитела in vivo, а всегда получают смесь молекулярных разновидностей, требующую сложных и дорогостоящих процедур разделения.

Могут быть выделены четыре основных способа. В первом используют химическую сшивку, в которой можно удобно использовать гетеробифункциональные сшивающие агенты. По этому способу химически сшивают после очистки целые антитела (Staerz et al, 1985, Nature 314, 628; Perez et al. 1985, Nature 316, 354 - 356), Fab фрагменты (Carter et al., 1992, Biotechnology 10, 63) и scFv фрагменты (Cumber et al 1992, J. Immunol. 149, 120).

Второй известный способ включает слияние двух гибридов, чтобы получить так называемую гетерогибридому или "квадрому". В этом способе любая легкая цепь может быть спарена с любой тяжелой цепью, а две тяжелые цепи могут дать гомодимеры или гетеродимеры, приводя в результате к очень сложным смесям продуктов (Milstein and Cuello, 1983, Nature 305, 537).

Третий способ относится ко второму и состоит из переноса двух экспрессирующих плазмид в клетку гибридомы, кодирующую тяжелую и легкую цепь второго антитела (Zenz and Weidle 1990, Gene 87, 213) или ретровирусный вектор (De Monte et al, 1990,

RU 2128709 C1

RU 2128709 C1

Acad. Sci 87, 2941 - 2945). Однако при введении смесь продуктов является идентичной смеси второй процедуры.

Наконец, антитела восстанавливают, смешивают и повторно окисляют (Staerz and Bevan, 1986, Immunology Today 7). Опять-таки получают очень сложные смеси продуктов, требующие тонких методов разделения и процедур контроля за качеством.

Следовательно, все еще существует потребность в способе, позволяющем выделять исключительно гетеродимерные антитела непосредственно без сложного приготовления, требующегося для химической сшивки. В настоящем изобретении эта проблема решается за счет: (i) ковалентного связывания соответствующих V_H и V_L областей в scFv фрагменте и (ii) использования областей димеризации, обеспечивающих только образование гетеродимеров, таких как определенные лейциновые зипперы (Zipper - "застежка-молния") и производные.

Другим важным обстоятельством настоящего изобретения является желание получить по возможности меньшую молекулярную массу биспецифического антитела по изложенным выше детально причинам. Это достигается при использовании scFv фрагментов.

Ряд применений биспецифических антител уже был описан, а большинство из них будет извлекать пользу из этой новой технологии. Например, биспецифические антитела представляют большой интерес в терапии опухолей. Одно плечо антитела может связываться с опухолевым маркером, а другое плечо - с эпитопом Т-клетки, токсином или пептидом или белком, связывающим радионуклид, чтобы довести убивающую функцию до опухолевой клетки. В диагностике одно плечо может быть связано с интересующим анализируемым объектом, а другое - с объектом, который может быть легко оценен количественно, например ферментом. Наконец, в клеточных применениях может быть выгодно получать более высокую селективность при связывании, если два различных эпитопа или тот же самый белковый комплекс могут быть узнаны или если два различных белка могут быть узнаны на той же самой клеточной поверхности.

Итак, целью настоящего изобретения является создание новых индивидуальных и стабильных слитых белков фрагментов антитела с би- или мультифункциональными сайтами связывания.

Было обнаружено, что слитые белки фрагментов антитела, содержащие Fv-фрагменты, могут быть получены методами генетической инженерии, которые проявляют специфические и улучшенные свойства.

Следовательно, объектом изобретения является слитый белок фрагмента мономерного антитела, по существу состоящий из Fv-фрагмента антитела и пептида, который способен к димеризации с другим пептидом путем нековалентного взаимодействия.

Термин "нековалентное взаимодействие" означает любое существующее в нормальных условиях стабильное связывание, которое не является ковалентным связыванием, например связывание за счет вандерваальсовых сил, (стерическое) взаимопроникновение амфифильных пептидов, особенно спиральных пептидов, или пептидов, несущих противоположные заряды аминокислотных остатков. Соответствующие эффективные пептиды называют ранее и далее взаимодействующими или интеркалирующими пептидами.

Амфифильные пептиды содержат вплоть до 50 аминокислот. Предпочтительно они состоят из 10 - 30 аминокислот. В предпочтительном варианте изобретения взаимодействующий пептид является пептидным спиральным пуском (состоящим из спирали, изгиба и другой спирали, смотри выше). В другом варианте взаимодействующий пептид является лейциновым зиппером (Zipper - "застежка-молния"), состоящим из пептида, имеющего несколько повторяющихся аминокислот, в котором каждой седьмой аминокислотой является лейциновый остаток. В других случаях согласно изобретению пептид несет положительно или отрицательно заряженные остатки, например, лизина (положительно заряженный) или глютаминовой кислоты (отрицательно заряженный) таким образом, что этот пептид может связываться с другим пептидом (или второй мономерной единицей), несущей противоположный заряд.

Fv-фрагмент и интеркалирующий пептид связываются друг с другом или непосредственно или с помощью пептидного линкера, предпочтительно с помощью пептидного линкера. В предпочтительном варианте пептидный линкер представляет собой последовательность области петли антитела.

Как определено, Fv-фрагмент состоит из V_L и V_H области антитела. Fv-фрагмент согласно изобретению предпочтительно является одноцепочечным фрагментом. Одноцепочечные фрагменты могут быть получены по стандартным методикам с использованием стандартных линкерных молекул.

Кроме того, объектом изобретения является димерный слитый белок, по существу состоящий из двух мономерных слитых белков, причем связывание мономерных единиц основано на нековалентном взаимодействии идентичных или различных пептидов, отличающийся тем, что по крайней мере одна мономерная единица является слитым белком Fv-фрагмента антитела, как определено выше.

Если димер содержит два Fv-фрагмента, Fv-фрагменты могут быть одинаковыми (идентичные сайты связывания антигена) или могут быть различными (различные сайты связывания антигена). В этих случаях могут быть получены моно- и биспецифические (Fv)-миниантитела. Согласно изобретению предпочтительными являются биспецифические мини-антитела.

Взаимодействующие пептиды могут быть одинаковыми или различными, предпочтительно они являются идентичными. Интеркалирующие пептиды могут быть ассоциированы параллельно или антипараллельно.

RU 2128709 C1

RU 2128709 C1

Следовательно, объектом изобретения являются, прежде всего, слитый димерный белок, состоящий из двух Fv-фрагментов с различной специфичностью (сайтами связывания антигена) или идентичных интерксилирующих спиральных пептидов, фрагменты антитела и пептиды связаны вместе с помощью последовательности области петли.

Кроме того, объектом изобретения является димер, состоящий из мономерной единицы, содержащей Fv-фрагмент, и другой мономерной единицы, в которой Fv-фрагмент заменен пептидом не-антитела. Пептид не-антитела может быть токсином, подобным рицину, хелатором или связывающим металл пептидом, или ферментом (например, маркерным ферментом), или пептидом, несущим детектируемую метку (например, радиоизотоп).

Пептид не-антитела также может нести соответствующий сайт связывания указанных групп, включая сайты, направленные к Т-клеткам или фрагментам Т-клеток.

Кроме того, изобретение относится к мономерам или димерам, как определено выше, где взаимодействующий(е) пептид(ы) является(ются) дополнительно слитым с С-конца с белками-мишенями/пептидами, как упоминалось выше, включая соответствующие сайты связывания. Следовательно, полученные в результате слитые белки и мини-антитела соответственно являются мультифункциональными.

Кроме того, изобретение относится к способу получения слитого белка мономерного антитела, как определено выше, отличающемуся тем, что гены, кодирующие Fv-фрагмент, взаимодействующий пептид и, при желании, связующий пептид, клонируют в плазмиду экспрессии, клетку хозяина трансформируют указанной плазмидой экспрессии и культивируют в питательном растворе и слитый мономерный белок экспрессируется в клетке или секретируется в среду.

Наконец, объектом изобретения является способ получения димерного слитого белка, как определено выше, отличающийся тем, что гены, кодирующие полные мономерные слитые белки или их части, клонируют по крайней мере в одну плазмиду экспрессии, клетку хозяина трансформируют указанной(ными) плазмидой(ами) экспрессии и культивируют в питательном растворе, и/или полный димерный слитый белок экспрессируется в клетке или в среду, или мономерные слитые белки экспрессируются отдельно и осуществляют нековалентное связывание между двумя мономерными единицами в среде или in vitro, а в случае, когда клонированы только части слитых белков, осуществляют дополнительно стадии построения белка в соответствии со стандартными методиками.

Димерные Fv-фрагменты, содержащие слитые белки согласно изобретению, показывают высокую активность против соответствующих антигенов и удовлетворительную стабильность. Эти новые двухвалентные или бифункциональные молекулы могут быть получены как складчатые и сборные молекулы в E coli. Эти мини-антитела совместимы с функциональной экспрессией путем секреции.

Детальное описание изобретения.

Выбирают домены для олигомеризации, имеющие очень маленькую молекулярную массу и совместимые с транспортировкой слитого белка через мембрану. Они основаны на двух различных типах амфифильных спиралей.

Амфифильные спирали известны преимущественно, но не исключительно ассоциированными в двух различных молекулярных структурах: четырехспиральные узлы и скрученные спирали. Композиция и образование спиральных узлов были изучены ранее (Eisenberg et al, 1986, Proteins 1, 16 - 22; Ho and de Grado, 1987; J. Am. Chem. Soc. 109, 6751 - 6758: Regan and de Grando, 1988, Science 241, 976 - 978; Hill et al 1990, Science, 294, 543 - 546). Такая молекулярная ассоциация также известна для природных белков (Richardson, 1981, Adv. Prot. Chem. 34, 167).

Четырехспиральный узел может быть образован или четырьмя отдельными молекулами (каждая вносит одну спираль), двумя молекулами, содержащими две спирали каждая (соединенными как спираль-поворот-спираль) или одной молекулой, содержащей спираль-поворот-спираль-поворот-спираль-поворот-спираль повторяющийся структурный элемент. Для димеризации или мультимеризации пригодны только первые две.

Были испытаны три вариации этой последней темы. Во-первых, была использована одна спираль последовательности, приведенной у Eisenberg et al (1986. Proteins I, 16 - 22). Во-вторых, эту последовательность удлинили маленьким гидрофильным пептидом, заканчивающимся цистеином. Поскольку спирали являются ассоциированными, гидрофильные пептиды помогают достаточно тесному контакту, при котором они могут сталкиваться и в окислительных условиях может образоваться дисульфидная связь, как в периплазме E. coli. В третьей вариации используют две спирали в тандеме, разделенные коротким витком кодирующего пептида.

Во второй схеме используют пептиды, которые могут образовать так называемые структуры скрученной спирали. Такие пептиды встречаются в факторах транскрипции, таких как, например GCH4 у дрожжей, и имеют так называемые лейциновые зипперы (Landschulz et al, 1988, Science, 240, 1759 - 1764). Недавно была решена кристаллическая структура этого (O'Shea et al, 1991, Science, 254, 539 - 544) и была показана параллельная компановка спиралей.

Ковалентное присоединение спиралей возможно путем маленького удлинения пептида, снова содержащего цистеин. Поскольку спирали теперь являются параллельными, удлинение пептида может быть намного короче, так как расстояние намного меньше.

Различные устройства димеризации (интеркалирующие спирали), однако, не сливаются непосредственно в домен антитела. Удобно вводить гибкий пептид

RU 2128709 C1

RU 2128709 C1

между концом scFv фрагмента и началом спирали. В виде примера используют область верхней петли IgG3 мыши. Однако могут быть использованы различные петли. Это не требуется для самой димеризации, но обеспечивает пространство для двух scFv доменов, подобное сайтам связывания антигена целого антитела. Таким образом, два сайта связывания охватывают большее расстояние в пространстве и, следовательно, могут доходить до антигенов на твердой поверхности.

Встречающиеся в природе петли антител являются предпочтительными вариантами петель в двухвалентных миниантителах. В случае бифункциональных миниантител петли могут быть короче, поскольку часто молекулы от различных поверхностей являются сшитыми по возможности близко и гибкость димера не является необходимой. Выбор петли определяется последовательностью желаемого остатка, длиной (Argos, 1990, J. Mol. Biol. 211, 943 - 958), совместимостью со складчатостью и стабильностью амфифильных спиралей (Richardson and Richardson 1988, Science 240, 1648 - 1652), секрецией и устойчивостью к протеазам.

Настоящее изобретение рассматривает пептиды как устройства для димеризации, которые должны быть по возможности маленькими. Одним предпочтительным вариантом является применение пептидов, которые могут образовать амфипатические спирали. Такие спирали закрывают гидрофобную поверхность путем димеризации или даже мультимеризации. Спирали этого типа характеризуются наличием гидрофобных участков на одной поверхности спирали и содержанием достаточного количества спиралеобразующих остатков. Принципы для таких пептидов обсуждаются у Eisenberg et al, 1986, O'Shea et al, 1991 (Science 254, 539 - 544), 1992 (Cell 68, 699 - 708)

Было обнаружено, что природные пептиды этого типа, так называемые лейциновые зипперы, характеризуются периодическим появлением лейцина (каждый седьмой остаток) и других гидрофильных остатков (например, валина) также каждый седьмой остаток. Поскольку эти принципы теперь являются понятными (O'Shea et al. 1991, 1992, цитированные ссылки), последовательность может быть изменена введением остатка, который делает ассоциацию гомодимеров неблагоприятный, но благоприятствует ассоциации гетеродимеров. Такое изменение последовательности может, например, включать вставку заряженных мостиков, так что в гомодимерах подобные заряды отталкивают друг друга, а в гетеродимере противоположные заряды притягивают друг друга (смотри ниже).

Настоящее изобретение также может удлинять бифункциональные миниантитела. В этом случае должны быть использованы устройства димеризации (интеркалирующие пептиды), которые смогут позволить только образование гетеродимеров, а не гомодимеров. Предпочтительными вариантами этой части изобретения являются две различные скрученные спирали, такие как встречающиеся в природе лейциновые зипперы, например, из белков транскрипционного фактора jun и fos (O'Shea et al., 1989, Science 245, 646 - 648).

В другом варианте изобретения константная scFv-петля-спираль может быть удлинена с С-конца с получением в результате слитого белка. Например, слияние с ферментом может быть выполнено для использования таких двухвалентных конструкций в диагностике. Такими ферментами являются, например, щелочная фосфатаза, люциферазы или пероксидаза хрена. Преимущество такого слитого белка антитело-фермент будет в том, что двухвалентность антитела будет приводить к усилению связывания с поверхностно связанным антигеном. Преимущество по сравнению со слитым белком, приготовленным по традиционной технологии (а именно химическим сочетанием антитела с выбранным ферментом) будет в большей согласованности от партии к партии, гомогенности продукта и намного большей простоте способа получения, а именно из E. coli в одну стадию.

Таким же образом миниантитела могут быть удлинены с С-конца включением токсина. Такие иммунотоксины должны быть двухвалентными или даже биспецифическими и, следовательно, сочетают преимущества таких фрагментов антител, связанных выше, с преимуществами, известными из опухолевой терапии для иммунотоксинов. Подобным образом связывающий металл пептид или белок может быть связан генетически для применения в радиоиммунотерапии или при создании изображений опухоли. Такие же преимущества для любого генетически кодируемого гибридного белка будут справедливы, как приведено выше для слияний антитело-фермент.

В другом варианте изобретения может быть получена конструкция типа scFv-петля-спираль для димеризации с другим слитым белком в область димеризации, полностью аналогично тому, что написано выше для образования биспецифических миниантител. Таким образом scFv-фрагмент, например, должен быть точно соответствующим спирали fos белка. Такой чужеродный белок, который может быть сделан для образования гетеродимеров с scFv фрагментом, включает ферменты, полезные в диагностике, токсины, связывающие металл пептиды или белки, полезные в радиоиммунотерапии или при создании радиоизображений.

Используя принципы настоящего изобретения, представленные здесь, области димеризации также могут служить для целей очистки. Рекомбинантный белок любого вида может быть слит в область димеризации, например в петлю-fos-зиппер. После соэкспрессии с scFv-петля-jun гетеродимер может быть очищен в одну стадию на аффинной колонке для scFv-специфичности. В альтернативной попытке "противоположный" зиппер, связанный с носителем колонки, "захватывает" белок-петлю-зиппер при проходе через колонку в виде сырого клеточного экстракта. Элюирование чистого слитого белка из колонки возможно при использовании температуры развертывания зиппера. Последующее выделение из области

RU 2128709 C1

RU 2128709 C1

димеризации достигается путем введения протеолитического сайта, например фактора свертывания крови Xa, в петлю (Nagai and Thogerson, 1987, Meth. Enyzmol. 152, 461-481).

Конкретным преимуществом миниантител, описанных в настоящем изобретении, является возможность сборки в Escherichia coli. В случае гомодвухвалентных конструкций используют принцип димеризации, который разрешает образование гомодимеров. Описанные выше примеры включают скрученные спирали (лейциновый зиппер) GCH4 белка дрожжей или спирали из антипараллельного узла 4-х спиралей. В этом случае scFv-фрагмент экспрессируется в присутствии бактериальной сигнальной последовательности и несет на конце гена scFv фрагмента кодоны для петли и димеризационную спираль или спираль-поворот-спираль. Спирали совместимы с секрецией в периплазматическое пространство в E. coli, где белок складывается, образуется дисульфид и происходит сборка. В таких условиях гомодимерные белки образуются сами и могут быть непосредственно выделены в димерной форме.

Если желательны гетеродвухвалентные конструкции, для объединения необходимо два различных фрагмента scFv или один scFv-фрагмент, ассоциированный с другим белком. В предпочтительном варианте настоящего изобретения оба объединяемых белка экспрессируются в одной и той же клетке, предпочтительно одной и той же плазмидой, предпочтительно в виде дицистронного оперона. Конструкция искусственного дицистронного оперона объяснена, например, у Skerra et al. (1991, Protein Eng. 4, 971). Так как объединение должно происходить в периплазме, потому что scFv-фрагмент может складываться только в окисляющей среде, оба белка должны транспортироваться и оба должны соответствовать сигнальной последовательности. Пептиды димеризации должны выбираться таким образом, чтобы они промотировали объединение двух различных белков, но предотвращали объединение соответствующих гомодимеров. Примерами таких белков являются лейциновые зипперные пептиды белков fos и jun (смотри выше).

Когда не экспрессируются в той же клетке, различные scFv-петля-зиппер конструкции должны быть смешаны вместе в виде сырого клеточного экстракта или очищенного белка и обработаны при повышенной температуре. При отсутствии "противоположного" зиппера, например, scFv-петлю-jun-зиппер конструкция способна образовать гомодимеры. После кратковременного нагревания до температуры плавления около 40 °C зипперы нежелательного гомодимера раскрываются и образуют намного более стабильный гетеродимер (O'Shea et al. 1992, Cell 68, 699-708). Без повышения температуры образование гетеродимеров in vitro невозможно, как показали эксперименты.

Краткое описание чертежей и последовательностей.

На фиг. 1 представлен scFv-вектор экспрессии pLISC-SE, содержащий scFv-фрагмент.

На фиг. 2 представлен дицистронный scFv-петля-зиппер вектор экспрессии pACK • FyJ.

Фиг. 3 - функциональный ЭЛАЙЗА;

концентрации аффинно очищенных белков, измеренные по $ОД_{280}$ (вертикальная ось) по отношению к молярному числу сайтов связывания на ячейку (горизонтальная ось). Пластины ЭЛАЙЗА покрыты фосфохолин-БСА и очищенные фосфохолин-специфические миниантитела-белки связываются и детектируются McPC603 антисывороткой;

(a) сравнение различных миниантител;

(b) сравнение миниантитела scHLXc с ScFv и цельным IgA.

Фиг. 4 - функциональный Анти-лизоцим ЭЛАЙЗА;

PC афоринно очищенные образцы соэкспрессированного анти-PC-анти-лизоцим биспецифического миниантитела. + и - на горизонтальной оси означает: плюс ингибитор (+) и без ингибитора (-).

Приведенный в конце описания перечень последовательностей относится к номерам идентичности последовательностей (S.I.N):

S. I. N. 1: Целая нуклеотидная и аминокислотная последовательность pLICS-SE вектора.

S. I. N. 2: Генная кассета, кодирующая интеркалирующую антипараллельную спираль-поворот-спираль (нуклеотидная и амионкислотная последовательность).

S. I. N. 3: Генная кассета, кодирующая интеркалирующую спираль-поворот-спираль (нуклеотидная и аминокислотная последовательность).

S. I. N. 4: Генная кассета, кодирующая интеркалирующую jun-зиппер- и IgG3-петля область.

S. I. N. 5: Генная кассета, кодирующая интеркалирующую fos-зиппер- и IgG3-петля область.

S. I. N. 6: Генная кассета, кодирующая интеркалирующую jun-зиппер и сконструированный линкер.

S. I. N. 7: Генная кассета, кодирующая интеркалирующую fos-зиппер и сконструированный линкер.

Пример 1: Конструкция векторов для секретированных одноцепных фрагментов, содержащих сайт рестрикции для вставки генов для интеркалирующих пептидов.

Методики рекомбинантной ДНК основаны на Sambrook et al. (1989, Molecular Cleoning: A laboratory manual. Second edition. Cold. Spring Harbor Laboratory, New York). Функциональную экспрессию одноцепных Fv фрагментов и миниантител в E. coli J.M 83 осуществляют на векторах, подобных pASK-lis c (Skerra et al. 1991, Protein Eng 4, 971). Сайт-направленный мутагенез проводят непосредственно в этих векторах согласно Kunkel et al. (1987, Meth. Enzymol. 154, 367-382), и Geisselsoder et al. (1987, Biotechiques 5, 786-791), используя хелперный фаг M13K07 (Vieira and Messing, 1987, Meth. Enzymol, 153, 3-11). Проводят SDS-PAGE, как описано Fling and Gregerson (1986, Anal. Biochem. 155, 83-88). Измеряют концентрацию аффинно-очищенных белков по $ОД_{280}$, используя расчетные коэффициенты экстинкции (Gill and Von Hippel), 1989, Anal. Biochem. 182, 319-326). Используют вектор, такой как pA SK40 (Skerra et al. , 1991, Protein Eng. 4, 971), который содержит

RU 2128709 C1

RU 2128709 C1

сайт инициации репликации, регуляторный промотор, бактериальную сигнальную последовательность после сайта множественного клонирования, терминатор транскрипции и ориджин для однониточных фагов. Ген для одноцепного Fv-фрагмента сконструирован следующим образом: нуклеотидная последовательность V_H области непосредственно следует за линкерной последовательностью, кодирующей предпочтительно около 15 остатков, предпочтительно последовательностью $(Gby_4\ Ser)_3$, непосредственно следующей за последовательностью V_L области. Альтернативно последовательность V_L области может непосредственно следовать за последовательностью линкера после последовательности V_H области.

Если антитело является известной последовательностью, полный ген scFv-фрагмента может быть объединен из синтетических олигонуколетидов. Детальная экспериментальная процедура синтеза такого гена антитела дана, например, у Pluckthun et al, 1987, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 52, 105-112).

Если гены V_H и V_L областей имеются в других векторах, ген scFv-фрагмента может быть объединен из рестрикционных фрагментов. Например, рестрикционный фрагмент, кодирующий большую часть V_H области, может быть вырезан из другой плазмиды, а фрагмент, кодирующий большую часть V_L области, может быть вырезан из плазмиды. Оставшиеся участки V_L и V_H и линкер для scFv фрагмента могут быть обеспечены синтетическими нуклеотидами, которые должны быть лигированы стандартными методами (Sambrook et al. 1989, выше). Смесь фрагментов лигируют в вектор pA SK40 или подобную плазмиду, содержащую пару подходящих сайтов рестрикции.

Если гены антитела не были клонированы ранее, они могут быть получены непосредственно из гибридомной клетки, продуцирующей антитело по реакции полимеразной цепи (PCR; PCR методология описана у Mc Pherson et al, 1991, PCR-A Practical Approach Oxford University Press, New York). Праймеры, пригодные для амплификации V_H и V_L областей, были даны Orlandi et al, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci; USA 86, 3833-3837; Huse et al, 1989, Science 246, 1275-1281; Larrick et al, 1989, Bio-techonology 7, 934-938. Методология получения мРНК из гибридомы также описана в этих ссылках. Отдельные V_H и V_L гены могут быть клонированы в отдельные векторы и scFv ген объединен в соответствии с принципами, объясненными выше.

Если лигированные фрагменты не приводят в результате к правильной рамке считывания scFv фрагмента, точное слияние с кодонами сигнальной последовательности, находящимися на плазмиде, может быть генерировано сайт-направленным мутагенезом. Конструирование олигонуклеотидов и выполнение возможно любым специалистом в данной области.

Полученная таким образом scFv плазмида экспрессии содержит кодоны бактериальной сигнальной последовательности, непосредственно после первой вариабельной области (V_H или V_L), линкер и вторую вариабельную область (V_L или V_H) под контролем регуляторного промотора.

На 3' конце этого гена, соответствующем С-концу scFv белка, введен единичный сайт рестрикции в плазмиду экспрессии для обеспечения вставки кассеты, кодирующей интеркалирующий пептид. Сайт рестрикции вводится сайт-направленным мутагенезом с использованием метода Кункеля (1987, Meth. Enzynol 154, 367 - 382).

Пример полной последовательности плазмиды экспрессии pLISC-SE подходящего одноцепного Fv для получения взаимопроникающего пептида показан на фиг. 1 и последовательности Идентичности N (S.I.N) 1 (смотри список последовательностей).

Пример 2. Схема и конструкция генной кассеты, кодирующей интеркалирующие пептиды с лейциновым зиппером.

Генная кассета, снабженная сайтами рестрикции, совместимыми с сайтом рестрикции на 3'-конце гена scFv фрагмента, должна кодировать последовательность петли (соединение scFv фрагмента с интеркалирующим пептидом) и сам интеркалирующий пептид. Однако область петли также может быть опущена.

В качестве примера последовательность области верхней петли IgG3 мыши (Danl et al. , 1988, EMBO J. 7,1989 - 1994), за которой следует последовательность лейцин-зипперной последовательности белка GCH4 дрожжей (Oas et al. , 1990, Biochemistry T29, 2891 - 2894), подвергается обратной трансляции (back-translated) в часто используемые кодоны E.coli (S.I.N.:2). Синтезируют олигонуклеотиды и лигируют в вектор pLISC-SE, предварительно переваренный EcoRI и Hinol III.

Пример 3. Схема и конструкция генной кассеты, кодирующей интеркалирующие пептиды четырехспирального узла.

Аналогично примеру 2, последовательность области верхней петли IgG3 мыши, за которой следует последовательность спираль-поворот-спираль узла четырех спиралей (Eisenberg et al. 1986, выше) подвергается обратной трансляции в часто используемые кодоны E.coli. Олигонуклеотиды синтезируют и лигируют в вектор pLISC-SE, ранее переваренный EcoRI и Hinol III.

Пример 4. Схема и конструкция двух генных кассет, кодирующих интеркалирующие пептиды лейцин-зиппера и их коэкспрессия.

Аналогично примеру 2, последовательность области верхней петли IgG3 мыши, за которой следует последовательность зипперной последовательности jun белка (O'Shea et al, 1992, выше), подвергается обратной трансляции часто в используемые кодоны E. coli (S.I.N.:4). Синтезируют олигомеры и лигируют в вектор p LISC-SE, предварительно переваренный EcoRI и Hinol III.

В параллельной реакции последовательность области верхней петли машинного IgG3, за которой следует последовательность зипперной последовательности fos белка (O'Shea et al., 1992, Cell 68, 699 - 708) подвергают

RU 2128709 C1

RU 2128709 C1

обратной трансляции в часто используемые кодоны E. coli (S.I.N.:5). Синтезируют олигонуклеотиды и лигируют в вектор p LISC-SE, предварительно переваренный EcoRI и Hinol III. Итак, каждый из двух векторов кодирует различный scFv фрагмент антитела, следующий за пептидной петлей и различным лейцин-зипперным пептидом. Для коэкспрессии обоих scFv фрагментов целый scFv -петля-зиппер ген fos-содержащего продукта вырезают из вектора как Xba I - Hinol III фрагмент и лигируют в вектор, p LISC-SE - scFv - jun, содержащий уже scFv ген другого антитела.

Вновь полученный вектор затем экспрессирует scFv1 - линкер$_1$ -fos - зиппер и scFv2 -линкер$_2$ - jun - зиппер из одного промотора как дицистронный оперон.

Улучшенная последовательность для области петли в контексте fos и jun зипперов дана в S.I.N.:6 и 7. Эта петля короче и, следовательно, не восприимчива к протеолизу. В случаях, когда расстояние между двумя сайтами связывания является менее важным, такие укороченные петли могут быть выгодными. В этом случае "хвост" scFv фрагмента уже укорочен и EcoRI сайт, который получает гены для взаимопроникающих пептидов, уже сдвинулся на четыре остатка выше.

Пример 5: Очистка двухвалентного миниантитела из E coli.

Выращивают E. coli J. M 83, несущий плазмиду, сконструированную, как в примерах 2 и 3, до ОД 550 из 0,5 и индуцируют IPTG при конечной концентрации 1 мМ. Клетки центрифугируют, ресуспендируют в BBS-буфере (200 мМ Na-борат, 160 мМ NaCl pH 8,0) и суспензию пропускают через френч-пресс. В этих примерах используют фосфорилхолин-связывающее мини-антитело. Миниантитело очищают пропусканием через фосфорилхолин-афинный хроматограф, как описано (Chesebro and Metzger, 1972, Biochemistry 11, 766 - 771).

Пример 6: Очистка биспецифического мини-антитела из E.coli.

Выращивают E. coli J. M83, несущий плазмиду, сконструированную как в примерах 2l и 3 и содержащую дицистронный структуральный ген для двух различных scFv (фиг. 2), до ОД 550 при 0,5 и индуцируют IPTG при конечной концентрации 1 мМ. Клетки центрифугируют, ресуспендируют в BBS-буфере (200 мМ Na-борат, 160 мМ NaCl), pH 8,0) и пропускают суспензию через френч-пресс.

В этом примере используют биспецифическое миниантитело, содержащее специфичность как к фосфорилхолину, так и к бензоилампициллину. Миниантитело очищают пропусканием через фосфорилаффинный хроматограф, как описано (Chesebro and Metzger, 1972, выше).

Пример 7: Поверхностное связывание двухвалентных миниантител.

Покрывают пластины ЭЛАЙЗА (Nunc), Macrosorb) (400 г/мл фосфохолин-BSA в PBS-фубере/20 мМ фосфата, pH 7,2, 115 мМ NaCl). Готовят гаптеновый реагент из нитрофенилфосфохолина (Sigma), который восстанавливают и диазотируют, по существу как описано (Chesebro and Metzger, 1972, выше) и проводят реакцию азосочетания с BSA (Sigma) в боратно-солевом буфере (52,5 мМ бората натрия, pH 120 мМ NaCl) при 4 °C в течение 48 часов с последующим диализом против PBS. После блокирования непокрытой поверхности пластины 5% снятым молоком (Nestle) в PBS буфере в течение по крайней мере 2 часов периплазматический экстракт или очищенный белок инкубируют в BBS буфере на пластине в течение 90 минут при комнатной температуре. После тщательной промывки (3 раза) оставшиеся фрагменты функционального антитела детектируют в соответствии со стандартными процедурами (Harlow and Lane, 1988, "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Harbor Labor. 555 - 592) с кроличьей анти-McPC603 сывороткой и анти-кроличьим иммуноглобулином, связанным с пероксидазой (Sigma) согласно Gallati (1979, Clin Chem, Clin. Biochem 17, 1-4).

Для всех конструкций миниантител наблюдается огромный прирост при связывании и, следовательно, чувствительности по сравнению с мономерным scFv фрагментом. Это согласуется с одновременным связыванием двух или даже больше сайтов связывания на одной и той же поверхности. Такая авидность слитого белка scHLXc сравнима с природным антителом McPC603, которое не может быть детектировано ЭЛАЙЗА с антигенным покрытием, тогда как мономерный scFv фрагмент может быть детектирован только при концентрациях, в 100 раз больших (фиг. 3a, b). Любое связывание почти полностью ингибируется растворимым гаптеном, за исключением мономерного фрагмента. Термодинамическое сродство природного антитела к растворимому фосфохолину составляет примерно 1,6 S 10^5 M^{-1} и, следовательно, является относительно слабым (Metzger et al, 1971, Proceeding of the Ist Congress of Immunology, Academic Press, New Iork, стр 253 - 267) и очевидно является недостаточным для комплекса мономерный фрагмент-гаптен, чтобы выдержать повторные стадии промывки функциональной ЭЛАЙЗА (Kemeny and Challa Combe, 1988, "ELISA and other solid phase immunoasays", Wiley and Sons, New Iork).

Пример 8: Поверхностное связывание бифункциональных миниантител.

Коэкспрессированные бифункциональные миниантитела, распознающие фосфорилхолин одним плечом и лизоцим другим плечом, очищают фосфохолин (PC) афинной хроматографией и испытывают на специфичность к лизоциму. ЭЛАЙЗА-пластины покрывают лизоцимом и проводят анализ ЭЛАЙЗА, как описано в примере 7. Три различных препарата показывают связывание с антиген-поверхностью, которое полностью ингибируется растворимым лизоцимом (фиг. 4).

Формула изобретения:

1. Способ получения димерного одноцепочечного слитого белка, содержащего две мономерные единицы, включающий конструирование последовательности ДНК первой и второй мономерных единиц, приготовление рекомбинантного экспрессирующего вектора, трансформацию хозяйских клеток экспрессирующим вектором, культивирование трансформированных

RU 2128709 C1

RU 2128709 C1

клеток и выделение целевого продукта, экспрессированного в клетке или среде, отличающийся тем, что конструируют последовательность ДНК первой мономерной единицы, кодирующую первый одноцепочечный Fv - фрагмент антитела и первый амфифильный спиральный пептид, способный димеризоваться со вторым амфифильным спиральным пептидом второй мономерной единицы посредством нековалентных взаимодействий, причем каждый амфифильный спиральный пептид содержит 10 - 50 аминокислот, конструируют последовательность ДНК второй мономерной единицы, кодирующую второй одноцепочный Fv - фрагмент антитела с одинаковой или различной специфичностью с первым Fv - фрагментом, и второй амфифильный спиральный пептид, одинаковый или различный с амфифильным пептидом в первой единице, при этом сконструированные последовательности клонируют в одном экспрессирующем векторе.

2. Способ получения димерного одноцепочечного слитого белка, содержащего две мономерные единицы, включающий конструирование последовательности ДНК первой и второй мономерных единиц, приготовление рекомбинантных экспрессирующих векторов, трансформацию хозяйской клетки экспрессирующими векторами, культивирование трансформированных клеток и выделение целевого продукта, экспрессируемого в клетке или среде, отличающийся тем, что конструируют последовательность ДНК первой мономерной единицы, кодирующую первый одноцепочечный Fv - фрагмент антитела и первый амфифильный спиральный пептид, способный димеризоваться со вторым амфифильным спиральным пептидом второй мономерной единицы посредством нековалентных взаимодействий, причем каждый амфифильный спиральный пептид содержит 10 - 50 аминокислот, конструируют последовательность ДНК второй мономерной единицы, кодирующую второй одноцепочечный Fv - фрагмент антитела с одинаковой или различной специфичностью с первым Fv - фрагментом, и второй амфифильный спиральный пептид, одинаковый или различный с амфифильным пептидом в первой единице, при этом сконструированные последовательности клонируют в различных экспрессирующих векторах.

3. Способ по п.1 или 2, отличающийся тем, что последовательность ДНК первой или второй мономерной единицы дополнительно включает линкер, шарнирный район или его часть, клонированный между одноцепочечным Fv - фрагментом антитела и амфифильным спиральным пептидом.

RU 2128709 C1

RU 2128709 C1

Список последовательностей

Последвательность : 1

```
ACCCGACACC ATCGAATGGC GCAAAACCTT TCGCGGTATG GCATGATAGC      50
GCCCGGAAGA GAGTCAATTC AGGGTGGTGA ATGTGAAACC AGTAACGTTA     100
TACGATGTCG CAGAGTATGC CGGTGTCTCT TATCAGACCG TTTCCCGCGT     150
GGTGAACCAG GCCAGCCACG TTTCTGCGAA AACGCGGGAA AAAGTGGAAG     200
CGGCGATGGC GGAGCTGAAT TACATTCCCA ACCGCGTGGC ACAACAACTG     250
GCGGGCAAAC AGTCGTTGCT GATTGGCGTT GCCACCTCCA GTCTGGCCCT     300
GCACGCGCCG TCGCAAATTG TCGCGGCGAT TAAATCTCGC GCCGATCAAC     350
TGGGTGCCAG CTGTGTGGTG TCGATGGTAG AACGAAGCGG CGTCGAAGCC     400
TGTAAAGCGG CGGTGCACAA TCTTCTCGCG CAACGCGTCA GTGGGCTGAT     450
CATTAACTAT CCGCTGGATG ACCAGGATGC CATTGCTGTG GAAGCTGCCT     500
GCACTAATGT TCCGGCGTTA TTTCTTGATG TCTCTGACCA GACACCCATC     550
AACAGTATTA TTTTCTCCCA TGAAGACGGT ACGCGACTGG GCGTGGAGCA     600
TCTGGTCGCA TTGGGTCACC AGCAAATCGC GCTGTTAGCG GGCCCATTAA     650
GTTCTGTCTC GGCGCGTCTG CGTCTGGCTG GCTGGCATAA ATATCTCACT     700
CGCAATCAAA TTCAGCCGAT AGCGGAACGG GAAGGCGACT GGAGTGCCAT     750
GTCCGGTTTT CAACAAACCA TGCAAATGCT GAATGAGGGC ATCGTTCCCA     800
CZGCGATGCT GGTTGCCAAC GATCAGATGG CGCTGGGCGC AATGCGCGCC     850
ATTACCGAGT CCGGGCTGCG CGTTGGTGCG GATGTCTCGG TAGTGGGATA     900
CGCAGATACC GAAGACAGCT CATGTTATAT CCCGCCGTTA ACCACCATCA     950
AACAGGATTT TCGCCTGCTG GGGCAAACCA GCGTGGACCG CTTGCTGCAA    1000
CTCTCTCAGG GCCAGGCGGT GAAGGGCAAT CAGCTGTTGC CCGTCTCACT    1050
GGTGAAAAGA AAAACCACCC TGGCGCCCAA TACGCAAACC GCCTCTCCCC    1100
GCGCGTTGGC CGATTCATTA ATGCAGCTGG CACGACAGGT TTCCCGACTG    1150
GAAAGCGGGC AGTGAGCGCA ACGCAATTAA TGTGAGTTAG CTCACTCATT    1200
AGGCACCCCA GGCTTTACAC TTTATGCTTC CGGCTCGTAT GTTGTGTGGA    1250
ATTGTGAGCG GATAACAATT TCACACAGGA AACAGCTATG ACCATGATTA    1300
CGAATTTCTA GATAACGAGG GCAAAAA---ATG AAA AAG ACA GCT ATC    1345
                                  Met Lys Lys Thr Ala Ile
                                   1               5
GCG ATT GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC GCT ACC GTA GCG CAG    1387
Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gly Phe Ala Thr Val Ala Gln
           10                  15                  20
GCC GAA GTT AAA CTG GTA GAG TCT GGT GGT GGT CTG GTA CAG    1429
Ala Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
                25                  30
CCG GGT GGA TCC CTG CGT CTG TCT TGC GCT ACC TCA GGT TTC    1471
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe
 35                  40                  45
ACC TTC TCT GAC TTC TAC ATG GAG TGG GTA CGT CAG CCC CCG    1513
Thr Phe Ser Asp Phe Tyr Met Glu Trp Val Arg Gln Pro Pro,
      50                  55                  60
GGT AAA CGT CTC GAG TGG ATC GCA GCT AGC CGT AAC AAA GGT    1555
Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile Ala Ala Ser Arg Asn Lys Gly
           65                  70                  75
AAC AAG TAT ACC ACC GAA TAC AGC GCT TCT GTT AAA GGT CGT    1597
Asn Lys Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg
                80                  85                  90
```

RU 2128709 C1

RU 2128709 C1

Продолжение последовательности : 1

```
TTC ATC GTT TCT CGT GAC ACT AGT CAA TCG ATC CTG TAC CTG      1639
Phe Ile Val Ser Arg Asp Thr Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu
                    95                  100
CAG ATG AAT GCA TTG CGT GCT GAA GAC ACC GCT ATC TAC TAC      1681
Gln Met Asn Ala Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr
105                 110                 115
TGC GCG CGT AAC TAC TAT GGC AGC ACT TGG TAC TTC GAC GTT      1723
Cys Ala Arg Asn Tyr Tyr Gly Ser Thr Trp Tyr Phe Asp Val
    120                 125                 130
TGG GGT GCA GGT ACC ACC GTT ACC GTT TCT TCT GGT GGT GGT      1765
Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
        135                 140                 145
GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GAT ATC      1807
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile
                150                 155                 160
GTT ATG ACC CAG TCT CCG AGC TCT CTG TCT GTA TCT GCA GGT      1849
Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Ala Gly
                    165                 170
GAA CGT GTT ACC ATG TCT TGC AAA TCT TCT CAG TCT CTG CTG      1891
Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
175                 180                 185
AAC TCT GGT AAC CAG AAA AAC TTC CTG GCG TGG TAT CAG CAA      1933
Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
    190                 195                 200
AAG CCT GGC CAA CCG CCG AAA CTG CTG ATC TAC GGT GCG TCG      1975
Lsy Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser
        205                 210                 215
ACC CGT GAA TCT GGT GTT CCG GAC CGT TTT ACC GGT AGC GGT      2017
Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly
                220                 225                 230
AGC GGT ACC GAC TTC ACT CTG ACC ATC TCT TCT GTA CAG GCT      2059
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
                    235                 240
GAA GAT CTG GCT GTT TAC TAC TGT CAA AAC GAC CAC TCT TAC      2101
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Asp His Ser Tyr
245                 250                 255
CCG CTG ACC TTT GGC GCC GGC ACC AAA CTG GAA CTG AAG CGC      2143
Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
    260                 265                 270
GCT AAC GGT GAA TTC-TGATAAGCTTGA CCTGTGAAGT GAAAAATGGC      2190
Ala Asn Gly Glu Phe *
        275
GCACATTGTG CGACATTTTT TTTGTCTGCC GTTTACCGCT ACTGCGTCAC      2240
GGATCCCCAC GCGCCCTGTA GCGGCGCATT AAGCGCGGCG GGTGTGGTGG      2290
TTACGCGCAG CGTGACCGCT ACACTTGCCA GCGCCCTAGC GCCCGCTCCT      2340
TTCGCTTTCT TCCCTTCCTT TCTCGCCACG TTCGCCGGCT TTCCCCGTCA      2390
AGCTCTAAAT CGGGGCATCC CTTTAGGGTT CCGATTTAGT GCTTTACGGC      2440
ACCTCGACCC CAAAAAACTT GATTAGGGTG ATGGTTCACG TAGTGGGCCA      2490
TCGCCCTGAT AGACGGTTTT TCGCCCTTTG ACGTTGGAGT CCACGTTCTT      2540
TAATAGTGGA CTCTTGTTCC AAACTGGAAC AACACTCAAC CCTATCTCGG      2590
TCTATTCTTT TGATTTATAA GGGATTTTGC CGATTTCGGC CTATTGGTTA      2640
```

RU 2128709 C1

RU 2128709 C1

Продолжение последовательности : 1

```
AAAAATGAGC TGATTTAACA AAAATTTAAC GCGAATTTTA ACAAAATATT   2690
AACGTTTACA ATTTCAGGTG GCACTTTTCG GGGAAATGTG CGCGGAACCC   2740
CTATTTGTTT ATTTTTCTAA ATACATTCAA ATATGTATCC GCTCATGAGA   2790
CAATAACCCT GATAAATGCT TCAATAATAT TGAAAAAGGA AGAGTATGAG   2840
TATTCAACAT TTCCGTGTCG CCCTTATTCC CTTTTTTGCG GCATTTTGCC   2890
TTCCTGTTTT TGCTCACCCA GAAACGCTGG TGAAAGTAAA AGATGCTGAA   2940
GATCAGTTGG GTGCACGAGT GGGTTACATC GAACTGGATC TCAACAGCGG   2990
TAAGATCCTT GAGAGTTTTC GCCCCGAAGA ACGTTTTCCA ATGATGAGCA   3040
CTTTTAAAGT TCTGCTATGT GGCGCGGTAT TATCCCGTAT TGACGCCGGG   3090
CAAGAGCAAC TCGGTCGCCG CATACACTAT TCTCAGAATG ACTTGGTTGA   3140
GTACTCACCA GTCACAGAAA AGCATCTTAC GGATGGCATG ACAGTAAGAG   3190
AATTATGCAG TGCTGCCATA ACCATGAGTG ATAACACTGC GGCCAACTTA   3240
CTTCTGACAA CGATCGGAGG ACCGAAGGAG CTAACCGCTT TTTTGCACAA   3290
CATGGGGGAT CATGTAACTC GCCTTGATCG TTGGGAACCG GAGCTGAATG   3340
AAGCCATACC AAACGACGAG CGTGACACCA CGATGCCTGT AGCAATGGCA   3390
ACAACGTTGC GCAAACTATT AACTGGCGAA CTACTTACTC TAGCTTCCCG   3440
GCAACAATTA ATAGACTGGA TGGAGGCGGA TAAAGTTGCA GGACCACTTC   3490
TGCGCTCGGC CCTTCCGGCT GGCTGGTTTA TTGCTGATAA ATCTGGAGCC   3540
GGTGAGCGTG GGTCTCGCGG TATCATTGCA GCACTGGGGC CAGATGGTAA   3590
GCCCTCCCGT ATCGTAGTTA TCTACACGAC GGGGAGTCAG GCAACTATGG   3640
ATGAACGAAA TAGACAGATC GCTGAGATAG GTGCCTCACT GATTAAGCAT   3690
TGGTAACTGT CAGACCAAGT TTACTCATAT ATACTTTAGA TTGATTTAAA   3740
ACTTCATTTT TAATTTAAAA GGATCTAGGT GAAGATCCTT TTTGATAATC   3790
TCATGACCAA AATCCCTTAA CGTGAGTTTT CGTTCCACTG AGCGTCAGAC   3840
CCCGTAGAAA AGATCAAAGG ATCTTCTTGA GATCCTTTTT TTCTGCGCGT   3890
AATCTGCTGC TTGCAAACAA AAAAACCACC GCTACCAGCG GTGGTTTGTT   3940
TGCCGGATCA AGAGCTACCA ACTCTTTTTC CGAAGGTAAC TGGCTTCAGC   3990
AGAGCGCAGA TACCAAATAC TGTCCTTCTA GTGTAGCCGT AGTTAGGCCA   4040
CCACTTCAAG AACTCTGTAG CACCGCCTAC ATACCTCGCT CTGCTAATCC   4090
TGTTACCAGT GGCTGCTGCC AGTGGCGATA AGTCGTGTCT TACCGGGTTG   4140
GACTCAAGAC GATAGTTACC GGATAAGGCG CAGCGGTCGG GCTGAACGGG   4190
GGGTTCGTGC ACACAGCCCA GCTTGGAGCG AACGACCTAC ACCGAACTGA   4240
GATACCTACA GCGTGAGCTA TGAGAAAGCG CCACGCTTCC CGAAGGGAGA   4290
AAGGCGGACA GGTATCCGGT AAGCGGCAGG GTCGGAACAG GAGAGCGCAC   4340
GAGGGAGCTT CCAGGGGGAA ACGCCTGGTA TCTTTATAGT CCTGTCGGGT   4390
TTCGCCACCT CTGACTTGAG CGTCGATTTT TGTGATGCTC GTCAGGGGGG   4440
CGGAGCCTAT GGAAAAACGC CAGCAACGCG GCCTTTTTAC GGTTCCTGGC   4490
CTTTTGCTGG CCTTTTGCTC ACATG                              4515
```

RU 2128709 C1

RU 2128709 C1

Последовательность : 2

```
GGT GAA TTC CCC AAA CCT AGT ACT CCC CCT GGC AGC AGC CGC ATG 45
Gly Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Arg Met
1   ↑           5                   10                  15
            └--------- IgG3-hinge ------------------┘ └------
AAA CAG CTG GAA GAT AAA GTT GAA GAG CTT CTT TCG AAA AAC TAC 90
Lys Gln Leu Glu Asp Lys Val Glu Glu Leu Leu Ser Lys Asn Tyr
                20                  25                  30
------------------------ GCN4-zipper ------------------------
CAC CTC GAA AAT GAA GTT GCG CGC CTC AAA AAA CTT GTT GGT GAA 135
His Leu Glu Asn Glu Val Ala Arg Leu Lys Lys Leu Val Gly Glu
                35                  40                  45
-----------------------------------------------------------
CGC TGATAAGCTT GAC                                          151
Arg     ↑
---┘stop
```

Последовательность : 3

```
GGT GAA TTC CCC AAA CCT AGC ACC CCC CCT GGC AGC AGT GGT GAA 45
Gly Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Glu
1   ↑           5                   10                  15
            └-------- IgG3-hinge ------------------┘ └------
CTG GAA GAG CTG CTT AAG CAT CTT AAA GAA CTT CTG AAG GGC CCC 90
Leu Glu Glu Leu Leu Lys His Leu Lys Glu Leu Leu Lys Gly Pro
                20                  25                  30
------------- bundle-helix A ---------------------------┘ └--
CGC AAA GGC GAA CTC GAG GAA CTG CTG AAA CAT CTG AAG GAG CTG 135
Arg Lys Gly Glu Leu Glu Glu Leu Leu Lys His Leu Lys Glu Leu
                35                  40                  45
-turn---┘ └---------------- bundle-helix B -------------------
CTT AAA GGT GAA TTC TGATAAGCTT GACCTGTGAA GTGAAAAAAT G      191
Leu Lys Gly Glu Phe
            ↑   50     ↑
------------------┘stop
```


RU 2128709 C1

Последовательность :4

```
GGT GAA TTC CCC AAA CCT AGT ACT CCC CCT GGC AGC AGC CGT ATC 45
Gly Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Arg Ile
1   ↑           5                   10                  15
            └------IgG3-hinge-----------------------┘ └------
GCT CGT CTC GAG GAA AAA GTT AAA ACC CTG AAA GCT CAG AAC TCC 90
Ala Arg Leu Glu Glu Lys Val Lys Thr Leu Lys Ala Gln Asn Ser
                20                  25                  30
---------------------- jun-zipper -------------------------
GAA CTG GCT TCC ACC GCT AAC ATG CTG CGT GAA CAG GTT GCT CAG 135
Glu Leu Ala Ser Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln Val Ala Gln
                35                  40                  45
---------------------- jun-zipper -------------------------
CTG AAA CAG AAA GTT ATG AAC TAC TGATAAGCTT GACCTGTGAA G     180
Leu Lys Gln Lys Val Met Asn Tyr
                50                  ↑
-----------------------------┘ stop
```

Последовательность : 5

```
GGT GAA TTC CCC AAA CCT AGT ACT CCC CCT GGC AGC AGC CTG ACC 45
Gly Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Leu Thr
1   ↑           5                   10                  15
            └------------- IgG3-hinge --------------┘ └-----
GAC ACC CTG CAG GCT GAA ACC GAC CAG CTG GAA GAC AAA AAA TCC 90
Asp Thr Leu Gln Ala Glu Thr Asp Gln Leu Glu Asp Lys Lys Ser
                20                  25                  30
----------------------- fos-zipper -------------------------
GCT CTG CAG ACC GAA ATC GCT AAC CTG CTG AAA GAA AAA GAA AAA 135
Ala Leu Gln Thr Glu Ile Ala Asn Leu Leu Lys Glu Lys Glu Lys
                35                  40                  45
----------------------- fos-zipper -------------------------
CTG GAA TTT ATC CTG GCT GCT TAC TGATAAGCTT GACCTGTGAA G     180
Leu Glu Phe Ile Leu Ala Ala Tyr
                50                  ↑
-----------------------------┘ stop
```


RU 2128709 C1

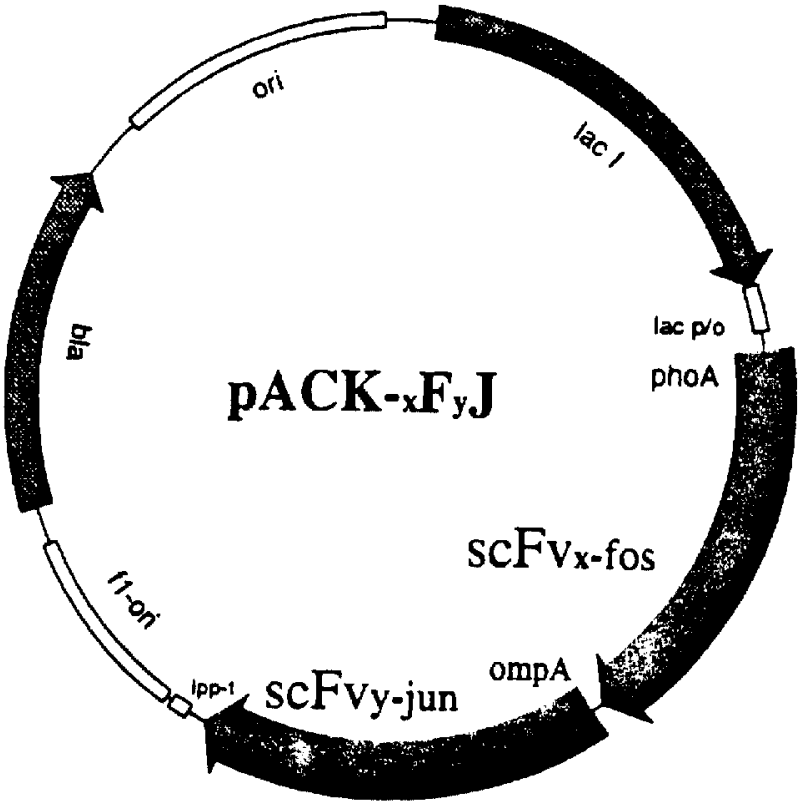
Последовательность : 6

```
GGT GAA TTC CCG TCT GGT AAC GAA GCT CGT ATC GCT CGT CTC GAG 45
Gly Glu Phe Pro Ser Gly Asn Glu Ala Arg Ile Ala Arg Leu Glu
1   ↑           5                   10                  15
            └---- linker ----------┘ └---------------------
GAA AAA GTT AAA ACC CTG AAA GCT CAG AAC TCC GAA CTG GCT TCC 90
Glu Lys Val Lys Thr Leu Lys Ala Gln Asn Ser Glu Leu Ala Ser
                20                  25                  30
---------------------- jun-zipper ----------------------
ACC GCT AAC ATG CTG CGT GAA CAG GTT GCT CAG CTG AAA CAG AAA 135
Thr Ala Asn Met Leu Arg Glu Gln Val Ala Gln Leu Lys Gln Lys
                35                  40                  45
---------------------- jun-zipper ----------------------
GTT ATG AAC TAC TGATAAGCTT GACCTGTGAA GTGAAAAATG GCG        180
Val Met Asn Tyr     ↑
--------------┘ stop
```

Последовательность : 7

```
GGT GAA TTC GGT CCG TCT GGT AAC GAA CTG ACC GAC ACC CTG CAG 45
Gly Glu Phe Gly Pro Ser Gly Asn Glu Leu Thr Asp Thr Leu Gln
1   ↑           5                   10                  15
            └--- linker ----------┘ └----- fos-zipper -------
GCT GAA ACC GAC CAG CTG GAA GAC AAA AAA TCC GCT CTG CAG ACC 90
Ala Glu Thr Asp Gln Leu Glu Asp Lys Lys Ser Ala Leu Gln Thr
                20                  25                  30
------------------- fos-zipper -------------------------
GAA ATC GCT AAC CTG CTG AAA GAA AAA GAA AAA CTG GAA TTT ATC 135
Glu Ile Ala Asn Leu Leu Lys Glu Lys Glu Lys Leu Glu Phe Ile
                35                  40                  45
------------------- fos-zipper -------------------------
CTG GCT GCT TAC TGATAAGCTT GACCTGTGAA GTGAAAAATGGCG         180
Leu Ala Ala Tyr     ↑
--------------┘ stop
```


RU 2128709 C1

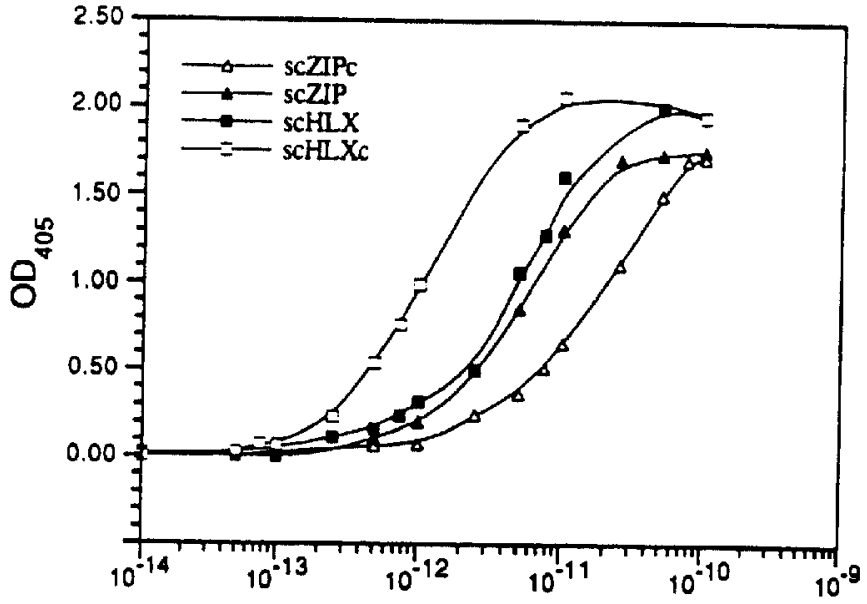


Фиг.2

RU 2128709 C1

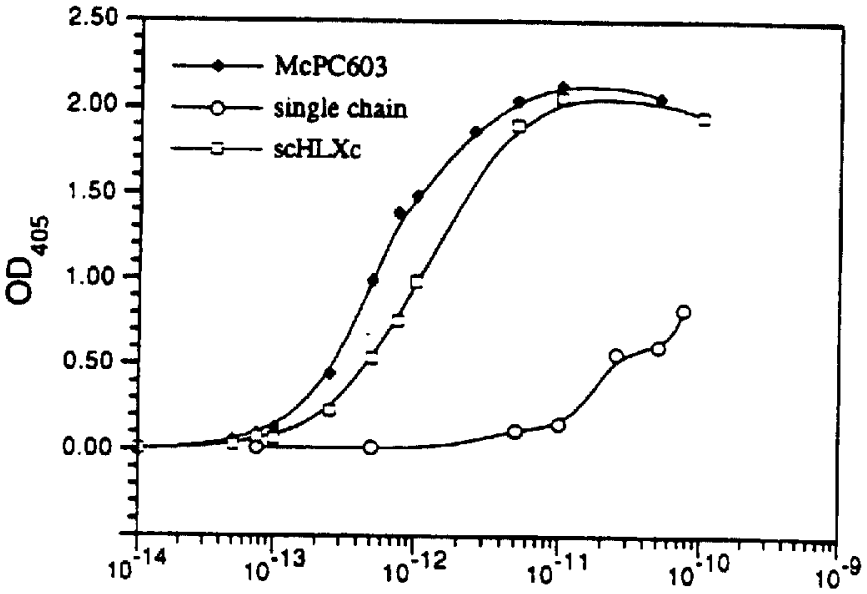
RU 2128709 C1

a



mol сайт связываня

b

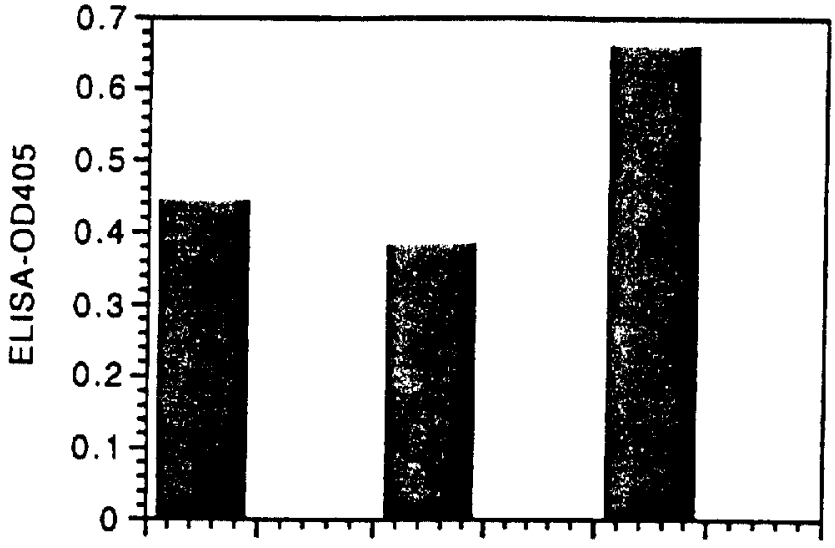


mol сайт связываня

Фиг.3

RU 2128709 C1

RU 2128709 C1



Фиг.4

RU 2128709 C1

RU 2128709 C1