



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 16/2809 (2006.01); C07K 16/2863 (2006.01); C07K 16/30 (2006.01); C07K 16/46 (2006.01)

(21)(22) Заявка: 2013129694, 30.11.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
30.11.2011Дата регистрации:
01.08.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

30.11.2010 JP 2010-266760;

31.05.2011 JP 2011-121771;

31.10.2011 JP 2011-238818

(43) Дата публикации заявки: 10.01.2015 Бюл. № 1

(45) Опубликовано: 01.08.2018 Бюл. № 22

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 01.07.2013

(86) Заявка РСТ:

JP 2011/077603 (30.11.2011)

(87) Публикация заявки РСТ:

WO 2012/073985 (07.06.2012)

Адрес для переписки:

105082, Москва, Спартаковский пер., д. 2, стр. 1,
секция 1, этаж 3, "ЕВРОМАРКПАТ"

(72) Автор(ы):

НЕЗУ Юнити (JP),

ИСИГИРО Такаhiro (JP),

НАРИТА Атсуси (JP),

САКАМОТО Акиса (JP),

КАВАИ Юмико (JP),

ИГАВА Томоюки (JP),

КАРАМОТИ Таити (JP)

(73) Патентообладатель(и):

ЧУГАИ СЕЙЯКУ КАБУСИКИ КАЙСЯ
(JP)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: AMANN M et al., Therapeutic
window of an EpCAM/CD3-specific BiTE
antibody in mice is determined by a
subpopulation of EpCAM-expressing
lymphocytes that is absent in humans, Cancer
Immunol Immunother., 2009 Jan, Vol.58, No.1,
abstr. MCEARCHERN JA et al., Engineered
anti-CD70 antibody with multiple effector
functions exhibits in vitro and in vivo (см.
прод.)

(54) ИНДУЦИРУЮЩИЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ АГЕНТ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии, конкретно к получению полипептидных комплексов, обладающих цитотоксичностью в отношении раковых клеток, что может быть использовано в медицине. Путем замены антигенсвязывающего домена получают полипептидный комплекс, содержащий раковый антигенсвязывающий домен, любой из Fc-доменов SEQ ID NO: 23-26 с мутациями и CD3-связывающий домен, а также полинуклеотид,

кодирующий указанный полипептидный комплекс, вектор для его экспрессии, клетку-хозяина для его получения и терапевтический агент, содержащий указанный комплекс. Изобретение позволяет получить новый полипептидный комплекс, который сохраняет сильную противораковую цитотоксичность и улучшенные характеристики безопасности, имеет продолжительное время полужизни в крови. 6 н. и 15 з.п. ф-лы, 26 ил., 3 табл., 11 пр.

(56) (продолжение):
antitumor activities, Blood., 2007 Feb 1, Vol.109, No.3, pp.1185-92. MERCHANT AM et al., An efficient route to human bispecific IgG, Nat Biotechnol. 1998 Jul, Vol.16, No.7, abstr. MICHAEL A STRÖHLEIN et al., Induction of anti-tumor immunity by trifunctional antibodies in patients with peritoneal carcinomatosis, J Exp Clin Cancer Res., 2009, Vol.28, No.1, pp.1-10. RU 2355705 C2, 20.05.2009.

R U 2 6 6 3 1 2 3 C 2

R U 2 6 6 3 1 2 3 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 16/46 (2006.01)*C07K 16/28* (2006.01)*C12N 15/13* (2006.01)*C12N 15/09* (2006.01)*C12N 15/63* (2006.01)*C12N 5/10* (2006.01)*A61K 39/395* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07K 16/2809 (2006.01); *C07K 16/2863* (2006.01); *C07K 16/30* (2006.01); *C07K 16/46* (2006.01)(21)(22) Application: **2013129694**, 30.11.2011(24) Effective date for property rights:
30.11.2011Registration date:
01.08.2018

Priority:

(30) Convention priority:
30.11.2010 JP 2010-266760;
31.05.2011 JP 2011-121771;
31.10.2011 JP 2011-238818(43) Application published: **10.01.2015** Bull. № 1(45) Date of publication: **01.08.2018** Bull. № 22(85) Commencement of national phase: **01.07.2013**(86) PCT application:
JP 2011/077603 (30.11.2011)(87) PCT publication:
WO 2012/073985 (07.06.2012)

Mail address:

105082, Moskva, Spartakovskij per., d. 2, str. 1,
sektiya 1, etazh 3, "EVROMARKPAT"

(72) Inventor(s):

NEZU Yuniti (JP),
ISIGIRO Takakhiro (JP),
NARITA Atsusi (JP),
SAKAMOTO Akisa (JP),
KAVAI Yumiko (JP),
IGAVA Tomoyuki (JP),
KARAMOTI Taiti (JP)

(73) Proprietor(s):

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA
(JP)**(54) CYTOTOXICITY-INDUCING THERAPEUTIC AGENT**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology, specifically to the preparation of polypeptide complexes having cytotoxicity against cancer cells, which can be used in medicine. By replacing the antigen-binding domain, a polypeptide complex is obtained, which comprises a cancer antigen-binding domain, any of the Fc domains of SEQ ID NO: 23-26 with mutations and a CD3-binding domain, as well as a polynucleotide

encoding said polypeptide complex, an expression vector thereof, a host cell for production thereof, and a therapeutic agent comprising said complex.

EFFECT: invention makes it possible to obtain a novel polypeptide complex that retains strong anticancer cytotoxicity and improved safety characteristics, and has a long half-life in the blood.

21 cl, 26 dwg, 3 tbl, 11 ex

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к полипептидным комплексам, которые позволяют осуществлять лечение рака благодаря их способности приближать Т-клетки к раковым клеткам-мишеням и использованию цитотоксической активности Т-клеток в отношении раковых клеток-мишеней, к способам получения полипептидных комплексов и к терапевтическим агентам, которые содержат указанный полипептидный комплекс в качестве действующего вещества для индукции клеточной цитотоксичности. Настоящее изобретение относится также к фармацевтическим композициям, предназначенным для лечения или предупреждения различных видов рака, которые содержат в качестве действующего вещества указанный выше терапевтический агент для индукции клеточной цитотоксичности, и к терапевтическим способам, заключающимся в применении указанных фармацевтических композиций.

Предпосылки создания изобретения

К настоящему времени в качестве фармацевтических средств для лечения рака разработано множество терапевтических антител, обладающих очень высокой противоопухолевой активностью (непатентный документ 1). Известно, что эти терапевтические антитела проявляют свое противоопухолевое действие на раковые клетки посредством ингибирования сигналов, имеющих решающее значение для роста раковых клеток, индукции сигналов клеточной гибели, антитело-обусловленной клеточнозависимой цитотоксичности (ADCC) или комплементзависимой цитотоксичности (CDC) (непатентный документ 2). ADCC представляет собой цитотоксичность, вызываемую эффекторными клетками, такими как NK-клетки и макрофаги, в отношении связанных с антителом раковых клеток-мишеней, когда Fc-область антитела связывается с Fc-рецептором на эффекторных клетках. При этом комплекс комплемента связывается с комплементсвязывающим сайтом в структуре антитела. CDC представляет собой цитотоксичность, которая имеет место в том случае, когда компонент системы комплемента в комплексе формирует пору в клеточной мембране связанной с антителом клетки, усиливающую приток воды или ионов в клетку. Хотя общепринятые терапевтические антитела обладают очень высокой активностью, до настоящего времени введение указанных антител приводило лишь к неудовлетворительным исходам терапевтического лечения. Таким образом, существует потребность в создании терапевтических антител с более высокой способностью к уничтожению раковых клеток.

Помимо указанных выше антител, которые приобретают ADCC в качестве их противоопухолевого механизма посредством рекрутмента NK-клеток или макрофагов в качестве эффекторных клеток, вызывающие рекрутмент Т-клеток антитела (TR-антитела), которые приобретают цитотоксичность в качестве их противоопухолевого механизма путем рекрутмента Т-клеток в качестве эффекторных клеток, известны с 1980-х годов (непатентные документы 3-5). TR-антитело представляет собой биспецифическое антитело, которое содержит антитело к любой из субъединиц, образующих комплекс Т-клеточного рецептора (TCR) на Т-клетках, в частности, антитело, которое связывается с эpsilon-цепью CD3, и антитело, которое связывается с антигеном на раковых клетках-мишенях. Т-клетка приближается к раковой клетке, когда TR-антитело одновременно связывается как с эpsilon-цепью CD3, так и с раковым антигеном, и это приводит к противоопухолевому действию в отношении раковой клетки благодаря цитотоксической активности Т-клетки.

В качестве TR-антитела известно также антитело, обозначенное как «трехфункциональное антитело» (непатентные документы 6 и 7). Трехфункциональное

антитело представляет собой полное биспецифическое антитело IgG-типа, в котором одно плечо содержит Fab, связывающийся с раковым антигеном, а другое плечо содержит Fab, связывающийся с эpsilon-цепью CD3. Терапевтическое действие в отношении злокачественных асцитов продемонстрировано при введении катумаксомаба, представляющего собой трехфункциональное антитело к ЕpСAM, в перитонеальные полости пациентов со злокачественными асцитами, которые имеют позитивные по экспрессии ЕpСAM раковые клетки. Применение катумаксомаба разрешено в странах Евросоюза для вышеуказанного лечения.

Кроме того, в настоящее время установлено, что TR-антитело, обозначенное как «биспецифическое, привлекающее Т-клетки антитело (ViTE)» обладает сильным противоопухолевым действием (не представляющие собой патент документы 8 и 9). ViTE представляет собой TR-антитело с молекулярной формой, в которой scFv антитела к раковому антигену сцеплен с scFv антитела к эpsilon-цепи CD3 через короткий полипептидный линкер. Известно, что ViTE обладают противоопухолевой активностью, превышающей активность различных известных TR-антител (непатентные документы 9 и 10). В частности, по сравнению с другими TR-антителами ViTE обладают противоопухолевой активностью даже при применении в существенно более низкой концентрации и при более низком соотношении эффекторных клеток/раковых клеток (ЕТ-соотношение). Продemonстрировано также, что их действие может с успехом проявляться без необходимости в предварительной активации эффекторных клеток с помощью IL-2, агонистического антитела к CD28 или др. Блинатумомаб (MT103), который представляет собой ViTE к CD19, обладает более сильной цитотоксической активностью в отношении раковых клеток *in vitro*, чем ритуксан, который, как известно, обладает очень хорошим клиническим действием. Кроме того, чрезвычайно высокая активность блинатумомаба выявлена на фазе I и II проводимых в настоящее время клинических испытаний (непатентный документ 11).

На основе того факта, что катумаксомаб разрешен в качестве терапевтического агента, для которого в клинических условиях продемонстрировано лечебное действие, и что множество ViTE, включая блинатумомаб, обладают сильным противоопухолевым действием, высказано предположение о том, что TR-антитела, которые обеспечивают рекрутмент Т-клеток в качестве эффекторных клеток, могут обладать существенно более высоким потенциалом в качестве противоопухолевого агента по сравнению с общепринятыми антителами, механизм действия которых связан с ADCC.

Однако известно, что трехфункциональное антитело одновременно связывается как с Т-клеткой, так с такой клеткой как NK-клетка или макрофаг, независимым от ракового антигена образом, и в результате рецепторы, которые экспрессируются на клетках, являются перекрестносшитыми, и экспрессия различных цитокинов индуцируется независимым от ракового антигена образом. Предполагается, что системное введение трехфункционального антитела вызывает побочные действия типа «цитокинового шторма» в результате указанной индукции экспрессии цитокинов. Фактически, на фазе I клинического испытания было установлено, что максимальной переносимой дозой при системном введении катумаксомаба пациентам с немелкоклеточным раком легкого является очень низкая доза, составляющая 5 мкг/организм, и что введение более высокой дозы вызывает серьезные побочные действия (непатентный документ 12). При введении катумаксомаба в указанной низкой дозе его уровень в крови никогда не может достигать эффективного значения. Это означает, что ожидаемое противоопухолевое действие не может быть достигнуто при введении катумаксомаба в указанной низкой дозе.

При этом, в отличие от катумаксомаба, ViTE не содержит сайт связывания Fcγ-

рецептора и поэтому у такого антитела отсутствует перекрестное сшивание с рецепторами, которые экспрессируются на Т-клетках и таких клетках, как НК-клетки и макрофаги, зависимым от ракового антигена образом. Так, было продемонстрировано, что ViTE не вызывает независимую от ракового антигена индукцию цитокинов, которая обнаружена при введении катумаксомаба. Однако, поскольку ViTE представляет собой модифицированную низкомолекулярную молекулу антитела без Fc-области, проблема заключается в том, что время его полужизни в крови после введения пациенту, существенно короче, чем в случае антител IgG-типа, которые обычно применяют в качестве терапевтических антител. Фактически, согласно опубликованным данным время полужизни в крови ViTE при его применении *in vivo* составляет примерно несколько часов (непатентные документы 13 и 14). При проведении клинических испытаний блинатумаба его вводили путем непрерывной внутривенной инфузии с помощью мининасоса. Такой метод введения не только чрезвычайно неудобен для пациентов, но также имеет потенциальный риск медицинских осложнений, связанных с неисправностью устройства или т.п. Таким образом, нельзя считать, что указанный метод введения является желательным.

Документы, характеризующие известный уровень техники

[Непатентные документы]

[Непатентный документ 1]: Clin Cancer Res. 16 (1), 2010, сс.11-20.

[Непатентный документ 2]: Drug Des Devel Ther 3, 2009, сс.7-16.

[Непатентный документ 3]: Nature 314 (6012), 1985, сс.628-631.

[Непатентный документ 4]: Int J Cancer 41 (4), 1988, сс.609-615.

[Непатентный документ 5]: Proc Natl Acad Sci USA 83 (5), 1986, сс.1453-1457.

[Непатентный документ 6]: Cancer Treat Rev. 36 (6), 2010, сс.458-467.

[Непатентный документ 7]: Expert Opin Biol Ther 10 (8), 2010, сс.1259-1269.

[Непатентный документ 8]: Proc Natl Acad Sci USA. 92 (15), 1995, сс.7021-7025.

[Непатентный документ 9]: Drug Discov Today, 10 (18), 2005, сс.1237-1244.

[Непатентный документ 10]: Trends Biotechnol 22 (5), 2004, сс.238-244.

[Непатентный документ 11]: Science 321 (5891), 2008, сс.974-977.

[Непатентный документ 12]: Cancer Immunol Immunother 56 (10), 2007, сс.1637-1644.

[Непатентный документ 13]: Cancer Immunol Immunother. 55 (5), 2006, сс.503-514.

[Непатентный документ 14]: Cancer Immunol Immunother. 58 (1), 2009, сс.95-109.

Краткое изложение сущности изобретения

Задачи, положенные в основу настоящего изобретения

Настоящее изобретение было создано с учетом вышеуказанных обстоятельств. В основу настоящего изобретения была положена задача создать пригодные для лечения рака полипептидные комплексы, которые обладают способностью приближать Т-клетки к раковой клетки-мишени и позволяют использовать цитотоксическую активность Т-клеток в отношении раковых клеток-мишеней, способы получения полипептидных комплексов и терапевтических агентов, которые содержат указанный полипептидный комплекс в качестве действующего вещества для индукции клеточной цитотоксичности. Другой задачей настоящего изобретения является разработка фармацевтических композиций, предназначенных для лечения или предупреждения различных видов рака, которые содержат в качестве действующего вещества указанный выше терапевтический агент для индукции цитотоксичности, и терапевтических способов, заключающихся в применении указанных фармацевтических композиций.

Средства решения указанных задач

При создании изобретения были открыты новые полипептидные комплексы, которые

сохраняют сильную противоопухолевую активность, присущую ViTE, и обладают длительным временем полужизни в крови, а также очень высокой безопасностью, что приводит к отсутствию индукции независимого от ракового антигена «цитокинового шторма» или т.п. При создании настоящего изобретения установлено также, что при замене антигенсвязывающих доменов полипептидных комплексов полипептидные комплексы могут повреждать различные клетки-мишени. Основываясь на указанных выше данных, при создании настоящего изобретения продемонстрировано, что полипептидные комплексы, предлагаемые в настоящем изобретении, повреждают раковые клетки. При создании настоящего изобретения установлено также, что путем регуляции ассоциации на поверхности раздела CH1/CL и интродукции модификаций типа «выступы-во-впадины» («выступ-впадина») (Knobs-into-Holes (KiH)) в полипептидные комплексы достигается более эффективная клеточная цитотоксичность. Кроме того, при создании настоящего изобретения продемонстрировано, что с использованием терапевтических агентов для индукции клеточной цитотоксичности, которые содержат в качестве действующего вещества полипептидный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, можно лечить или предупреждать различные виды рака.

Более конкретно, в настоящем изобретении предложены:

[1] полипептидный комплекс, который содержит:

(1) антигенсвязывающий домен;

(2) домен, содержащий Fc-область, которая обладает пониженной активностью связывания с Fcγ-рецептором; и

(3) домен, связывающий комплекс Т-клеточного рецептора;

[2] полипептидный комплекс по п.[1], в котором домен, связывающий комплекс Т-клеточного рецептора, представляет собой домен, связывающий Т-клеточный рецептор;

[3] полипептидный комплекс по п.[1], в котором домен, связывающий комплекс Т-клеточного рецептора, представляет собой CD3-связывающий домен;

[4] полипептидный комплекс по одному из пп.[1]-[3], в котором антигенсвязывающий домен представляет собой двухвалентный антигенсвязывающий домен;

[5] полипептидный комплекс по п.[4], в котором двухвалентный антигенсвязывающий домен представляет собой домен, имеющий структуру F(ab')₂;

[6] полипептидный комплекс по п.[5], в котором два полипептида, образующие константную область тяжелой цепи домена, который имеет структуру F(ab')₂, индивидуально сцеплены с любым из двух полипептидов, образующих Fc-домен;

[7] полипептидный комплекс по п.[6], в котором CD3-связывающий домен сцеплен с любым из двух или с обоими CH₃, образующими Fc-домен;

[8] полипептидный комплекс по п.[7], в котором Fv-фрагмент тяжелой цепи, образующий CD3-связывающий домен, сцеплен с одним из CH₃, образующих Fc-домен, и Fv-фрагмент легкой цепи, образующий CD3-связывающий домен, сцеплен с другим CH₃, образующим Fc-домен;

[9] полипептидный комплекс по п.[8], в котором CH1-домен антитела сцеплен с Fv-фрагментом тяжелой цепи, образующим CD3-связывающий домен, и CL-домен антитела сцеплен с Fv-фрагментом легкой цепи;

[10] полипептидный комплекс по п.[6], в котором CD3-связывающий домен сцеплен с любым из двух или с обоими CL, образующими F(ab')₂;

[11] полипептидный комплекс по п.[6], в котором CD3-связывающий домен сцеплен с любой из двух или с обеими VH, образующими F(ab')₂;

[12] полипептидный комплекс по п.[6], в котором CD3-связывающий домен сцеплен

с любой из двух или с обоими VL, образующими F(ab')₂;

[13] полипептидный комплекс по одному из пп.[1]-[12], в котором CD3-связывающий домен представляет собой Fv;

5 [14] полипептидный комплекс по одному из пп.[1]-[7] и [10]-[12], в котором CD3-связывающий домен представляет собой Fab;

[15] полипептидный комплекс по одному из пп.[1]-[7] и [10]-[12], в котором CD3-связывающий домен представляет собой scFv;

[16] полипептидный комплекс по одному из пп.[1]-[15], в котором CD3-связывающий домен является одновалентным;

10 [17] полипептидный комплекс по одному из пп.[1]-[3], в котором антигенсвязывающий домен представляет собой одновалентный scFv и одновалентный Fab;

[18] полипептидный комплекс по п.[17], в котором одновалентный scFv сцеплен с одним из полипептидов, образующих Fc-домен, через scFv, который образует CD3-связывающий домен; Fv-фрагмент тяжелой цепи одновалентного Fab сцеплен с одним
15 из полипептидов, образующих Fc-домен, через CH1-домен; и Fv-фрагмент легкой цепи Fab сцеплен с CL-доменом;

[19] полипептидный комплекс по одному из пп.[1]-[3], в котором антигенсвязывающий домен представляет собой двухвалентный scFv;

[20] полипептидный комплекс по п.[19], в котором один одновалентный scFv сцеплен
20 с одним из полипептидов, образующих Fc-домен, через Fv-фрагмент тяжелой цепи, образующий CD3-связывающий домен, и другой одновалентный scFv сцеплен с другим полипептидом, образующим Fc-домен, через Fv-фрагмент легкой цепи, образующий CD3-связывающий домен;

[21] полипептидный комплекс по п.[19], в котором один одновалентный scFv сцеплен
25 с одним из полипептидов, образующих Fc-домен, через scFv, образующий CD3-связывающий домен, и другой одновалентный scFv сцеплен с другим полипептидом, образующим Fc-домен;

[22] полипептидный комплекс по одному из пп.[1]-[3], в котором антигенсвязывающий домен и домен, связывающий комплекс Т-клеточного рецептора, каждый представляет
30 собой одновалентный Fab;

[23] полипептидный комплекс по п.[22], в котором Fv-фрагмент тяжелой цепи одновалентного Fab, образующего антигенсвязывающий домен, сцеплен с одним из полипептидов, образующих Fc-домен, через CH1-домен и Fv-фрагмент легкой цепи Fab сцеплен с CL-доменом; и Fv-фрагмент тяжелой цепи Fab, образующего домен,
35 связывающий Т-клеточный рецептор, сцеплен с другим полипептидом, образующим Fc-домен, через CH1-домен и Fv-фрагмент легкой цепи Fab сцеплен с CL-доменом;

[24] полипептидный комплекс по п.[22], в котором Fv-фрагмент одновалентного Fab, образующего антигенсвязывающий домен, сцеплен с одним из полипептидов, образующих Fc-домен, через CH1-домен и Fv-фрагмент легкой цепи Fab сцеплен с CL-
40 доменом; и Fv-фрагмент легкой цепи Fab, образующего домен, связывающий Т-клеточный рецептор, сцеплен с другим полипептидом, образующим Fc-домен, через CH1-домен и Fv-фрагмент тяжелой цепи Fab сцеплен с CL-доменом;

[25] полипептидный комплекс по п.[22], в котором Fv-фрагмент тяжелой цепи одновалентного Fab, образующего антигенсвязывающий домен, сцеплен с одним из
45 полипептидов, образующих Fc-домен, через CH1-домен и Fv-фрагмент легкой цепи Fab сцеплен с CL-доменом; и Fv-фрагмент тяжелой цепи Fab, образующего домен, связывающий Т-клеточный рецептор, сцеплен с другим полипептидом, образующим Fc-домен, через CL-домен и Fv-фрагмент легкой цепи Fab сцеплен с CH1-доменом;

[26] полипептидный комплекс по п.[22], в котором Fv-фрагмент тяжелой цепи одновалентного Fab, образующего домен, связывающий Т-клеточный рецептор, сцеплен с одним из полипептидов, образующих Fc-домен, через СН1-домен и Fv-фрагмент легкой цепи Fab сцеплен с CL-доменом; и Fv-фрагмент легкой цепи Fab, образующего антигенсвязывающий домен, сцеплен с другим полипептидом, образующим Fc-домен, через СН1-домен и Fv-фрагмент тяжелой цепи Fab сцеплен с CL-доменом;

[27] полипептидный комплекс по п.[22], в котором Fv-фрагмент тяжелой цепи одновалентного Fab, образующего домен, связывающий Т-клеточный рецептор, сцеплен с одним из полипептидов, образующих Fc-домен, через СН1-домен; и Fv-фрагмент легкой цепи Fab сцеплен с CL-доменом; и Fv-фрагмент тяжелой цепи Fab, образующего антигенсвязывающий домен, сцеплен с другим полипептидом, образующим Fc-домен, через CL-домен, и Fv-фрагмент легкой цепи Fab сцеплен с СН1-доменом;

[28] полипептидный комплекс по п.[22] который содержит:

(1) антигенсвязывающий домен, в котором Fv-фрагмент тяжелой цепи одновалентной структуры Fab, который связывается с антигеном, сцеплен через СН1-домен с одним из полипептидов, образующих Fc-домен, и Fv-фрагмент легкой цепи структуры Fab сцеплен с CL-доменом; и

(2) домен, связывающий комплекс Т-клеточного рецептора, в котором Fv-фрагмент тяжелой цепи одновалентной структуры Fab, который связывается с комплексом Т-клеточного рецептора, сцеплен через СН1 с другим полипептидом, образующим Fc-домен, и Fv-фрагмент легкой цепи структуры Fab сцеплен с CL-доменом;

при этом электрические заряды СН1- и CL-доменов контролируют таким образом, чтобы Fv-фрагмент тяжелой цепи антигенсвязывающего домена соединялся с Fv-фрагментом легкой цепи антигенсвязывающего домена или Fv-фрагмент тяжелой цепи домена, связывающего Т-клеточный рецептор, соединялся с Fv-фрагментом легкой цепи домена, связывающего Т-клеточный рецептор;

[29] полипептидный комплекс по п.[28], в котором аминокислотный остаток в СН1-домене, сцепленный с Fv-фрагментом тяжелой цепи домена, связывающего комплекс Т-клеточного рецептора, имеет такой же тип электрического заряда, что аминокислотный остаток в CL-домене, сцепленный с Fv-фрагментом антигенсвязывающего домена;

[30] полипептидный комплекс по п.[28], в котором аминокислотный остаток в СН1-домене, сцепленный с Fv-фрагментом тяжелой цепи антигенсвязывающего домена, имеет такой же тип электрического заряда, что аминокислотный остаток в CL-домене, сцепленный с Fv-фрагментом легкой цепи домена, связывающего комплекс Т-клеточного рецептора;

[31] полипептидный комплекс по [28], в котором аминокислотный остаток в СН1-домене, сцепленный с Fv-фрагментом тяжелой цепи домена, связывающего комплекс Т-клеточного рецептора, имеет такой же тип электрического заряда, что аминокислота в CL-домене, сцепленная с Fv-фрагментом легкой цепи антигенсвязывающего домена, и аминокислотный остаток в СН1-домене, сцепленный с Fv-фрагментом тяжелой цепи антигенсвязывающего домена, имеет такой же тип электрического заряда, что аминокислота в CL-домене, сцепленная с Fv-фрагментом легкой цепи домена, связывающего комплекс Т-клеточного рецептора;

[32] полипептидный комплекс по п.[29] или [31], в котором аминокислотный остаток в СН1-домене, сцепленный с Fv-фрагментом тяжелой цепи домена, связывающего комплекс Т-клеточного рецептора, имеет электрический заряд, противоположный заряду аминокислотного остатка в CL-домене, сцепленного с Fv-фрагментом легкой

цепи связывающего Т-клеточный рецептор домена;

[33] полипептидный комплекс по п.[30] или [31], в котором аминокислотный остаток в СН1-домене, сцепленный с Fv-фрагментом тяжелой цепи антигенсвязывающего домена, имеет электрический заряд, противоположный заряду аминокислотного остатка в СL-домене, сцепленного с Fv-фрагментом легкой цепи антигенсвязывающего домена;

[34] полипептидный комплекс по одному из пп.[22]-[33], в котором домен, связывающий комплекс Т-клеточного рецептора, представляет собой домен, связывающий Т-клеточный рецептор;

[35] полипептидный комплекс по п.[34], в котором домен, связывающий Т-клеточный рецептор, представляет собой CD3-связывающий домен;

[36] полипептидный комплекс по п.[32] или [33], в котором аминокислотные остатки в СН1- и СL-доменах представляют собой одну, две или большее количество комбинаций аминокислотных остатков, выбранных из группы, включающей комбинации:

(а) аминокислотного остатка в положении 147 (EU-нумерация) в СН1-домене и аминокислотного остатка в положении 180 (EU-нумерация) в СL-домене;

(б) аминокислотного остатка в положении 147 (EU-нумерация) в СН1-домене и аминокислотного остатка в положении 131 (EU-нумерация) в СL-домене;

(в) аминокислотного остатка в положении 147 (EU-нумерация) в СН1-домене и аминокислотного остатка в положении 164 (EU-нумерация) в СL-домене;

(г) аминокислотного остатка в положении 147 (EU-нумерация) в СН1-домене и аминокислотного остатка в положении 138 (EU-нумерация) в СL-домене;

(д) аминокислотного остатка в положении 147 (EU-нумерация) в СН1-домене и аминокислотного остатка в положении 123 (EU-нумерация) в СL-домене; и

(е) аминокислотного остатка в положении 175 (EU-нумерация) в СН1-домене и аминокислотного остатка в положении 160 (EU-нумерация) в СL-домене;

и в котором аминокислотный остаток в СН1-домене имеет электрический заряд, противоположный заряду аминокислотного остатка в СL-домене;

[37] полипептидный комплекс по п.[36], в котором аминокислотные остатки выбраны из группы, дополнительно включающей комбинацию аминокислотных остатков:

(ж) аминокислотного остатка в положении 213 (EU-нумерация) в СН1-домене и аминокислотного остатка в положении 123 (EU-нумерация) в СL-домене;

[38] полипептидный комплекс по п.[36] или [37], в котором аминокислотный остаток, имеющий противоположный электрический заряд, выбран из аминокислотного остатка, входящего в любую из групп:

(Х) глутаминовая кислота (Е) и аспарагиновая кислота (D); или

(У) лизин (K), аргинин (R) и гистидин (H);

[39] полипептидный комплекс по одному из пп.[36]-[38], в котором аминокислотные остатки, имеющие противоположный электрический заряд, представляют собой:

Lys в положении 175 (EU-нумерация) в СН1-домене и Glu в положениях 131, 160 и 180 (EU-нумерация) в СL-домене;

[40] полипептидный комплекс по одному из пп.[36]-[38], в котором аминокислотные остатки, имеющие противоположный электрический заряд, представляют собой:

Glu в положениях 147 и 175 (EU-нумерация) в СН1-домене и Lys в положениях 131, 160 и 180 (EU-нумерация) в СL-домене;

[41] полипептидный комплекс по п.[40], в котором аминокислотный остаток в положении 213 (EU-нумерация) в СН1-домене представляет собой Glu и аминокислотный остаток в положении 123 (EU-нумерация) в СL-домене представляет собой Lys;

[42] полипептидный комплекс по одному из пп.[1]-[41], в котором Fc-домен

характеризуется пониженной активностью связывания с Fcγ-рецептором в отношении FcγI, FcγIIA, FcγIIB, FcγIIIA и/или FcγIIIB;

[43] полипептидный комплекс по одному из пп.[1]-[42], в котором Fc-домен представляет собой любой из Fc-доменов, имеющих SEQ ID NO:23, 24, 25 и 26, в котором

аминокислота(ы), образующая(ие) Fc-домен, изменена(ы) в результате мутации;

[44] полипептидный комплекс по п.[43], в котором Fc-домен содержит любую из указанных ниже аминокислот:

аминокислотную последовательность, простирающуюся от положения 118 до положения 260 (EU-нумерация), которая представляет собой последовательность SEQ ID NO:24; или

аминокислотную последовательность, простирающуюся от положения 261 до положения 447 (EU-нумерация), которая представляет собой последовательность SEQ ID NO:26;

[45] полипептидный комплекс по п.[43], в котором аминокислоты, образующие Fc-домен, содержат мутацию в любом из следующих положений: 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 (EU-нумерация);

[46] полипептидный комплекс по п.[45], в котором Fc-домен содержит мутацию в аминокислотах SEQ ID NO:23, образующих Fc-домен;

[47] полипептидный комплекс по п.[46], в котором Fc-домен представляет собой Fc-домен, содержащий аминокислотную замену в положении 233, 234, 235, 236, 237, 327, 330 или 331 (EU-нумерация) на аминокислоту, присутствующую в соответствующем положении (EU-нумерация) в соответствующем IgG2 или IgG4;

[48] полипептидный комплекс по п.[46], в котором Fc-домен содержит аминокислотную мутацию в положении 234, 235 или 297 (EU-нумерация);

[49] полипептидный комплекс по п.[48], в котором аминокислота(ы) в положении 234, 235 и/или 297 заменена(ы) на аланин;

[50] полипептидный комплекс по одному из пп.[43]-[49], в котором последовательности двух полипептидов, образующих Fc-домен, отличаются друг от друга;

[51] полипептидный комплекс по одному из пп.[1]-[50], в котором аминокислота в положении 349 заменена на цистеин и аминокислота в положении 366 (EU-нумерация) заменена на триптофан в последовательности аминокислотных остатков одного из двух полипептидов, образующих Fc-домен; и в котором аминокислота в положении 356 заменена на цистеин, аминокислота в положении 366 заменена на серин, аминокислота в положении 368 заменена на аланин и аминокислота в положении 407 (EU-нумерация) заменена на валин в последовательности аминокислотных остатков другого полипептида;

[52] полипептидный комплекс по одному из пп.[1]-[50], в котором аминокислота в положении 356 (EU-нумерация) заменена на лизин в последовательности аминокислотных остатков одного из двух полипептидов, образующих Fc-домен; аминокислота в положении 439 (EU-нумерация) заменена на глутаминовую кислоту в другом полипептиде; и аминокислота в положении 435 (EU-нумерация) заменена на аргинин в последовательности аминокислотных остатков любого из двух полипептидов;

[53] полипептидный комплекс по п.[51] или [52], в котором последовательность GK удалена в результате делеции из карбоксильных концов двух полипептидов, образующих Fc-домен;

[54] полипептидный комплекс по одному из пп.[1]-[53], в котором

антигенсвязывающие домены связываются с одним и тем же эпитопом;

[55] полипептидный комплекс по [54], где указанный эпитоп присутствует в белке, содержащем аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2;

[56] полипептидный комплекс по [54], где указанный эпитоп присутствует в белке, содержащем аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4;

[57] полипептидный комплекс по одному из пп.[1]-[53], в котором каждый из антигенсвязывающих доменов связывается с различным (другим) эпитопом;

[58] полипептидный комплекс по п.[57], где указанный другой эпитоп присутствует в белке, содержащем аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2;

[59] полипептидный комплекс по п.[57], где другой эпитоп присутствует в белке, содержащем аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4;

[60] полинуклеотид, кодирующий полипептидный комплекс по одному из пп.[1]-[59];

[61] вектор, содержащий полинуклеотид по п.[60];

[62] клетка, содержащая вектор по п.[61];

[63] способ получения полипептидного комплекса, заключающийся в том, что культивируют клетку по п.[62] и выделяют полипептидный комплекс из супернатанта культуры;

[64] терапевтический агент для индукции клеточной цитотоксичности, который содержит в качестве действующего вещества полипептидный комплекс по одному из пп.[1]-[59];

[65] терапевтический агент по п.[64], где терапевтический агент для индукции клеточной цитотоксичности представляет собой терапевтический агент, применяемый при раке;

[66] терапевтический агент по п.[65], где рак представляет собой рак печени или рак легкого;

[67] способ лечения или предупреждения рака, заключающийся в том, что полипептидный комплекс по одному из пп.[1]-[59] вводят пациенту, который нуждается в этом; и

[68] терапевтический или профилактический способ по п.[67], в котором рак представляет собой рак печени или рак легкого.

Настоящее изобретение относится также к наборам, предназначенным для применения в способе, предлагаемом в настоящем изобретении, которые содержат полипептидный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, или полипептидный комплекс, полученный с помощью способа, предлагаемого в настоящем изобретении.

Настоящее изобретение относится также к применению полипептидного комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, или полипептидного комплекса, полученного с помощью способа, предлагаемого в настоящем изобретении, для приготовления терапевтического агента для индукции клеточной цитотоксичности. Настоящее изобретение относится также к полипептидным комплексам, предлагаемым в настоящем изобретении, или полипептидным комплексам, полученным с помощью способов, предлагаемых в изобретении, для применения в способе, предлагаемом в настоящем изобретении.

Результаты изобретения

В настоящем изобретении предложены новые полипептидные комплексы, которые сохраняют сильную противоопухолевую активность ViTE и обладают длительным временем полужизни в крови, а также очень высокой безопасностью, что приводит к отсутствию индукции независимого от ракового антигена «цитокинового шторма» или т.п. Когда изменяют антигенсвязывающий домен полипептидного комплекса,

предлагаемого в настоящем изобретении, то терапевтические агенты, которые содержат полипептидный комплекс в качестве действующего вещества для индукции клеточной цитотоксичности, могут направленно воздействовать и повреждать различные клетки, включая раковые клетки. Таким образом, можно лечить или предупреждать различные

5 виды рака. Это обеспечивает требуемое лечения, которое является высоко безопасным и удобным и снижает физическую нагрузку на пациентов.

Краткое описание чертежей

На чертежах показано:

на фиг.1 - график, на котором представлено сравнение цитотоксической активности

10 следующих антител к GPC3 (антиген, принадлежащий к семейству GPI-заякоренных рецепторов): GPC3 ERY1 (GPC3 BiTE), GPC3 ERY2 и антитела к GPC3 IgG-типа.

Закрашенным квадратом (■), закрашенным треугольником (▲) и незакрашенным квадратом (□) обозначена цитотоксическая активность GPC3 ERY1 (GPC3 BiTE), GPC3 ERY2 и антитела к GPC3 IgG-типа соответственно;

15 на фиг.2 - график, на котором представлено сравнение цитотоксической активности GPC3 BiTE и GPC3 ERY5. Закрашенным квадратом (■) и незакрашенным кружком (○) обозначена цитотоксическая активность GPC3 BiTE и GPC3 ERY5 соответственно;

на фиг.3 - график, на котором представлено сравнение цитотоксической активности GPC3 BiTE и GPC3 ERY6. Закрашенным квадратом (■) и закрашенным треугольником

20 (▲) обозначена цитотоксическая активность GPC3 BiTE и GPC3 ERY6 соответственно;

на фиг.4 - график, на котором представлено сравнение цитотоксической активности GPC3 BiTE и GPC3 ERY7. Закрашенным квадратом (■) и закрашенным ромбом (◆) обозначена цитотоксическая активность GPC3 BiTE и GPC3 ERY7 соответственно;

на фиг.5 - график, на котором представлено сравнение цитотоксической активности

25 GPC3 BiTE, GPC3 ERY8-2, GPC3 ERY9-1 и GPC3 ERY10-1. Закрашенным квадратом (■), закрашенным треугольником (▲), незакрашенной окружностью (○) и незакрашенным квадратом (□) обозначена цитотоксическая активность GPC3 BiTE, GPC3 ERY8-2, GPC3 ERY9-1 и GPC3 ERY10-1 соответственно;

на фиг.6 - график, демонстрирующий противоопухолевое действие *in vivo* GPC3 ERY8-2 на предварительно смешанной (pre-mix) модели PC-10. Незакрашенным

30 квадратом (□) и закрашенным ромбом (◆) обозначены изменения объема опухолей в группе, для обработки которой применяли GPC3 ERY7, и контрольной (обработка ЗФР) группе соответственно;

на фиг.7 - график, демонстрирующий противоопухолевое действие *in vivo* GPC3 ERY10-1 на предварительно смешанной (pre-mix) модели PC-10. Незакрашенным

35 квадратом (□) и закрашенным ромбом (◆) обозначены изменения объема опухолей в группе, для обработки которой применяли GPC3 ERY10-1, и контрольной (обработка ЗФР) группе соответственно;

на фиг.8 - график, демонстрирующий противоопухолевое действие *in vivo* GPC3 ERY10-1 при моделировании на PC-10 Т-клеточного переноса. Незакрашенным

40 квадратом (□) и закрашенным ромбом (◆) обозначены изменения объема опухолей в группе, для обработки которой применяли GPC3 ERY10-1, и контрольной (обработка ЗФР) группе соответственно;

на фиг.9 - график, на котором представлена зависимость от времени концентраций

45 в плазме GPC3 ERY9-1 и GPC3 ERY10-1, определенных с использованием экспрессирующих GPC3 клеток Ba/F3. Закрашенным ромбом (◆) и незакрашенным квадратом (□) обозначена зависимость от времени концентрации в плазме GPC3 ERY9-1 и GPC3 ERY10-1 соответственно;

на фиг.10 - график, на котором представлена зависимость от времени концентраций в плазме GPC3 ERY9-1 и GPC3 ERY10-1, определенных с использованием экспрессирующих CD3 клеток Ba/F3. Закрашенным ромбом (◆) и незакрашенным квадратом (□) обозначена зависимость от времени концентрации в плазме GPC3 ERY9-1 и GPC3 ERY10-1 соответственно;

на фиг.11 - график, демонстрирующий способность GPC3 BiTE, GPC3 ERY9-1, GPC3 ERY10-1, GPC3 ERY15-1 и катумаксомаба индуцировать цитокины независимым от ракового антигена образом;

на фиг.12 - график, демонстрирующий цитотоксичность *in vitro* GPC3 ERY18 LI, GPC3 ERY18L2, GPC3 ERY18L3, GPC3 ERY18L4 и GPC3 ERY18S1. Закрашенным треугольником (▲), закрашенным кружком (●), закрашенным квадратом (■), незакрашенным квадратом (□) и незакрашенным ромбом (◇) обозначена цитотоксическая активность GPC3 ERY18 L1, GPC3 ERY18 L2, GPC3 ERY18 L3, GPC3 ERY18 L4 и GPC3 ERY18 S1 соответственно;

на фиг.13 - график, на котором представлено сравнение цитотоксической активности *in vitro* GPC3 ERY18 L3 и GPC3 ERY10-1. Закрашенным квадратом (■) и незакрашенным квадратом (□) обозначена цитотоксическая активность GPC3 ERY18 L3 и GPC3 ERY10-1 соответственно;

на фиг.14 - график, на котором представлено сравнение цитотоксической активности *in vitro* GPC3 ERY19-3 и GPC3 BiTE. Незакрашенным квадратом (□) и закрашенным квадратом (■) обозначена цитотоксическая активность GPC3 ERY19-3 и GPC3 BiTE соответственно;

на фиг.15А - хроматограмма, демонстрирующая результаты анализа с использованием гель-фильтрации СМ, в которых происходит экспрессия NTA1L/NTA1R/GC33-k0. На фиг.15Б - хроматограмма, демонстрирующая результаты анализа с использованием гель-фильтрации СМ, в которых происходит экспрессия NTA2L/NTA2R/GC33-k0;

на фиг.16 - диаграммы, на которых показаны домены, образующие следующие полипептидные комплексы, описанные в примерах, которые представлены в настоящем описании: GPC3 BiTE, GPC3 ERY2, GPC3 ERY5, GPC3 ERY6, GPC3 ERY7, GPC3 ERY8-2, GPC3 ERY9-1, GPC3 ERY 10-1, GPC3 ERY15, GPC3 ERY18 и GPC3 ERY19-3. Домен, заштрихованный перекрестными линиями, обозначает вариабельную область Н-цепи антитела к раковому антигену (GPC3, EpCAM, EGFR); домен с диагональными линиями обозначает вариабельную область L-цепи антитела к раковому антигену (GPC3, EpCAM, EGFR); домен с пунктирными линиями обозначает вариабельную область Н-цепи антитела к CD3; закрашенный домен обозначает вариабельную область L-цепи антитела к CD3; незакрашенный домен обозначает константную область антитела; крестик обозначает молчащую мутацию в Fc и звездочка обозначает мутацию, усиливающую гетеромерную ассоциацию Fc;

на фиг.17 - диаграммы GPC3 BiTE (А); GPC3 ERY 10 (Б); GPC3 ERY2 (В); GPC3 ERY5 (Г); GPC3 ERY6 (Д); GPC3 ERY7 (Е); GPC3 ERY8-2 (Ж); GPC3 ERY9-1 (З); GPC3 ERY10-1 (И); GPC3 ERY15 (К); GPC3 ERY18 (Л) и GPC3 ERY19-3 (М);

на фиг.18 - аминокислотные остатки, образующие Fc-домены IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 и их EU-нумерация по Кэботу (в контексте настоящего описания обозначен также как «EU-индекс»);

на фиг.19 - диаграммы, на которых показаны домены, образующие полипептидные комплексы, описанные в примерах, которые представлены в настоящем описании: GPC3 ERY17-2, GPC3 ERY17-3, EpCAM ERY17-2 и EpCAM ERY17-3. Домен, заштрихованный перекрестными линиями, обозначает вариабельную область Н-цепи

антитела к раковому антигену (GPC3, EpCAM, EGFR); домен с диагональными линиями обозначает вариабельную область L-цепи антитела к раковому антигену (GPC3, EpCAM, EGFR); домен с пунктирными линиями обозначает вариабельную область H-цепи антитела к CD3; закрашенный домен обозначает вариабельную область L-цепи антитела к CD3; незакрашенный домен обозначает константную область антитела; крестик обозначает молчащую мутацию в Fc и звездочка обозначает мутацию, усиливающую гетеромерную ассоциацию Fc;

на фиг.20 - график, на котором представлено сравнение цитотоксической активности GPC3 BiTE, GPC3 ERY17-2, GPC3 ERY17-3 и GPC3 ERY10-1. Закрашенным квадратом (■), закрашенным треугольником (▲), незакрашенным кружком (○) и незакрашенным квадратом (□) обозначена цитотоксическая активность GPC3 BiTE, GPC3 ERY17-2, GPC3 ERY17-3 и GPC3 ERY10-1 соответственно;

на фиг.21 - график, демонстрирующий противоопухолевую активность *in vivo* GPC3 ERY17-2 при моделировании на PC-10 Т-клеточного переноса. Незакрашенным квадратом (□) и закрашенным ромбом (◆) обозначены изменения объема опухолей в группе, для обработки которой применяли GPC3 ERY17-2, и контрольной (обработка ЗФР) группе соответственно;

на фиг.22 - график, на котором представлено сравнение цитотоксической активности GPC3 ERY17-2 и GPC3 ERY17-2-M20. Закрашенным треугольником (▲) и незакрашенным кружком (○) обозначена цитотоксическая активность GPC3 ERY 17-2 и GPC3 ERY 17-2-M20 соответственно;

на фиг.23 - график, на котором представлено сравнение цитотоксической активности EpCAM ERY17-2 и EpCAM ERY17-3. Закрашенным треугольником (▲) и незакрашенным квадратом (□) обозначена цитотоксическая активность EpCAM ERY17-2 и EpCAM ERY17-3 соответственно;

на фиг.24 - диаграммы, на которых показаны домены, образующие полипептидные комплексы, описанные в примерах, которые представлены в настоящем описании: GM1, GM2 и GM0. На «А» показан полипептидный комплекс, в котором регулируется ассоциация на поверхности раздела CH1/CL и интродуцированы модификации типа «выступ-впадина» (KiH). На «Б» показан полипептидный комплекс, в котором не регулируется ассоциация на поверхности раздела CH1/CL или не интродуцированы KiH-модификации. Домен, заштрихованный перекрестными линиями, обозначает вариабельную область H-цепи антитела к раковому антигену (GPC3, EpCAM, EGFR); домен с диагональными линиями обозначает вариабельную область L-цепи антитела к раковому антигену (GPC3, EpCAM, EGFR); домен с пунктирными линиями обозначает вариабельную область H-цепи антитела к CD3; закрашенный домен обозначает вариабельную область L-цепи антитела к CD3; незакрашенный домен обозначает константную область антитела; крестик обозначает молчащую мутацию в Fc и звездочка обозначает мутацию, усиливающую гетеромерную ассоциацию Fc;

и имеющий форму пончика символ обозначает мутацию, регулирующую взаимодействие на поверхности раздела CH1/CL;

на фиг.25 - график, на котором представлено сравнение цитотоксической активности GM1, GM2 и GM0. Закрашенным треугольником (▲), незакрашенным квадратом (□) и незакрашенным кружком (○) обозначена цитотоксическая активность GM1, GM2 и GM3 соответственно;

на фиг.26 - график, демонстрирующий цитотоксическую активность EGFR ERY17-2. Закрашенным треугольником (▲) обозначена цитотоксическая активность EGFR ERY17-2.

Варианты осуществления изобретения

Представленные ниже определения даны с целью объяснения настоящего изобретения.
Антитело

В контексте настоящего описания «антитело» относится к встречающемуся в
5 естественных условиях иммуноглобулину или иммуноглобулину, полученному
полностью или частично путем синтеза. Антитела можно выделять из встречающихся
в естественных условиях источников, таких как встречающиеся в естественных условиях
плазма и сыворотка, или из супернатантов культур продуцирующих антитела гибридом.
Альтернативно этому антитела можно частично или полностью синтезировать с
10 использованием таких методик, как генетическая рекомбинация. Предпочтительными
антителами являются, например, антитела, принадлежащие к какому-либо изотипу
иммуноглобулинов или его подклассу. Известные человеческие иммуноглобулины
включают антитела следующих девяти классов (изотипов): IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1,
IgA2, IgD, IgE и IgM. Из этих изотипов к антителам, предлагаемым в изобретении,
15 относятся IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

Методы получения антитела с требуемой активностью связывания известны
специалистам в данной области. Ниже представлен пример, в котором описан метод
получения антитела (антитела к GPC3), связывающегося с GPC3, который принадлежит
к семейству GPI-заякоренных рецепторов (Int J Cancer. 103(4), 2003, сс.455-465). Согласно
20 описанному ниже примеру можно получать также антитела, которые связываются с
антигеном, отличным от GPC3.

Антитела к GPC3 можно получать в виде поликлональных или моноклональных
антител с помощью известных методов. Антитела к GPC3 предпочтительно получали
в виде моноклональных антител, выведенных из организма млекопитающих. Указанные
25 выведенные из организма млекопитающих антитела включают антитела, полученные
с помощью гибридом или клеток-хозяев, трансформированных экспрессионным
вектором, который несет ген антитела, созданным с помощью методов генетической
инженерии.

Гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела можно получать с
30 использованием известных методов, например, описанных ниже. В частности,
млекопитающих иммунизируют с помощью общепринятых методов иммунизации,
используя белок GPC3 в качестве сенсibiliзирующего антигена. Образовавшиеся
иммунные клетки сливают с известными родительскими клетками с помощью
общепринятых методов слияния. Затем гибридомы, продуцирующие антитело к GPC3,
35 можно отбирать путем скрининга в отношении продуцирующих моноклональные
антитела клеток с помощью общепринятых методов скрининга.

В частности, моноклональные антитела получают согласно описанному ниже методу.
Сначала ген GPC3, нуклеотидная последовательность которого представлена в RefSeq
под регистрационным номером NM_001164617.1 (SEQ ID NO:1), можно экспрессировать
40 с получением белка GPC3, последовательность которого представлена в RefSeq под
регистрационным номером NP_001158089.1 (SEQ ID NO:2), который можно применять
в качестве сенсibiliзирующего антигена для получения антитела. Для этого генную
последовательность, кодирующую GPC3, встраивают в известный экспрессионный
вектор и соответствующие клетки-хозяева трансформируют этим вектором. Требуемый
45 человеческий белок GPC3 очищают из клеток-хозяев или супернатантов культур с
помощью известных методов. Например, для получения растворимого GPC3 из
супернатантов культур удаляют путем делеции аминокислоты в положениях 564-580,
которые формируют гидрофобную область, соответствующую GPI-заякоривающей

последовательности, применяемой для заякоривания GPC3 на клеточной мембране, из полипептидной последовательности GPC3 SEQ ID NO:2, а затем образовавшийся белок экспрессируют вместо белка GPC3, имеющего SEQ ID NO:2. В альтернативном варианте в качестве сенсibilизирующего антигена можно применять очищенный встречающийся

в естественных условиях белок GPC3.

Очищенный белок GPC3 можно применять в качестве сенсibilизирующего антигена для иммунизации млекопитающих. В качестве сенсibilизирующего антигена можно применять также неполный пептид GPC3. В этом случае неполный пептид можно получать химическим синтезом на основе аминокислотной последовательности

человеческого GPC3 или путем встраивания части гена GPC3 в экспрессионный вектор для экспрессии. В альтернативном варианте неполный пептид можно получать путем расщепления белка GPC3 протеазой. Конкретные варианты осуществления изобретения не накладывают ограничения на длину и область неполного пептида GPC3.

Предпочтительную область можно произвольно выбирать из числа аминокислотных остатков аминокислотной последовательности, находящихся в положениях 564-580 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:2. Количество аминокислот, образующих пептид, который можно применять в качестве сенсibilизирующего агента, предпочтительно составляет по меньшей мере пять или более, шесть или более или семь или более. Более конкретно, в качестве сенсibilизирующего антигена можно применять пептид, состоящий из 8-50 остатков, более предпочтительно из 10-30 остатков.

В альтернативном варианте в качестве сенсibilизирующего антигена можно применять слитый белок, полученный путем слияния требуемого неполного полипептида или пептида белка GPC3, с другим полипептидом. Например, для получения слитых белков, предназначенных для применения в качестве сенсibilизирующих антигенов, предпочтительно применяют Fc-фрагменты антитела и пептидные метки. Векторы для экспрессии указанных слитых белков можно конструировать путем слияния в рамке считывания генов, кодирующих два или большее количество требуемых полипептидных фрагментов, и встраивания слитого гена в экспрессионный вектор, описанный выше. Методы получения слитых белков описаны в Molecular Cloning, 2-е изд. (Sambrook J. и др., Molecular Cloning, 2-е изд. 1989, 9.47-9.58, изд-во Cold Spring Harbor Lab. Press). Методы получения GPC3, предназначенного для применения в качестве сенсibilизирующего антигена, и методы иммунизации с использованием GPC3 конкретно описаны в WO 2003/000883, WO 2004/022754 и WO 2006/006693.

Отсутствует конкретное ограничение, касающееся млекопитающих, подлежащих иммунизации с помощью сенсibilизирующего антигена. Однако предпочтительно выбирать млекопитающих с учетом их совместимости с родительскими клетками, применяемыми для клеточного слияния. В целом, предпочтительно применяют грызунов, таких как мыши, крысы, а также хомяки, кролики, и обезьян.

Вышеуказанных животных иммунизируют сенсibilизирующим антигеном с помощью известных методов. Общепринятыми методами иммунизации являются, например, внутрибрюшинная или подкожная инъекция млекопитающих сенсibilизирующим антигеном. В частности, сенсibilизирующий антиген можно соответствующим образом разводить в ЗФР (забуференный фосфатом физиологический раствор), физиологическом соляном растворе или т.п. При необходимости с антигеном смешивают общепринятый адъювант, такой как полный адъювант Фрейнда, и смесь эмульгируют. Затем сенсibilизирующий антиген вводят млекопитающему несколько раз с 4-21-дневными интервалами. При иммунизации сенсibilизирующим антигеном можно использовать соответствующие носители. В частности, когда в качестве сенсibilизирующего антигена

используют низкомолекулярный неполный пептид, то иногда для иммунизации требуется сочетать пептид, представляющий собой сенсибилизирующий антиген, с белком-носителем, таким как альбумин или гемоцианин лимфы улитки.

Альтернативно этому можно получать продуцирующие требуемое антитело гибридомы с помощью описанной ниже ДНК-иммунизации. ДНК-иммунизация представляет собой метод иммунизации, который обеспечивает иммуностимуляцию посредством экспрессии сенсибилизирующего антигена в организме иммунизированного животного в результате введения ДНК-вектора, сконструированного таким образом, чтобы он обеспечивал экспрессию гена, кодирующего антигенный белок, в организме животного. По сравнению с общепринятыми методами иммунизации, при которых животным, подлежащим иммунизации, вводят белковый антиген, ДНК-иммунизация, по-видимому, имеет следующие преимущества:

- можно осуществлять иммуностимуляцию, сохраняя при этом структуру мембранного белка, такого как GPC3; и

- отсутствует необходимость в очистке антигена для иммунизации.

Для получения моноклонального антитела, предлагаемого в настоящем изобретении, с использованием ДНК-иммунизации сначала вводят животному, подлежащему иммунизации, ДНК, экспрессирующую белок GPC3. ДНК, кодирующую GPC3, можно синтезировать с помощью известных методов, таких как ПЦР. Полученную ДНК встраивают в соответствующий экспрессионный вектор и затем его вводят животному, подлежащему иммунизации. Предпочтительно применяемые для этой цели экспрессионные векторы включают, например, поступающие в продажу экспрессионные векторы, такие как pcDNA3.1. Векторы можно вводить в организм с помощью общепринятых методов. Например, ДНК-иммунизацию осуществляют с использованием генной пушки для интродукции золотых частиц, покрытых экспрессионным вектором, в клетки тела животного, подлежащего иммунизации. Антитела, распознающие GPC3, можно получать также методами, описанными в WO 2003/104453.

После описанной выше иммунизации млекопитающего у него подтверждают в сыворотке повышенный титр GPC3-связывающего антитела. После этого получают из организма млекопитающего иммунные клетки и затем используют их для клеточного слияния. В частности, в качестве иммунных клеток предпочтительно применяют спленоциты.

Клетку миеломы млекопитающих применяют в качестве клетки, подлежащей слиянию с вышеуказанным иммуноцитом. Клетки миеломы предпочтительно содержат приемлемый маркер селекции для скрининга. Маркер селекции придает клеткам характеристики, обеспечивающие их выживание (или гибель) в специфических условиях культивирования. В качестве маркера селекции известны дефицит гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (сокращенно обозначенный далее в контексте настоящего описания как дефицит HGPRT) и дефицит тимидинкиназы (сокращенно обозначенный далее в контексте настоящего описания как дефицит ТК). Клетки с дефицитом HGPRT или ТК обладают чувствительностью к гипоксантин-аминоптерин-тимидину (сокращенно обозначена далее в контексте настоящего описания как ГАТ-чувствительность). Клетки с ГАТ-чувствительностью не могут синтезировать ДНК в селекционной ГАТ-среде и в результате погибают. Однако, когда клетки сливают со здоровыми клетками, они могут продолжать синтез ДНК с использованием «реутилизационного» пути здоровых клеток, и в результате они могут расти даже в селекционной ГАТ-среде.

Клетки с HGPRT-дефицитом и ТК-дефицитом можно отбирать в среде, содержащей

6-тиогуанин, 8-азагуанин (сокращенно обозначенный далее в контексте настоящего описания как 8AG) или 5'-бромдезоксисуридин соответственно. Здоровые клетки уничтожаются, поскольку они включают эти пиримидиновые аналоги в их ДНК. При этом клетки с дефицитом этих ферментов могут выживать в селекционной среде, поскольку они не могут включать указанные пиримидиновые аналоги. Кроме того, к маркеру селекции относится устойчивость к G418, которая обеспечивается геном устойчивости к неомицину, придающим устойчивость к 2-дезоксистрептаминам антибиотикам (аналоги гентамицина). Известны различные типы клеток миелом, которые можно применять для клеточного слияния.

Например, в качестве клеток миеломы предпочтительно можно применять следующие клетки:

P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. 123 (4), 1979, cc.1548-1550);

P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology 81, 1978, cc.1-7);

NS-1 (C. Eur. J. Immunol. 6 (7), 1976, cc.511-519);

MPC-11 (Cell 8 (3), 1976, cc.405-415);

SP2/0 (Nature 276 (5685), 1978, cc.269-270);

FO (J. Immunol. Methods 35 (1-2), 1980, cc.1-21);

S194/5.XX0.BU.1 (J. Exp. Med. 148 (1), 1978, cc.313-323);

R210 (Nature 277 (5692), 1979, cc.131-133) и т.д.

Клеточное слияние иммуноцитов и клеток миеломы, как правило, осуществляют с помощью известных методов, например, метода, описанного у Kohler и Milstein и др. (Methods Enzymol. 73, 1981, cc.3-46).

Более конкретно, клеточное слияние можно осуществлять, например, в общепринятой культуральной среде в присутствии усиливающего клеточное слияние агента.

Усиливающие клеточное слияние агенты включают, например, полиэтиленгликоль (ПЭГ) и вирус Сендай (гемагглютинирующий японский вирус мышей) (NVJ). При необходимости для повышения эффективности слияния добавляют также вспомогательную субстанцию, такую как диметилсульфоксид.

Соотношение иммуноцитов и клеток миеломы можно определять по усмотрению исследователя, предпочтительно, например, одна клетка миеломы на каждые 1-10 иммуноцитов. Культуральные среды, применяемые для клеточных слияний, включают, например, среды, пригодные для выращивания клеточных линий миелом, такие как среда RPMI1640 и среда MEM, а также другая общепринятая культуральная среда, применяемая для данного типа клеточной культуры. Кроме того, в культуральную среду предпочтительно можно добавлять добавки в виде сыворотки, такой как фетальная телячья сыворотка (FCS).

Для клеточного слияния указанные выше иммунные клетки и клетки миеломы, взятые в предварительно определенных количествах, хорошо перемешивают в указанной выше культуральной среде. Затем к ней добавляют предварительно нагретый до температуры примерно 37°C раствор ПЭГ (например, средняя молекулярная масса которого составляет примерно от 1000 до 6000) в концентрации, составляющей, как правило, от 30 до 60% (мас./об.). Смесь осторожно перемешивают до получения требуемых слитых клеток (гибридомы). Затем указанную выше культуральную среду постепенно добавляют к клеткам и повторно центрифугируют для удаления супернатанта. Таким путем можно удалять агенты для клеточного слияния, которые являются нежелательными для роста гибридом.

Полученные таким образом гибридомы можно отбирать путем культивирования, используя общепринятую селективную среду, например, ГАТ-среду (культуральная

среда, содержащая гипоксантин, аминоптерин и тимидин). Клетки, отличные от требуемых гибридом (неслитые клетки), можно уничтожать путем последующего культивирования в вышеуказанной ГАТ-среде в течение достаточного периода времени. Как правило, период составляет от нескольких дней до нескольких недель. Затем

5 осуществляют скрининг гибридом, продуцирующих требуемое антитело, и по отдельности клонируют с помощью общепринятых методов серийных разведений.

Полученные таким образом гибридомы можно отбирать, используя селекционную среду на основе маркера селекции, который несут клетки миеломы, применяемые для клеточного слияния. Например, клетки с HGPRT- или ТК-дефицитом можно отбирать

10 путем культивирования с использованием ГАТ-среды (культуральная среда, содержащая гипоксантин, аминоптерин и тимидин). А частности, когда для клеточного слияния используют чувствительные к ГАТ клетки миеломы, то клетки, для которых характерно успешное слияние со здоровыми клетками, могут избирательно размножаться в ГАТ-среде. Клетки, отличные от требуемых гибридом (неслитые клетки), можно уничтожать

15 путем культивирования в вышеуказанной ГАТ-среде в течение достаточного периода времени. В частности, требуемые гибридомы можно отбирать путем культивирования, как правило, в течение периода времени, составляющего от нескольких дней до нескольких недель. Затем осуществляют скрининг гибридом, продуцирующих требуемое антитело, и по отдельности клонируют с помощью общепринятых методов серийных

20 разведений.

Требуемые антитела предпочтительно можно отбирать и по отдельности клонировать с помощью методов скрининга, основанных на известной реакции антиген/антитело. Например, GPC3-связывающее моноклональное антитело может связываться с GPC3, экспрессируемым на клеточной поверхности. Можно осуществлять скрининг указанных

25 моноклональных антител с помощью метода разделения клеток на основе возбуждения флуоресценции (FACS). FACS представляет собой систему, которая позволяет оценивать связывание антитела с клеточной поверхностью посредством анализа клеток, контактирующих с флуоресцентным антителом, с использованием лазерного пучка, и путем оценки флуоресценции, испускаемой индивидуальными клетками.

Для скрининга с использованием FACS в отношении гибридом, которые продуцируют моноклональное антитело, предлагаемое в настоящем изобретении, прежде всего получают экспрессирующие GPC3 клетки. Клетки, которые предпочтительно используют для скрининга, представляют собой клетки млекопитающих, в которых происходит принудительная экспрессия GPC3. В качестве контроля можно избирательно определять

35 с использованием нетрансформированных клеток млекопитающих в качестве клеток-хозяев способность антитела связываться с расположенным на клеточной поверхности GPC3. В частности, гибридомы, продуцирующие моноклональное антитело к GPC3, можно выделять путем отбора гибридом, которые продуцируют антитело, связывающееся с клетками, принудительно экспрессирующими GPC3, но не с клетками-хозяевами.

40

Альтернативно этому способность антитела связываться с иммобилизованными экспрессирующими GPC3 клетками можно оценивать на основе принципа ELISA. Например, экспрессирующие GPC3 клетки иммобилизуют на лунках планшета для ELISA. Супернатанты культур гибридом приводят в контакт с иммобилизованными

45 клетками в лунках и выявляют антитела, которые связываются с иммобилизованными клетками. Когда моноклональные антитела имеют мышинное происхождение, то антитела, связанные с клетками, можно выявлять с помощью антитела к мышинному иммуноглобулину. Гибридомы, продуцирующие требуемое антитело, которое обладает

антигенсвязывающей активностью, отбирают путем описанного выше скрининга, и их можно клонировать методом серийных разведений или сходным методом.

Полученные таким путем гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела, можно пересевать в общепринятую культуральную среду и хранить в жидком азоте в течение длительного периода времени.

Указанные выше гибридомы культивируют с помощью общепринятого метода и требуемые моноклональные антитела можно получать из супернатантов культур. Альтернативно этому гибридомы интродуцируют и выращивают в пригодных для этой цели млекопитающих и моноклональные антитела получают из асцитов. Первый метод пригоден для получения антител с высокой степенью чистоты.

Предпочтительно можно применять также антитела, кодируемые генами антител, которые клонированы из продуцирующих антитела клеток, таких как указанные выше гибридомы. Клонированный ген антитела встраивают в соответствующий вектор и его интродуцируют в хозяина для экспрессии кодируемого геном антитела. Методы выделения генов антител, встраивания генов в векторы и трансформации клеток-хозяев разработаны ранее (см., например, Vandamme и др., Eur. J. Biochem. 192(3), 1990, сс.767-775). Методы получения рекомбинантных антител также известны и описаны ниже.

Например, кДНК, кодирующую вариабельную область (V-область) антитела к GPC3, получают из клеток гибридомы, экспрессирующих антитело к GPC3. Для этой цели сначала из гибридом экстрагируют общую РНК. Методы, которые применяют для экстракции мРНК из клеток, включают, например:

- метод ультрацентрифугирования в присутствии гуанидина (Biochemistry 18(24), 1979, сс.5294-5299) и

- AGPC-метод (Anal. Biochem. 162(1), 1987, сс.156-159).

Экстрагированные мРНК можно очищать с помощью набора для очистки мРНК (фирма GE Healthcare Bioscience) или аналогичного набора. В качестве альтернативы можно применять также поступающие в продажу наборы для экстракции мРНК непосредственно из клеток, такие как набор для очистки мРНК QuickPrep (фирма GE Healthcare Bioscience). мРНК можно получать из гибридом с использованием таких наборов. Кодирующие V-область антитела кДНК можно синтезировать из полученных мРНК с помощью обратной транскриптазы. кДНК можно синтезировать с помощью набора для синтеза первой цепи кДНК, содержащего обратную транскриптазу AMV (Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit) (фирма Seikagaku Co.) или аналогичного набора. Кроме того, для синтеза и амплификации кДНК можно применять набор для амплификации кДНК SMART RACE (фирма Clontech) и основанный на ПЦР 5'-RACE-(быстрая амплификация концов кДНК)-метод (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (23), 1988, сс.8998-9002; Nucleic Acids Res. 17(8), 1989, сс.2919-2932). При таком процессе синтеза кДНК соответствующие описанные ниже сайты, распознаваемые рестриктазами, можно интродуцировать на оба конца кДНК.

Представляющий интерес фрагмент кДНК очищают из полученного ПЦР-продукта и затем его встраивают путем лигирования в ДНК-вектор. Таким путем создают рекомбинантный вектор и интродуцируют в E.coli или подобного хозяина. После селекции колоний требуемый рекомбинантный вектор можно получать из колониеобразующих E.coli. Затем с использованием известного метода, такого как метод терминации нуклеотидной цепи, определяют, имеет ли рекомбинантный вектор представляющую интерес нуклеотидную последовательность кДНК.

5'-RACE-метод, в котором используют праймеры для амплификации гена вариабельной области, как правило, применяют для выделения гена, кодирующего

вариабельную область. Сначала конструируют библиотеку кДНК, применяемую для 5'-RACE (5'-RACE-библиотека кДНК) с использованием РНК, экстрагированных из клеток гибридомы, в качестве матрицы. Для синтеза 5'-RACE-библиотеки кДНК можно использовать поступающий в продажу набор, такой как набор для амплификации кДНК SMART RACE.

Ген антитела амплифицируют с помощью ПЦР, используя полученную 5'-RACE-библиотеку кДНК в качестве матрицы. Праймеры для амплификации гена мышинового антитела можно создавать на основе известных генных последовательностей антител. Нуклеотидные последовательности праймеров варьируются в зависимости от подкласса иммуноглобулина. Таким образом, предпочтительно предварительно определять подкласс с помощью доступного набора, такого как набор для изотипирования мышинных моноклональных антител Iso Strip (Iso Strip mouse monoclonal antibody isotyping kit) (фирма Roche Diagnostics).

В частности, например, для выделения генов, кодирующих мышинный IgG, применяют праймеры, которые обеспечивают амплификацию генов, кодирующих тяжелые цепи $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2b$ и $\gamma 3$ и легкие цепи κ и λ . В целом, праймер, сайт гибридизации («отжига») которого с константной областью расположен вблизи вариабельной области, применяют в качестве 3'-концевого праймера для амплификации гена вариабельной области IgG. При этом праймер, присоединенный к набору конструкций 5' RACE-библиотеки кДНК, применяют в качестве 5'-концевого праймера.

Амплифицированные таким образом ПЦР-продукты применяют для реконструирования иммуноглобулинов, состоящих из комбинации тяжелых и легких цепей. Требуемое антитело можно отбирать, используя в качестве показателя GPC3-связывающую активность реконструированного иммуноглобулина. Например, когда задачей является выделение антитела к GPC3, то более предпочтительно, чтобы связывание антитела с GPC3 являлось специфическим. Можно осуществлять скрининг GPC3-связывающих антител, например, с использованием следующих стадий, на которых:

- (1) приводят в контакт экспрессирующую GPC3 клетку с антителом, содержащим V-область, которая кодируется кДНК, выделенной из гибридомы;
- (2) определяют связывания антитела с экспрессирующей GPC3 клеткой; и
- (3) отбирают антитело, которое связывается с экспрессирующей GPC3 клеткой.

Методы определения связывания антитела с экспрессирующими GPC3 клетками, являются известными. В частности, связывание антитела с экспрессирующими GPC3 клетками можно определять с помощью описанных выше методик, таких как FACS. Имобилизованные образцы экспрессирующих GPC3 клеток можно применять для оценки связывающей активности антитела.

Предпочтительные методы скрининга антител, в которых используют связывающую активность в качестве показателя, включают также методы пэннинга, основанные на использовании фаговых векторов. Методы скрининга с использованием фаговых векторов имеют преимущество, когда гены антитела выделяют из библиотек подкласса тяжелой цепи и легкой цепи из популяции клеток, экспрессирующих поликлональные антитела. Гены, кодирующие вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи, можно сшивать с помощью приемлемой линкерной последовательности с образованием одноцепочечного Fv (scFv). Фаги, презентующие на своей поверхности scFv, можно получать путем встраивания гена, кодирующего scFv, в фаговый вектор. Фаги приводят в контакт с представляющим интерес антигеном. Затем ДНК, кодирующую scFv, который обладает представляющей интерес связывающей активностью, можно выделять

путем сбора фагов, связанных с антигеном. Указанный процесс можно повторять при необходимости для обогащения scFv, которые обладают представляющей интерес связывающей активностью.

После выделения кДНК, кодирующей V-область представляющего интерес антитела к GPC3, кДНК расщепляют рестриктазами, которые распознают сайты рестрикции, интродуцированные в оба конца кДНК. Предпочтительные рестриктазы распознают и расщепляют нуклеотидную последовательность, которая встречается с низкой частотой в нуклеотидной последовательности гена антитела. Кроме того, для встраивания однокопийного расщепленного фрагмента в правильной ориентации предпочтительно интродуцируют в представляющий интерес вектор сайт рестрикции для фермента, который образует «липкий» конец. Кодирующую V-область антитела к GPC3 кДНК расщепляют согласно описанному выше методу и встраивают в приемлемый экспрессионный вектор для создания экспрессионного вектора антитела. В том случае, когда ген, кодирующий константную область (С-область) антитела, и ген, кодирующий указанную выше V-область, сливают в рамке считывания, то получают химерное антитело. В контексте настоящего описания «химерное антитело» означает, что константная область и переменная область отличаются по своему происхождению. Так, помимо мышинных/человеческих гетерохимерных антител к химерным антителам, предлагаемым в настоящем изобретении, относятся также человеческие/человеческие аллохимерные антитела. Экспрессионный вектор химерного антитела можно создавать путем встраивания указанного выше гена V-области в экспрессионный вектор, который уже содержит константную область. В частности, например, последовательность, распознаваемую рестриктазой, которая вырезает указанный выше ген V-области, предпочтительно следует помещать в 5'-область экспрессионного вектора, несущего ДНК, которая кодирует константную область (С-область) требуемого антитела. Экспрессионный вектор химерного антитела создают путем слияния в рамке считывания двух генов, расщепленных одной и той же комбинацией рестриктаз.

Для получения моноклонального антитела к GPC3 гены антитела встраивают в экспрессионный вектор таким образом, чтобы экспрессия генов происходила под контролем регулирующей экспрессию области. Регулирующая экспрессию область, предназначенная для экспрессии антител, включают, например, энхансеры и промоторы. Кроме того, соответствующую сигнальную последовательность можно присоединять к аминоконцу таким образом, чтобы антитело секретировалось из клеток наружу. В описанных ниже примерах в качестве сигнальной последовательности применяют пептид, который имеет аминокислотную последовательность MGWSCIIIFLVATATGVHS (SEQ ID NO:72). Наряду с ней можно присоединять другие приемлемые сигнальные последовательности. Экспрессированный полипептид расщепляется на карбоксильном конце указанной выше последовательности и образовавшийся полипептид секретруется из клеток наружу в виде зрелого полипептида. Затем приемлемые клетки-хозяева трансформируют экспрессионным вектором и получают рекомбинантные клетки, экспрессирующие ДНК, которая кодирует антитело к GPC3.

ДНК, которые кодируют тяжелую цепь антитела (H-цепь) и легкую цепь антитела (L-цепь), встраивают по отдельности в различные экспрессионные векторы для экспрессии гена антитела. Молекулу антитела, имеющую H- и L-цепи, можно экспрессировать, осуществляя для этой цели контрансфекцию одной и той же клетки-хозяина векторами, в которые встроены соответственно гены H-цепи и L-цепи. В качестве альтернативы, клетки-хозяева можно трансформировать одним экспрессионным вектором, в который встроены ДНК, кодирующие H- и L-цепи (см. WO 94/11523).

Известны различные комбинации клеток-хозяев/экспрессионных векторов для получения антитела путем интродукции выделенных генов антител в соответствующих хозяев. Все эти системы экспрессии можно применять для выделения антигенсвязывающих доменов и CD3-связанных доменов, предлагаемых в настоящем изобретении. Приемлемыми эукариотическими клетками, которые применяют в качестве клеток-хозяев, являются клетки животных, клетки растений и клетки грибов. В частности, клетки животных представляют собой, например, следующие клетки:

(1) клетки млекопитающих: CHO, COS, миеломы, почки детеныша хомяка (BHK), HeLa, Vero или т.п.;

(2) клетки амфибий: ооциты шпорцевой лягушки (*Xenopus*) или т.п. и

(3) клетки насекомых: sf9, sf21, Tn5 или т.п.

Кроме того, в качестве растительной клетки известна система экспрессии генов антитела, в которой используют клетки, полученные из представителей рода *Nicotiana*, например, *Nicotiana tabacum*. Для трансформации растительных клеток можно применять культивированные клетки каллуса.

Кроме того, следующие клетки можно применять в качестве грибных клеток: дрожжи: рода *Saccharomyces*, например, *Saccharomyces cerevisiae*, и рода *Pichia*, например, *Pichia pastoris*, и

нитчатые грибы: рода *Aspergillus*, например, *Aspergillus niger*.

Кроме того, известны системы экспрессии генов антитела, в которых используют прокариотические клетки. Например, согласно настоящему изобретению можно применять бактериальные клетки, т.е. клетки *E.coli*, клетки *Bacillus subtilis* и т.п. Экспрессионные векторы, которые несут представляющие интерес гены антитела, интродуцируют в эти клетки путем трансфекции. Трансфектированные клетки культивируют *in vitro*, и требуемое антитело можно получать из культуры трансформированных клеток.

Помимо указанных выше клеток-хозяев для получения рекомбинантного антитела можно применять также трансгенных животных. Это означает, что антитело можно получать из животного, в организм которого интродуцирован ген, кодирующий представляющее интерес антитело. Например, ген антитела можно создавать в виде слитого гена посредством встраивания в рамке считывания в ген, кодирующего белок, который специфически образуется в молоке. В качестве белка, секретируемого в молоко, можно применять, например, козий β -казеин. ДНК-фрагменты, содержащие слитый ген, в который входит ген антитела, инъецируют в эмбрион козы и затем этот эмбрион интродуцируют в самку козы. Требуемое антитело можно получать в виде белка, слитого с молочным белком из молока трансгенной козы, родившейся от козы, являющейся реципиентом эмбриона (или ее потомства). Кроме того, для увеличения объема молока, содержащего требуемое антитело, которое продуцируется трансгенной козой, трансгенной козе можно при необходимости вводить гормоны (Ebert K. M. и др., *Bio/Technology* 12 (7), 1994, сс.699-702).

Когда полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, вводят человеку, то в качестве антигенсвязывающего домена комплекса можно применять также антигенсвязывающий домен, выведенный из антитела, полученного путем генетической рекомбинации, которое искусственно модифицировано для снижения гетерологичной антигенности в отношении человека и других животных. Указанные антитела, полученные путем генетической рекомбинации, включают, например, гуманизированные антитела. Эти модифицированные антитела можно получать с помощью известных методов.

Вариабельная область антитела, применяемая для получения антигенсвязывающего домена полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании, как правило, состоит из трех гипервариабельных участков (CDR), разделенных четырьмя каркасными участками (FR). CDR представляет собой область, которая в значительной степени определяет специфичность связывания антитела. Для аминокислотных последовательностей CDR характерна высокая степень variability. С другой стороны, образующие FR аминокислотные последовательности часто обладают высокой идентичностью даже среди антител с различными специфичностями связывания. Таким образом, как правило, путем трансплантации CDR специфичность связывания конкретного антитела можно интродуцировать в другое антитело.

Гуманизированное антитело называют также реконструированным человеческим антителом. В частности, известны гуманизированные антитела, полученные путем трансплантации CDR антитела животного кроме человека, такого как мышинное антитело, в человеческое антитело и т.п. Известны также общепринятые методики генной инженерии, предназначенные для получения гуманизированных антител. В частности, например, ПЦР с перекрывающимися праймерами представляет собой известный метод трансплантации CDR мышинного антитела в человеческий FR. При осуществлении ПЦР с перекрывающимися праймерами нуклеотидную последовательность, которая кодирует CDR мышинного антитела, подлежащий трансплантации, добавляют к праймерам, предназначенным для синтеза FR человеческого антитела. Получают праймеры для каждого из четырех FR. Принято считать, что когда осуществляют трансплантацию мышинного CDR в человеческий FR, то для поддержания функции CDR целесообразно выбирать человеческий FR, обладающий высоким уровнем идентичности с мышинным FR. Таким образом, как правило, является предпочтительным применять человеческий FR, который содержит аминокислотную последовательность, обладающую высоким уровнем идентичности с аминокислотной последовательностью FR, который примыкает к подлежащему трансплантации мышинному CDR.

Нуклеотидные последовательности, подлежащие лигированию, создают таким образом, чтобы они были соединены друг с другом в рамке считывания. Человеческие FR синтезируют индивидуально с использованием соответствующих праймеров. В результате получают продукты, в которых ДНК, кодирующая мышинный CDR, присоединена к индивидуальным ДНК, кодирующим FR. Нуклеотидные последовательности, кодирующие мышинный CDR каждого продукта, создают таким образом, чтобы они перекрывались друг с другом. Затем осуществляют реакцию синтеза комплементарной цепи для «отжига» перекрывающихся CDR-участков продуктов, синтезированных с использованием гена человеческого антитела в качестве матрицы. С помощью этой реакции человеческие FR встраивают путем лигирования через мышинные CDR-последовательности.

Полноразмерный ген V-области, в которую, в конце концов, лигированы три CDR и четыре FR, амплифицируют с использованием праймеров, гибридизующихся с 5'- или 3'-концом, которые добавляют с последовательностями, распознаваемыми приемлемыми рестриктазами. Экспрессионный вектор для гуманизированного антитела можно получать путем встраивания полученной согласно описанному выше методу ДНК и ДНК, которая кодирует С-область человеческого антитела, в экспрессионный вектор таким образом, чтобы лигировать их в рамке считывания. После трансфекции хозяина рекомбинантным вектором для создания рекомбинантных клеток рекомбинантные клетки культивируют и ДНК, кодирующую гуманизированное антитело, экспрессируют

с получением гуманизированного антитела в культуре клеток (см. публикацию европейского патента EP 239400 и публикацию международной заявки на патент WO 1996/002576).

Путем качественной или количественной оценки и измерения антигенсвязывающей активности гуманизированного антитела, полученного согласно описанному выше методу, можно отбирать FR человеческого антитела, которые позволяют CDR образовывать предпочтительный антигенсвязывающий центр при лигировании посредством CDR. Аминокислотные остатки в FR при необходимости можно заменять так, чтобы CDR реконструированного человеческого антитела образовывали приемлемый антигенсвязывающий центр. Например, мутации аминокислотной последовательности можно интродуцировать в FR, используя ПЦР-метод, применяемый для трансплантации мышиног CDR в человеческий FR. Более конкретно, мутации неполной нуклеотидной последовательности можно интродуцировать в праймеры, гибридизующиеся с FR. Мутации нуклеотидной последовательности интродуцируют в FR, синтезированные с использованием указанных праймеров. Мутантные последовательности FR, имеющие требуемые характеристики, можно отбирать путем измерения и оценки активности мутантного антитела с аминокислотной заменой в отношении связывания с антигеном с помощью упомянутого выше метода (Sato K. и др., Cancer Res. 53, 1993, ss.851-856).

В качестве альтернативы, требуемые человеческие антитела можно получать путем иммунизации трансгенных животных, имеющих полный спектр генов человеческого антитела (см. WO 1993/012227; WO 1992/003918; WO 1994/002602; WO 1994/025585; WO 1996/034096; WO 1996/033735), с использованием ДНК-иммунизации.

Кроме того, известны методики получения человеческих антител путем пэннинга с использованием библиотек человеческих антител. Например, V-область человеческого антитела экспрессируют в виде одноцепочечного антитела (scFv) на поверхности фага с использованием метода фагового дисплея. Можно отбирать фаги, экспрессирующие scFv, который связывается с антигеном. Последовательность ДНК, кодирующую V-область человеческого антитела, которая связывается с антигеном, можно определять путем анализа генов отобранных фагов. Определяют последовательность ДНК scFv, который связывается с антигеном. Экспрессионный вектор получают путем слияния последовательности V-области в рамке считывания с последовательностью C-области требуемого человеческого антитела и последующего встраивания в приемлемый экспрессионный вектор. Экспрессионный вектор интродуцируют в клетку, пригодную для указанной выше экспрессии. Человеческое антитело можно получать путем экспрессии гена, кодирующего человеческое антитело, в клетках. Такие методы уже описаны (см. WO 1992/001047; WO 1992/020791; WO 1993/006213; WO 1993/011236; WO 1993/019172; WO 1995/001438; WO 1995/015388).

Антигенсвязывающий домен

В контексте настоящего описания «антигенсвязывающий домен» относится к участку антитела, содержащему область, которая специфически связывается и является комплементарной полному антигену или его участку. Когда молекулярная масса антигена является большой, то антитело может связываться только с конкретным участком антигена. Указанный конкретный участок называют «эпитопом».

Антигенсвязывающий домен может быть образован одним или несколькими переменными доменами антитела. Предпочтительно антигенсвязывающие домены содержат как переменную область легкой цепи (VL) антитела, так и переменную область тяжелой цепи (VH) антитела. Указанные предпочтительные антигенсвязывающие

домены включают, например, «одноцепочечный Fv (scFv)», «одноцепочечное антитело», «Fv», «одноцепочечный Fv2 (scFv2)», «Fab» и «F(ab')2».

Антигенсвязывающие домены полипептидных комплексов, предлагаемых в настоящем изобретении, могут связываться с одним и тем же эпитопом. Эпитоп может присутствовать в белке, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 или 4. Альтернативно этому, антигенсвязывающие домены полипептидных комплексов, предлагаемых в настоящем изобретении, могут индивидуально связываться с различными эпитопами. Эпитоп может присутствовать в белке, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2 или 4.

10 Специфичность

«Специфичность» означает, что молекула, которая связывается специфически с одним или несколькими партнерами по связыванию, не обладает какой-либо значимой способностью связываться с молекулами, отличными от указанных партнеров. Кроме того, понятие «специфичность» используют также, когда антигенсвязывающий домен является специфическим в отношении конкретного эпитопа из нескольких эпитопов, входящих в антиген. Когда эпитоп, с которым связывается антигенсвязывающий домен, входит в несколько различных антигенов, то полипептидный комплекс, содержащий антигенсвязывающий домен, может связываться с различными антигенами, которые содержат эпитоп.

20 Антиген

Настоящее описание не ограничено каким-либо конкретным антигеном, и можно применять любой антиген за исключением CD3. Указанные антигены включают, например, рецепторы, раковые антигены, антигены ГКГ и дифференцированные антигены. Рецепторы включают рецепторы, принадлежащие к семейству рецепторов гематопозитического фактора роста, семейству цитокиновых рецепторов, семейству тирозинкиназных рецепторов, семейству серин/треонинкиназных рецепторов, семейству TNF-рецепторов, семейству рецепторов, связанных с G-белками, семейству GPI-заякоренных рецепторов, семейству тирозинфосфатазных рецепторов, семейству факторов адгезии и семейству рецепторов гормонов. Рецепторы, принадлежащие к этим семействам рецепторов, и их характеристики описаны в различных документах, например, в обзорах, таких как New Comprehensive Biochemistry под ред. Cooke B.A., King R.J.B., van der Molen H.J., т.18B «Hormones and their Actions Part II», 1988, сс.1-46, изд-во Elsevier Science Publishers BV.; и SAIBO KOGAKU (Cell Technology) Supplementary Volume Handbook Series «Secchaku Inshi Handbook (Handbook for Adhesion factors)» под ред. M. Miyasaka, 1994, Shujunsha, Tokyo, Japan; и у Patthy, Cell, 61(1), 1990, сс.13-14; Ullrich и др., Cell 61(2), 1990, сс.203-212; Massague, Cell 69(6), 1992, сс.1067-1070; Miyajima и др., Annu. Rev. Immunol. 10, 1992, сс.295-331; Taga и др., FASEB J. 6, 1992, сс.3387-3396; Fantl и др., Annu. Rev. Biochem. 62, 1993, сс.453-481; Smith и др., Cell 76(6), 1994, сс.959-962, Flower D.R. в Biochim. Biophys. Acta: Flower Biochim. Biophys. Acta, 1422(3), 1999, сс.207-234.

В частности, рецепторы, принадлежащие к указанным выше семействам рецепторов, предпочтительно включают, например, рецепторы человеческого и мышинного эритропоэтина (ЕРО) (Blood 76(1), 1990, сс.31-35; Cell 57(2), 1989, сс.277-285), рецепторы человеческого и мышинного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87(22), 1990, сс.8702-8706; mG-CSFR, Cell 61(2), 1990, сс.341-350), рецепторы человеческого и мышинного тромбопоэтина (ТРО) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(12), 1992, сс.5640-5644; EMBO J. 12(7), 1993, сс.2645-53), рецепторы человеческого и мышинного инсулина (Nature 313(6005), 1985, сс.756-761), рецепторы

человеческого и мышиногo лиганда Flt-3 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(2), 1994, сс.459-463), рецепторы человеческого и мышиногo тромбоцитарного фактора роста (PDGF) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85(10), 1988, сс.3435-3439), рецепторы человеческого и мышиногo интерферона (IFN)- α и - β (Cell 60(2), 1990, сс.225-234; и Cell 77(3), 1994, сс.391-400), рецепторы человеческого и мышиногo лептина, рецепторы человеческого и мышиногo гормона роста (GH), рецепторы человеческого и мышиногo интерлейкина (IL)-10, рецепторы человеческого и мышиногo инсулиноподобного фактора роста (IGF)-I, рецепторы человеческого и мышиногo лейкоингибирующего фактора (LIF) и рецепторы человеческого и мышиногo цилиарного нейротрофического фактора (CNTF).

Раковые антигены представляют собой антигены, которые экспрессируются в том случае, когда клетки становятся злокачественными, и их обозначают также как «специфические для опухоли антигены». Кроме того, аномальные сахарные цепи, которые экспрессируются на клеточной поверхности или молекулах белков, когда клетки становятся раковыми, также представляют собой раковые антигены и их обозначают как «ассоциированные с раком углеводные антигены». Указанные раковые антигены включают, например, GPC3 (Int J Cancer. 103(4), 2003, сс.455-465), EpCAM (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86(1), 1989, сс.27-31), EGFR, CA19-9, CA15-3 и сialiн SLX). GPC3 принадлежит к указанному выше семейству GPI-заякоренных рецепторов, и он экспрессируется при нескольких типах рака, включая рак печени. EpCAM экспрессируется при множестве видов рака, включая рак легкого, и его полинуклеотидные и полипептидные последовательности представлены в базе данных RefSeq под регистрационными номерами NM_002354.2 (SEQ ID NO:3) и NP_002345.2 (SEQ ID NO:4) соответственно.

Как правило, антигены ГКГ подразделяют на антигены ГКГ класса I и класса II.

Антигены ГКГ класса I включают HLA-A, -B, -C, -E, -F, -G и -H, а антигены ГКГ класса II включают HLA-DR, -DQ и -DP.

Дифференцированные антигены включают CD1, CD2, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD13, CD14, CD15s, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD23, CD25, CD28, CD29, CD30, CD32, CD33, CD34, CD35, CD38, CD40, CD41a, CD41b, CD42a, CD42b, CD43, CD44, CD45, CD45RO, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD51, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD64, CD69, CD71, CD73, CD95, CD102, CD106, CD122, CD126 и CDw130.

Эпитоп

«Эпитоп» означает антигенную детерминанту в антигене и относится к антигенному сайту, с которым связывается антигенсвязывающий домен полипептидного комплекса, представленного в настоящем описании. Так, например, эпитоп можно характеризовать на основе его структуры. Альтернативно этому, эпитоп можно характеризовать на основе антигенсвязывающей активности полипептидного комплекса, который распознает эпитоп. Когда антиген представляет собой пептид или полипептид, то эпитоп можно определять по аминокислотным остаткам, образующим эпитоп. Альтернативно этому, когда эпитоп представляет собой сахарную цепь, то эпитоп можно определять по специфической для него структуре сахарной цепи.

Линейный эпитоп представляет собой эпитоп, который содержит эпитоп, у которого распознается первичная аминокислотная последовательность. Указанный линейный эпитоп, как правило, содержит по меньшей мере три и наиболее часто по меньшей мере пять, например, примерно от 8 до 10 или от 6 до 20 аминокислотных остатков в определенной последовательности.

В отличие от линейного эпитопа «конформационный эпитоп» представляет собой

эпитоп, в котором первичная аминокислотная последовательность, составляющая эпитоп, не является единственной детерминантой распознаваемого эпитопа (например, не является обязательным, чтобы первичная аминокислотная последовательность конформационного эпитопа распознавалась специфическим в отношении эпитопа антителом). Конформационные эпитопы могут содержать большее количество аминокислотных остатков по сравнению с линейными эпитопами. Распознающее конформационный эпитоп антитело распознает трехмерную структуру пептида или белка. Например, когда белковая молекула уложена и образует трехмерную структуру, аминокислоты и/или полипептидные основные цепи, которые образуют конформационный эпитоп, выравниваются, и эпитоп становится распознаваемым для антитела. Методы определения конформаций эпитопов включают (но, не ограничиваясь только ими), например, рентгеновскую кристаллографию, двухмерный ядерный магнитный резонанс, сайтспецифическое спиновое мечение и электронный парамагнитный резонанс (см., например, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, под ред. Morris, т.66, 1996).

Примеры методов оценки связывания эпитопа тестируемым полипептидным комплексом, содержащим домен, связывающий антиген GPC3, описаны ниже. Можно применять также описанные ниже в качестве примеров методы оценки связывания эпитопа тестируемым полипептидным комплексом, содержащим антигенсвязывающий домен для антигена, отличного от GPC3.

Например, для подтверждения того, что тестируемый полипептидный комплекс, содержащий домен, связывающий антиген GPC3, распознает линейный эпитоп в молекуле GPC3, можно применять описанный ниже метод. Для указанной выше цели синтезируют линейный пептид, содержащий аминокислотную последовательность, образующую внеклеточный домен GPC3. Пептид можно синтезировать химически или получать с помощью методов генной инженерии, используя область в кДНК GPC3, которая кодирует аминокислотную последовательность, соответствующую внеклеточному домену. Затем тестируемый полипептидный комплекс, содержащий домен, связывающий антиген GPC3, оценивают в отношении его активности связывания с линейным пептидом, который содержит аминокислотную последовательность, образующую внеклеточный домен. Например, иммобилизованный линейный пептид можно применять в качестве антигена при осуществлении ELISA для оценки активности в отношении связывания полипептидного комплекса с пептидом. Альтернативно этому, активность связывания с линейным пептидом можно оценивать по уровню ингибирования линейным пептидом связывания полипептидного комплекса с экспрессирующими GPC3 клетками. Эти анализы могут демонстрировать активность связывания полипептидного комплекса с линейным пептидом.

Обладает ли полипептидный комплекс, содержащий домен, связывающий антиген GPC3, способностью распознавать конформационный эпитоп, можно определять следующим образом. Для указанной выше цели получают экспрессирующие GPC3 клетки. Считается, что тестируемый полипептидный комплекс, содержащий домен, связывающий антиген GPC3, распознает конформационный эпитоп, если он при контакте отличается сильным связыванием с экспрессирующими GPC3 клетками, но незначительно связывается с иммобилизованным линейным пептидом, который содержит аминокислотную последовательность, образующую внеклеточный домен GPC3. В контексте настоящего описания «незначительно связывается» означает, что активность связывания составляет 80% или менее, как правило, 50% или менее, предпочтительно 30% или менее и наиболее предпочтительно 15% или менее по сравнению с активностью

связывания с клетками, экспрессирующими человеческий GPC3.

Методы оценки активности связывания тестируемого полипептидного комплекса, содержащего домен, связывающий антиген GPC3, с экспрессирующими GPC3 клетками включают, например, методы, описанные в: *Antibodies: A Laboratory Manual* (под ред. Harlow, David Lane, изд-во Cold Spring Harbor Laboratory, 1988, сс.359-420). В частности, 5 оценку можно осуществлять на основе принципа ELISA или метода разделения клеток на основе возбуждения флуоресценции (FACS) с использованием в качестве антигена экспрессирующих GPC3 клеток.

В формате ELISA активность связывания тестируемого полипептидного комплекса, 10 содержащего домен, связывающий антиген GPC3, с экспрессирующими GPC3 клетками можно оценивать количественно путем сравнения уровней сигналов, возникающих в процессе ферментативной реакции. В частности, тестируемый полипептидный комплекс добавляют в планшет для ELISA, на котором иммобилизованы экспрессирующие GPC3 клетки. Затем тестируемый полипептидный комплекс, связанный с клетками, выявляют 15 с помощью меченого ферментом антитела, которое распознает тестируемый полипептидный комплекс. Альтернативно этому, когда применяют FACS, готовят серийные разведения тестируемого полипептидного комплекса и титр антитела, связывающегося с экспрессирующими GPC3 клетками, можно определять путем сравнения активности связывания с экспрессирующими GPC3 клетками.

Связывание тестируемого полипептидного комплекса с антигеном, который 20 экспрессируется на поверхности клеток, суспендированных в буфере или в сходной среде, можно выявлять с помощью проточного цитометра. Известными проточными цитометрами являются, например, следующие устройства:

FACSCanto™ II,

FACSAria™,

FACSArray™,

FACSVantage™ SE

FACSCalibur™ (все товарные знаки фирмы BD Biosciences),

EPICS ALTRA HyPerSort,

30 Cytomics FC 500,

EPICS XL-MCL ADC EPICS XL ADC,

Cell Lab Quanta/Cell Lab Quanta SC (все товарные знаки фирмы Beckman Coulter).

Предпочтительными методами оценки активности связывания тестируемого полипептидного комплекса, содержащего домен, связывающий антиген GPC3, с 35 антигеном является, например, следующий метод. Сначала экспрессирующие GPC3 клетки подвергают взаимодействию с тестируемым полипептидным комплексом, а затем его окрашивают меченым с помощью ФИТЦ вторичным антителом, которое распознает полипептидный комплекс. Тестируемый полипептидный комплекс соответствующим образом разводят приемлемым буфером с получением комплекса в 40 требуемой концентрации. Например, комплекс можно применять в концентрации, составляющей от 10 мкг/мл до 10 нг/мл. Затем определяют интенсивность флуоресценции и количество клеток с помощью FACSCalibur (фирма BD). Интенсивность флуоресценции, определенная с помощью анализов на основе программы CELL QUEST (фирма BD), а именно выраженная в виде средних геометрических значений, отражает уровень 45 связывания антитела с клетками. Это означает, что активность связывания тестируемого полипептидного комплекса, которая характеризуется количеством связанного тестируемого полипептидного комплекса, можно оценивать, определяя среднее геометрическое значение.

Имеет ли тестируемый полипептидный комплекс, содержащий домен, связывающий антиген GPC3, общий эпитоп с другим полипептидным комплексом, можно оценивать по конкуренции между двумя комплексами в отношении одного и того же эпитопа.

Конкуренцию между полипептидными комплексами можно определять путем анализа перекрестной блокады или с помощью сходного анализа. Например, предпочтительным анализом перекрестной блокады является конкурентный ELISA-анализ.

В частности, при осуществлении анализа перекрестной блокады белок GPC3, иммобилизованный в лунках титрационного микропланшета, предварительно инкубируют в присутствии полипептидного комплекса, рассматриваемого в качестве конкурента-кандидата, или без него, а затем вносят тестируемый полипептидный комплекс. Количество связанного с белком GPC3 тестируемого полипептидного комплекса в лунках находится в обратной корреляции с активностью связывания полипептидного комплекса, рассматриваемого в качестве конкурента-кандидата, который конкурирует за связывание с одним и тем же эпитопом. Это означает, что чем выше аффинность полипептидного комплекса, рассматриваемого в качестве конкурента-кандидата, к одному и тому же эпитопу, тем ниже активность связывания тестируемого полипептидного комплекса с сенсibilизированными белком GPC3 лунками.

Количество тестируемого полипептидного комплекса, связанного через белок GPC3 с лунками, легко определять путем предварительного мечения полипептидного комплекса. Например, меченный биотином полипептидный комплекс оценивают с использованием конъюгата авидин/пероксидаза и соответствующего субстрата. В частности, анализ перекрестной блокады, в котором применяют в качестве меток ферменты, такие как пероксидаза, называют «ELISA-анализом в конкурентных условиях (конкурентный анализ)». Полипептидный комплекс можно метить также с помощью других предназначенных для мечения субстанций, которые можно выявлять или оценивать. В частности, известны радиоактивные метки, флуоресцентные метки и т.п.

Когда полипептидный комплекс, рассматриваемый в качестве конкурента-кандидата, может блокировать связывание тестируемого полипептидного комплекса, который содержит домен, связывающий антиген GPC3, по меньшей мере на 20%, предпочтительно по меньшей мере на 20-50% и предпочтительно по меньшей мере на 50% по сравнению с активностью связывания, установленной в контрольном эксперименте, который проводят в отсутствие полипептидного комплекса, рассматриваемого в качестве конкурента-кандидата, то считается, что для тестируемого полипептидного комплекса характерна выраженная способность к связыванию с тем же эпитопом, с которым связывается полипептидный комплекс, рассматриваемый в качестве конкурента-кандидата, или он конкурирует за связывание с тем же самым эпитопом.

Если структура эпитопа, связанного с тестируемым полипептидным комплексом, который содержит домен, связывающий антиген GPC3, уже идентифицирована, то для решения вопроса о том, имеют ли тестируемый и контрольный полипептидные комплексы один и тот же эпитоп, можно сравнивать активности связывания двух полипептидных комплексов с пептидом, полученным путем интродукции аминокислотных мутаций в пептид, образующий эпитоп.

Для оценки указанных выше активностей связывания, например, сравнивают активности связывания тестируемого и контрольного полипептидных комплексов с линейным пептидом, в который интродуцирована мутация, с помощью указанного выше формата ELISA. Помимо метода ELISA активность связывания в отношении мутантного пептида, связанного с колонкой, можно определять, пропуская через колонку тестируемый и контрольный полипептидные комплексы и затем оценивая

количество полипептидного комплекса, элюированного в раствор для элюции. Известны методы адсорбции мутантного пептида на колонке, например, в форме слитого с GST пептида.

Альтернативно этому, когда идентифицированный эпитоп представляет собой конформационный эпитоп, то для решения вопроса о том, имеют ли тестируемый и контрольный полипептидные комплексы общий эпитоп, можно применять следующий метод. Сначала получают экспрессирующие GPC3 клетки и клетки, экспрессирующие GPC3 с мутацией, интродуцированной в эпитоп. Тестируемый и контрольный полипептидные комплексы добавляют в клеточную суспензию, полученную путем суспендирования этих клеток в приемлемом буфере, таком как ЗФР. Затем клеточные суспензии соответствующим образом отмывают буфером и добавляют меченное с помощью ФИТЦ антитело, которое распознает тестируемый и контрольный полипептидные комплексы. Определяют интенсивность флуоресценции и количество клеток, окрашенных меченым антителом, используя FACSCalibur (фирма BD). Тестируемый и контрольный полипептидные комплексы соответствующим образом разводят приемлемым буфером и применяют в требуемой концентрации. Например, их можно применять в концентрации от 10 мкг/мл до 10 нг/мл. Интенсивность флуоресценции определяют с помощью анализа, для оценки результатов которого применяют программу CELL QUEST (фирма BD), а именно определяют среднее геометрическое значение, которое отражает количество меченого антитела, связанного с клетками. Это означает, что активности связывания тестируемого и контрольного полипептидных комплексов, которые характеризуются количеством связанного меченого антитела, можно определять, оценивая среднее геометрическое значение.

При осуществлении описанного выше метода для решения вопроса о том, характерно ли для полипептидного комплекса «незначительное связывание с клетками, которые экспрессируют мутантный GPC3», можно применять, например, следующий метод. Сначала тестируемый и контрольный полипептидные комплексы, связанные с клетками, которые экспрессируют мутантный GPC3, окрашивают меченым антителом. Затем определяют интенсивность флуоресценции в клетках. Когда для оценки флуоресценции используют проточный цитометр, то интенсивность флуоресценции можно анализировать с помощью программы CELL QUEST. На основе средних геометрических значений в присутствии полипептидного комплекса и без него можно рассчитывать согласно приведенной ниже формуле используемое для сравнения значение ($\Delta\text{Geo-Mean}$), характеризующее степень увеличения интенсивности флуоресценции в результате связывания с полипептидным комплексом.

$$\Delta\text{Geo-Mean} = \text{Geo-Mean (в присутствии полипептидного комплекса)} / \text{Geo-Mean (в отсутствии полипептидного комплекса)}$$

Используемое для сравнения среднее геометрическое значение (значение $\Delta\text{Geo-Mean}$ для мутантной молекулы GPC3), определенное с помощью описанного выше анализа, которое отражает количество тестируемого полипептидного комплекса, связанного с клетками, которые экспрессируют мутантный GPC3, сравнивают с относительным значением $\Delta\text{Geo-Mean}$, которое отражает количество тестируемого полипептидного комплекса, связанного с экспрессирующими GPC3 клетками. В этом случае концентрации тестируемого полипептидного комплекса, применяемые для определения относительных значений $\Delta\text{Geo-Mean}$ для экспрессирующих GPC3 клеток и клеток, экспрессирующих мутантный GPC3, наиболее предпочтительно регулируют таким образом, чтобы они были одинаковыми или практически одинаковыми. Полипептидный комплекс, для которого подтверждена способность распознавать эпитоп в GPC3, применяют в качестве

контрольного полипептидного комплекса.

Если используемое для сравнения значение $\Delta\text{Geo-Mean}$ тестируемого полипептидного комплекса в отношении клеток, экспрессирующих мутантный GPC3, ниже чем используемое для сравнения значение $\Delta\text{Geo-Mean}$ тестируемого полипептидного комплекса в отношении клеток, экспрессирующих GPC3, по меньшей мере на 80%, предпочтительно на 50%, более предпочтительно на 30% и наиболее предпочтительно на 15%, то считают, что тестируемый полипептидный комплекс «незначительно связывается с клетками, которые экспрессируют мутантный GPC3». Формула определения значения Geo-Mean (среднее геометрическое значение) описана в руководстве по применению программы CELL QUEST (фирма BD biosciences). Когда путем сравнения установлено, что относительные значения являются практически эквивалентными, то можно считать, что тестируемый и контрольный полипептидные комплексы имеют одинаковый эпитоп.

Вариабельный фрагмент (Fv)

В контексте настоящего описания понятие «вариабельный фрагмент (Fv)» относится к минимальной единице выведенного из антитела антигенсвязывающего домена, который состоит из пары, включающей вариабельную область легкой цепи антитела (VL) и вариабельную область тяжелой цепи антитела (VH). В 1988 г. Skerra и Pluckthun обнаружили, что гомогенные и активные антитела можно получать из периплазматической фракции *E.coli* путем встраивания гена антитела по ходу транскрипции относительно бактериальной сигнальной последовательности и индукции экспрессии гена в *E.coli* (Science 240(4855), 1988, сс.1038-1041). В Fv, полученном из периплазматической фракции, VH ассоциируется с VL таким образом, чтобы связываться с антигеном.

Согласно настоящему описанию Fv предпочтительно включают, например, пару Fv, которые представляют собой полипептидный комплекс или т.п., содержащий:

(1) двухвалентный антигенсвязывающий домен, который представляет собой двухвалентный scFv, в котором один одновалентный scFv двухвалентного scFv сцеплен с одним полипептидом, образующим Fc-домен, посредством Fv-фрагмента тяжелой цепи, образующего CD3-связывающий домен, а другой одновалентный scFv сцеплен с другим полипептидом, образующим Fc-домен, посредством Fv-фрагмента легкой цепи, образующего CD3-связывающий домен;

(2) домен, содержащий Fc-домен, который не обладает способностью связывать Fcγ-рецептор и который получен из аминокислот, образующих Fc-домен IgG1, IgG2a, IgG3 или IgG4, и

(3) по меньшей мере один одновалентный CD3-связывающий домен, в котором Fv-фрагменты легкой цепи и тяжелой цепи в результате ассоциации образуют такой CD3-связывающий домен, который может связываться с антигеном CD3.

scFv, одноцепочечное антитело и sc(Fv)₂

В контексте настоящего описания понятия «scFv», «одноцепочечное антитело» и «sc(Fv)₂» все относятся к фрагменту антитела в виде одной полипептидной цепи, которая содержит вариабельные области, выведенные из тяжелой и легкой цепей, но не содержит константную область. Как правило, одноцепочечное антитело содержит также полипептидный линкер между VH- и VL-доменами, позволяющий образовывать требуемую структуру, которая, вероятно, обеспечивает связывание антигена. Одноцепочечное антитело подробно описано у Pluckthun в: «The Pharmacology of Monoclonal Antibodies», т.113, под ред. Rosenberg и Moore, изд-во Springer-Verlag, New

York, 1994, сс.269-315» (см. также публикацию международного патента WO 1988/001649; US №№4946778 и 5260203). В конкретном варианте осуществления изобретения одноцепочечное антитело может быть биспецифическим и/или гуманизированным.

5 scFv представляет собой антигенсвязывающий домен, в котором VH и VL, образующие Fv, сцеплены друг с другом с помощью пептидного линкера (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85(16), 1988, сс.5879-5883). VH и VL могут удерживаться в непосредственной близости с помощью пептидного линкера.

10 sc(Fv)2 представляет собой одноцепочечное антитело, в котором четыре переменные области двух VL и двух VH сцеплены линкерами такими как пептидные линкеры, с образованием одной цепи (J Immunol. Methods 231(1-2), 1999, сс.177-189). Две VH и две VL можно выводить из различных моноклональных антител. Указанные sc(Fv)2 предпочтительно включают, например, биспецифический sc(Fv)2, который распознает два эпитопа, присутствующих в одном антигене, что описано в Journal of Immunology 152(11), 1994, сс.5368-5374. sc(Fv)2 можно получать методами, известными специалистам 15 в данной области. Например, sc(Fv)2 можно получать путем связывания scFv с помощью линкера, такого как пептидный линкер.

Согласно настоящему описанию к форме антигенсвязывающего домена, образующего sc(Fv)2, относится антитело, в котором две единицы VH и две единицы VL организованы в следующем порядке: VH, VL, VH и VL ([VH]-линкер-[VL]-линкер-[VH]-линкер-[VL]), 20 начиная с N-конца одноцепочечного полипептида. Порядок расположения двух единиц VH и двух единиц VL не ограничен указанной выше формой, и их можно организовывать в любом порядке. Пример порядка расположения в различных формах приведен ниже.

[VL]-линкер-[VH]-линкер-[VH]-линкер-[VL]
[VH]-линкер-[VL]-линкер-[VL]-линкер-[VH]
25 [VH]-линкер-[VH]-линкер-[VL]-линкер-[VL]
[VL]-линкер-[VL]-линкер-[VH]-линкер-[VH]
[VL]-линкер-[VH]-линкер-[VL]-линкер-[VH].

Молекулярная форма sc(Fv)2 подробно описана также в WO 2006/132352. Таким образом, согласно указанным описаниям специалисты в данной области могут получать 30 требуемый sc(Fv)2, предназначенный для создания полипептидных комплексов, представленных в настоящем описании.

Кроме того, полипептидные комплексы, предлагаемые в настоящем изобретении, можно конъюгировать с полимером-носителем, таким как ПЭГ, или органическим соединением, таким как противораковое средство. Альтернативно этому, 35 дополнительную последовательность сахарной цепи предпочтительно встраивают в полипептидные комплексы для того, чтобы сахарная цепь обеспечивала требуемое действие.

Линкеры, предназначенные для связывания переменных областей антитела, представляют собой произвольные пептидные линкеры, которые можно 40 интродуцировать с помощью генной инженерии, синтетические линкеры и линкеры, описанные, например, в, Protein Engineering, 9(3), 1996, сс.299-305. Однако для целей настоящего изобретения наиболее предпочтительными являются пептидные линкеры. Длина пептидных линкеров специально не ограничена, и специалисты в данной области могут выбирать ее в зависимости от поставленной задачи. Предпочтительная длина 45 составляет пять или большее количество аминокислот (при этом, верхний предел составляет (но, не ограничиваясь только указанным), как правило, вплоть до 30 аминокислот или менее, предпочтительно 20 аминокислот или менее), и наиболее предпочтительно 15 аминокислот. Когда sc(Fv)2 содержит три пептидных линкера, то

их длина может быть одинаковой или различной.

Например, указанные пептидные линкеры включают:

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,

(Ser·Gly·Gly·Gly·Gly (SEQ ID NO:8))_n,

где n обозначает целое число от 1 или выше. Специалисты в данной области могут выбирать длину или последовательности пептидных линкеров в зависимости от поставленной задачи.

Как правило, для перекрестного сшивания используют синтетические линкеры (химические перекрестносшивающие агенты), они представляют собой, например:

N-гидроксисукцинимид (NHS),

дисукцинимидилсуберат (DSS),

бис(сульфосукцинимидил)суберат (BS³),

дитиобис(сукцинимидилпропионат) (DSP),

дитиобис(сульфосукцинимидилпропионат) (DTSSP),

этиленгликольбис(сукцинимидилсукцинат) (EGS),

этиленгликольбис(сульфосукцинимидилсукцинат) (сульфо-EGS),

дисукцинимидилтартрат (DST), дисульфосукцинимидилтартрат (сульфо-DST),

бис[2-(сукцинимидоксикарбонилокси)этил]сульфон (BSOCOES) и

и бис[2-(сульфосукцинимидоксикарбонилокси)этил]сульфон (сульфо-BSOCOES).

Эти перекрестносшивающие агенты поступают в продажу.

Как правило, требуется три линкера для соединения вместе четырех переменных областей антитела. Применяемые линкеры могут быть одного типа или различных типов.

Fab, F(ab')₂ и Fab'

«Fab» состоит из одной легкой цепи и CH1-домена и переменной области из одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы Fab не может образовывать дисульфидные мостики с тяжелой цепью другой молекулы.

«F(ab')₂» или «Fab» получают обработкой иммуноглобулина (моноклональное антитело) протеазой, такой как пепсин и папаин, и они относятся к фрагменту антитела, получаемого расщеплением иммуноглобулина (моноклональное антитело) вблизи дисульфидных мостиков, присутствующих между шарнирными областями в каждой из двух H-цепей. Например, папаин расщепляет IgG перед дисульфидными мостиками, присутствующими между шарнирными областями в каждой из двух H-цепей, с образованием двух гомологичных фрагментов антитела, в которых L-цепь, содержащая VL (переменная область L-цепи), и CL (константная область L-цепи), сцеплены с фрагментом H-цепи, содержащим VH (переменный домен H-цепи) и CHγ1 (γ1-область

в константной области Н-цепи), через дисульфидный мостик в их С-концевых областях. Каждый из указанных двух гомологичных фрагментов антител обозначают как Fab'.

«F(ab')₂» состоит из двух легких цепей и двух тяжелых цепей, содержащих в константной области СН1-домен и часть СН2-доменов, в результате между двумя тяжелыми цепями образуются дисульфидные мостики. F(ab')₂, образующий полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, предпочтительно можно получать следующим образом. Полное моноклональное антитело или сходное антитело, содержащее требуемый антигенсвязывающий домен, частично расщепляют протеазой, такой как пепсин; и Fc-фрагменты удаляют путем адсорбции на колонке с белком А. Не существует ограничения касательно конкретной протеазы, если она обладает способностью избирательно расщеплять полное антитело с образованием F(ab')₂ в соответствующих для данного фермента реакционных условиях, таких как значение pH. Указанные протеазы представляют собой, например, пепсин и фицин.

Fc-домен

Fc-домен, который образует полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, предпочтительно можно получать следующим образом. Антитело, такое как моноклональное антитело, частично расщепляют протеазой, такой как пепсин. Затем образовавшийся фрагмент адсорбируют на колонке с белком А или белком G и элюируют соответственным буфером для элюции. Не существует ограничения касательно конкретной протеазы, если она обладает способностью избирательно расщеплять антитела, такие как моноклональные антитела, в соответствующих для данного фермента реакционных условиях, таких как значение pH. Указанные протеазы представляют собой, например, пепсин и фицин.

Полипептидные комплексы, представленные в настоящем описании, содержат Fc-домен с пониженной способностью связывать Fcγ-рецептор, которые включают аминокислоты, образующие Fc-домен IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

Изотип антитела определяют на основе структуры константной области. Константные области изотипов IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 обозначают как Cγ1, Cγ2, Cγ3 и Cγ4 соответственно. Аминокислотные последовательности Fc-домена полипептидов, которые образуют человеческие Cγ1, Cγ2, Cγ3 и Cγ4, в качестве примера представлены в SEQ ID NO:23, 24, 25 и 26 соответственно. Взаимосвязь между аминокислотными остатками, образующими каждую аминокислотную последовательность и EU-нумерацией Кэбота (обозначена в контексте настоящего описания как EU-индекс), представлена на фиг.18.

Понятие «Fc-домен» относится к области вне F(ab')₂, которая содержит две легкие цепи и две тяжелые цепи, содержащие часть константной области, которая включает СН1-домен и область между СН1- и СН2-доменами, что позволяет образовываться дисульфидным мостикам между двумя тяжелыми цепями. Fc-домен, образующий полипептидный комплекс, представленный в настоящем описании, предпочтительно можно получать следующим образом. Моноклональное антитело в виде IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 или сходное антитело частично расщепляют протеазой, такой как пепсин, с последующей элюцией фракции, адсорбированной на колонке с белком А. Не существует ограничения касательно конкретной протеазы, если она обладает способностью избирательно расщеплять полное антитело с образованием F(ab')₂ в соответствующих для данного фермента реакционных условиях, таких как значение pH. Указанные протеазы представляют собой, например, пепсин и фицин.

Fcγ-рецептор

Понятие «Fcγ-рецептор» относится к рецептору, обладающему способностью связываться с Fc-доменом моноклональных антител в виде IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4,

и оно включает всех представителей, принадлежащих к семейству белков, которые кодируются главным образом геном Fcγ-рецептора. У человека семейство включает FcγRI (CD64), включая изоформы FcγRIa, FcγRIb и FcγRIc; FcγRII (CD32), включая изоформы FcγRIIa (в том числе аллотип H131 и R131), FcγRIIb (включая FcγRIIb-1 и FcγRIIb-2) и FcγRIIc; и FcγRIII (CD16), включая изоформу FcγRIIIa (в том числе аллотипы V158 и F158), и FcγRIIIb (в том числе аллотипы FcγRIIIb-NA1 и FcγRIIIb-NA2); а также все неидентифицированные человеческие FcγR, изоформы FcγR и их аллотипы. Однако Fcγ-рецептор не ограничен указанными примерами. FcγR включает (но не ограничиваясь только ими) FcγR, выведенные из антител человека, мышей, крыс, кроликов и обезьян.

FcγR можно выводить из любого организма. Мышиный FcγR включает (но, не ограничиваясь только ими) FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), FcγRIII (CD16) и FcγRIII-2 (CD16-2), а также все неидентифицированные мышиные FcγR, изоформы FcγR и их аллотипы. Указанные предпочтительные Fcγ-рецепторы включают, например, человеческие FcγI (CD64), FcγIIA (CD32), FcγIIB (CD32), FcγIIIA (CD16) и/или FcγIIIB (CD16). Полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность FcγI представлены в SEQ ID NO:13 (NM_000566.3) и 14 (NP_000557.1) соответственно; полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность FcγIIA представлены в SEQ ID NO:15 (BC020823.1) и 16 (AAH20823.1) соответственно; полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность FcγIIB представлены в SEQ ID NO:17 (BC146678.1) и 18 (AAI46679.1) соответственно; полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность FcγIIIA представлены в SEQ ID NO:19 (BC033678.1) и 20 (AAH33678.1) соответственно и полинуклеотидная последовательность и аминокислотная последовательность FcγIIIB представлены в SEQ ID NO:21 (BC128562.1) и 22 (AAI28563.1) соответственно (в скобках указан регистрационный номер каждой последовательности в базе данных RefSeq).

Обладает ли Fcγ-рецептор способностью связываться с Fc-доменом моноклонального антитела IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, можно оценивать с помощью ALPHA Screen®-анализа (гомогенный анализ усиленной за счет эффекта близости люминесценции (Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay)), BIACORE-метода на основе резонанса поверхностного плазмона (SPR) и др. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(11), 2006, сс.4005-4010), помимо описанных выше форматов FACS и ELISA.

При этом понятие «Fc-лиганд» или «эффекторный лиганд» относится к молекуле и предпочтительно полипептиду, который связывается с Fc-доменом антитела, образуя комплекс Fc/Fc-лиганд. Молекулу можно получать из любого организма. Связывание Fc-лиганда с Fc предпочтительно индуцирует одну или несколько эффекторных функций. Указанные лиганды включают (но, не ограничиваясь только ими) Fc-рецепторы, FcγR, FcαR, FcεR, FcRn, C1q и C3, маннансвязывающий лектин, маннозный рецептор, белок A Staphylococcus, белок G Staphylococcus и вирусные FcγR. Fc-лиганды включают также гомологи Fc-рецептора (FcRH) (Davis и др., Immunological Reviews 190, 2002, сс.123-136), которые представляют собой семейство Fc-рецепторов, гомологичных FcγR. К Fc-лигандам относятся также неидентифицированные молекулы, которые связываются с Fc.

Активность связывания с Fcγ-рецептором

Нарушение активности связывания Fc-домена с любым из Fcγ-рецепторов FcγI, FcγIIA, FcγIIB, FcγIIIA и/или FcγIIIB можно оценивать, используя описанные выше форматы FACS и ELISA, а также ALPHA Screen-анализ (гомогенный анализ усиленной за счет эффекта близости люминесценции, BIACORE-метод на основе резонанса поверхностного плазмона (SPR) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(11), 2006, сс.4005-4010).

ALPHA Screen-анализ осуществляют на основе технологии ALPHA, которая основана на описанном ниже принципе, с использованием двух типов гранул. Люминесцентный сигнал становится обнаруживаемым только тогда, когда происходит биологическое взаимодействие молекул, связанных с гранулами-донорами, с молекулами, связанными с гранулами-акцепторами, и когда обе гранулы находятся в непосредственной близости друг от друга. Возбужденный лазерным пучком фотосенсибилизатор в гранулах-донорах превращает кислород в возбужденный синглетный кислород. Когда синглетный кислород диффундирует из гранул-доноров и достигает гранул-акцепторов, локализованных в непосредственной близости, то индуцируется хемилюминесцентная реакция в гранулах-акцепторах. В итоге эта реакция приводит к испусканию света. Если молекулы, связанные с гранулами-донорами, не взаимодействуют с гранулами-акцепторами, то синглетный кислород, который продуцируется гранулами-донорами, не достигает гранул-акцепторов и хемилюминесцентная реакция не происходит.

Например, меченный биотином полипептидный комплекс иммобилизуют на гранулах-донорах, а меченный глутатион-S-трансферазой (GST) Fc γ -рецептор иммобилизуют на гранулах-акцепторах. В отсутствие полипептидного комплекса, содержащего конкурирующий мутантный Fc-домен, Fc γ -рецептор взаимодействует с полипептидным комплексом, содержащим Fc-домен дикого типа, индуцируя в результате сигнал с длиной волны от 520 до 620 нм. Полипептидный комплекс, содержащий немеченый мутантный Fc-домен, конкурирует с полипептидным комплексом, содержащим Fc-домен дикого типа, за взаимодействие с Fc γ -рецептором. Относительную аффинность связывания можно оценивать, определяя количественно снижение флуоресценции в результате конкуренции. Методы биотинилирования полипептидных комплексов, таких как антитела, с помощью сульфо-NHS-биотина или подобных агентов являются известными. Приемлемые методы введения GST-метки в Fc γ -рецептор включают методы, которые предусматривают слияние полипептидов, кодирующих Fc γ и GST, в рамке считывания, экспрессию литого гена с использованием клеток, в которые интродуцирован вектор, несущий ген, и последующую очистку с помощью содержащей глутатион колонки. Индуцированный сигнал предпочтительно можно анализировать, например, посредством подгонки к односайтовой модели конкуренции на основе нелинейного регрессионного анализа с использованием такой программы, как GRAPHPAD PRISM (фирма GraphPad; Сан-Диего).

Одну из субстанций, предназначенных для исследования их взаимодействия, иммобилизуют в качестве лиганда на тонком слое золота сенсорного чипа. Когда свет проникает на заднюю поверхность сенсорного чипа так, что имеет место полное отражение на границе раздела между тонким слоем золота и стеклом, то интенсивность отраженного света в определенном сайте частично снижается (SPR-сигнал). Другую субстанцию, предназначенную для исследования ее взаимодействия, инъецируют в качестве анализируемого вещества на поверхность сенсорного чипа. Когда анализируемое вещество связывается с лигандом, то масса иммобилизованной молекулы-лиганда возрастает. Это изменяет показатель преломления растворителя на поверхности сенсорного чипа. Изменение показателя преломления вызывает положительный сдвиг SPR-сигнала (и наоборот, диссоциация сдвигает сигнал назад в исходное положение). В Biacore-системе уровень описанного выше сдвига (т.е. изменение массы на поверхности сенсорного чипа) откладывают по вертикальной оси, и таким образом в качестве количественных данных получают график изменения массы в зависимости от времени (сенсограмма). Кинетические параметры (константа скорости ассоциации (k_a) и константа скорости диссоциации (k_d)) определяют из представленных в виде кривых

сенсограмм, и определяют аффинность (KD) как соотношение указанных двух констант. BIACORE-методы предпочтительно применяют для анализа ингибирования. Примеры такого анализа ингибирования описаны в Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103(11), 2006, сс.4005-4010.

5 В контексте настоящего описания «пониженная активность связывания с Fcγ-рецептором» означает, например, что при использовании описанного выше метода анализа конкурентная активность тестируемого полипептидного комплекса составляет 50% или менее, предпочтительно 45% или менее, 40% или менее, 35% или менее, 30% или менее, 20% или менее или 15% или менее и наиболее предпочтительно 10% или
10 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% менее, по сравнению с конкурентной активностью контрольного полипептидного комплекса.

Полипептидные комплексы, содержащие Fc-домен моноклонального антитела в виде IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, можно использовать соответственно в качестве
15 контрольных полипептидных комплексов. Структуры Fc-домена представлены в SEQ ID NO:23 (A добавлен к N-концу последовательности, представленной в RefSeq под регистрационным номером AAC82527.1), SEQ ID NO:24 (A добавлен к N-концу последовательности, представленной в RefSeq под регистрационным номером AAB59393.1), SEQ ID NO:25 (A добавлен к N-концу последовательности, представленной
20 в RefSeq под регистрационным номером CAA27268.1) и SEQ ID NO:26 (A добавлен к N-концу последовательности, представленной в RefSeq под регистрационным номером AAB59394.1). Кроме того, когда полипептидный комплекс, содержащий мутантный Fc-домен антитела конкретного изотипа, используют в качестве тестируемой субстанции, то воздействие мутации мутанта на активность связывания с Fcγ-рецептором оценивают
25 с использованием в качестве контроля полипептидного комплекса, содержащего Fc-домен такого же изотипа. Как описано выше, соответственно получают полипептидные комплексы, содержащие мутантный Fc-домен с действительно пониженной активностью связывания с Fcγ-рецептором.

Такие известные мутанты включают, например, мутанты с делецией аминокислот
30 231A-238S (EU-нумерация) (WO 2009/011941), а также мутанты C226S, C229S, P238S, (C220S) (J. Rheumatol 34, 2007, с.11); C226S и C229S (Hum. Antibod. Hybridomas 1(1), 1990, сс.47-54); C226S, C229S, E233P, L234V, и L235A (Blood 109, 2007, сс.1185-1192).

Предпочтительными полипептидными комплексами являются комплексы, которые содержат Fc-домен с заменой аминокислоты в положении 220, 226, 229, 231, 232, 233,
35 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 264, 265, 266, 267, 269, 270, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 325, 327, 328, 329, 330, 331 или 332 (EU-нумерация) в аминокислотах, образующих Fc-домен антитела конкретного изотипа. Изобретение не ограничено изотипом антитела, из которого получают Fc-домен, и можно использовать соответствующий Fc-домен, выведенный из моноклонального антитела в виде IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4.

40 Предпочтительно следует применять Fc-домен, выведенный из антител в виде IgG1.

Предпочтительными полипептидными комплексами являются, например, комплексы, которые содержат Fc-домен, содержащий одну из указанных ниже замен, положение которой определяется согласно EU-нумерации (каждый номер обозначает положение аминокислотного остатка согласно EU-нумерации; и однобуквенный символ
45 аминокислоты, который находится перед номером, обозначает аминокислотный остаток до его замены, а однобуквенный символ аминокислоты, расположенный за номером, обозначает аминокислотный остаток после замены), аминокислот, образующих Fc-домен антитела в виде IgG1:

- (a) L234F, L235E, P331S;
- (б) C226S, C229S, P238S;
- (в) C226S, C229S или
- (г) C226S, C229S, E233P, L234V, L235A;

5 а также комплексы, которые содержат Fc-домен с делецией аминокислот в положениях 231-238.

Кроме того, предпочтительными полипептидными комплексами являются также комплексы, которые содержат Fc-домен, содержащий одну из указанных ниже замен, положение которой определяют согласно EU-нумерации, аминокислот, образующих

10 Fc-домен антитела в виде IgG2:

- (д) H268Q, V309L, A330S и P331S;
- (е) V234A;
- (ж) G237A;
- (з) V234A и G237A;

15 (и) A235E и G237A или

(к) V234A, A235E и G237A. Каждый номер обозначает положение аминокислотного остатка согласно EU-нумерации; и однобуквенный символ аминокислоты, который находится перед номером, обозначает аминокислотный остаток до его замены, а однобуквенный символ аминокислоты, расположенный за номером, обозначает

20 аминокислотный остаток после замены.

Кроме того, предпочтительными полипептидными комплексами являются также комплексы, которые содержат Fc-домен, содержащий одну из указанных ниже замен, положение которой определяют согласно EU-нумерации, аминокислот, образующих Fc-домен антитела в виде IgG3:

25 (л) F241A;

(м) D265A или

(н) V264A. Каждый номер обозначает положение аминокислотного остатка согласно EU-нумерации; и однобуквенный символ аминокислоты, который находится перед номером, обозначает аминокислотный остаток до его замены, а однобуквенный символ

30 аминокислоты, расположенный за номером, обозначает аминокислотный остаток после замены.

Кроме того, предпочтительными полипептидными комплексами являются также комплексы, которые содержат Fc-домен, содержащий одну из указанных ниже замен, положение которой определяют согласно EU-нумерации, аминокислот, образующих

35 Fc-домен антитела в виде IgG4:

(о) L235A, G237A и E318A;

(п) L235E или

(р) F234A и L235A. Каждый номер обозначает положение аминокислотного остатка согласно EU-нумерации; и однобуквенный символ аминокислоты, который находится перед номером, обозначает аминокислотный остаток до его замены, а однобуквенный символ аминокислоты, расположенный за номером, обозначает аминокислотный остаток после замены.

45 Другие предпочтительные полипептидные комплексы представляют собой комплексы, содержащие Fc-домен, в котором любая аминокислота в положении 233, 234, 235, 236, 237, 327, 330 или 331 (EU-нумерация) в аминокислотах, образующих Fc-домен антитела в виде IgG1, заменена на аминокислоту, которая находится в соответствующем положении согласно EU-нумерации, в соответствующем IgG2 или IgG4.

Предпочтительные полипептидные комплексы представляют собой также комплексы,

содержащие Fc-домен, в котором одна или несколько аминокислот в положениях 234, 235 и 297 (EU-нумерация) в аминокислотах, образующих Fc-домен антитела в виде IgG1, заменена(ы) на другие аминокислоты. Изобретение не ограничено типом аминокислоты после замены; однако наиболее предпочтительными являются полипептидные комплексы, содержащие Fc-домен, в котором одна или несколько аминокислот в положениях 234, 235 и 297 заменена(ы) на аланин.

Предпочтительные полипептидные комплексы представляют собой также комплексы, содержащие Fc-домен, в котором аминокислота в положении 265 (EU-нумерация) в аминокислотах, образующих Fc-домен антитела в виде IgG1, замена другой аминокислотой. Изобретение не ограничено типом аминокислоты после замены; однако наиболее предпочтительными являются полипептидные комплексы, содержащие Fc-домен, в котором аминокислота в положении 265 заменена на аланин.

Fc-домен, выведенный из биспецифического антитела

Согласно настоящему описанию соответствующие Fc-домены, выведенные из биспецифического антитела, можно применять также в качестве Fc-домена с пониженной активностью связывания Fc γ -рецептора. Биспецифическое антитело представляет собой антитело, которое имеет две различные специфичности. Биспецифическое антитело IgG-типа можно секретировать из гибридной гибридомы (квадромы), полученной путем слияния двух типов гибридом, продуцирующих антитело в виде IgG (Milstein C. и др., Nature 305, 1983, сс.537-540).

Альтернативно этому, биспецифическое антитело IgG-типа можно секретировать также посредством интродукции в клетки в целом четырех генов, т.е. генов L-цепей и H-цепей, образующих представляющие интерес IgG двух типов, и их коэкспрессии. Однако теоретически существует десять комбинаций H-цепей и L-цепей IgG, которые можно получать такими методами. Трудно очищать IgG, состоящий из требуемой комбинации H-цепей и L-цепей из десяти типов IgG. Кроме того, теоретическое количество секретируемого IgG с требуемой комбинацией, также в значительной степени снижено, поэтому требуется осуществлять крупномасштабное культивирование. Это дополнительно увеличивает стоимость производства.

В таком случае соответствующую аминокислотную замену можно интродуцировать в СНЗ-домен, образующей Fc-домен H-цепи, для того, чтобы предпочтительно секретировать IgG с гетерологичной комбинацией H-цепей. В частности, этот метод можно осуществлять путем замены аминокислоты, которая имеет более крупную боковую цепь (выступ (что означает «выпуклость»)), на аминокислоту в СНЗ-доме одной из H-цепей, и замены аминокислоты, которая имеет менее крупную боковую цепи (впадина (что означает «пустота»)), на аминокислоту в СНЗ-доме другой H-цепи так, что выступ помещается во впадину. Это способствует образованию гетеромерной H-цепи и одновременно ингибирует образование гомомерной H-цепи (WO 1996/027011; Ridgway J.B. и др., Protein Engineering 9, 1996, сс.617-621; Merchant A.M. и др., Nature Biotechnology 16, 1998, сс.677-681).

С другой стороны, касательно L-цепи, вариабельная область L-цепи является менее полиморфной, чем вариабельная область H-цепи, и следовательно можно ожидать получения общей L-цепи, которая может обладать способностью связываться с обоими H-цепями. Для достижения эффективной экспрессии биспецифического IgG можно применять интродукцию генов такой общей L-цепи и двух H-цепей в клетки, которые экспрессируют IgG (Nature Biotechnology 16, 1998, сс.677-681). Однако эту идею трудно реализовать, поскольку вероятность получения путем случайного отбора двух типов антител, содержащих одинаковую L-цепь, является низкой. Таким образом, предложен

метод селекции общей L-цепи, для которой характерна выраженная способностью к связыванию с любыми различными H-цепями (WO 2004/065611).

Кроме того, существуют также известные методики получения биспецифического антитела путем применения методов контроля полипептидной ассоциации или ассоциации образованных из полипептидов гетеромерных мультимеров к ассоциации между двумя полипептидами, которые образуют Fc-домен. В частности, методы контроля полипептидной ассоциации можно применять для получения биспецифического антитела (WO 2006/106905), в котором аминокислотные остатки, образующие поверхность раздела между двумя полипептидами, которые образуют Fc-домен, изменены для ингибирования ассоциации между Fc-доменами, имеющими одинаковую последовательность, и обеспечения образования полипептидных комплексов, образованных двумя Fc-доменами, имеющими различные последовательности.

Два указанных выше полипептида, которые образуют Fc-домен, выведенный из биспецифического антитела, можно соответственно применять в качестве домена, включающего в себя Fc-домен, предлагаемый в настоящем изобретении. Более конкретно, указанные два предпочтительных полипептида, которые образуют Fc-домен, включают полипептиды, в которых аминокислоты в положениях 349 и 366 (EU-нумерация) в аминокислотной последовательности одного полипептида представляют собой цистеин и триптофан соответственно, а аминокислоты в положениях 356, 366, 368 и 407 (EU-нумерация) в аминокислотной последовательности другого полипептида представляют собой цистеин, серин, аланин и валин соответственно.

В другом варианте осуществления изобретения предпочтительные домены, включающие в себя Fc-домен, предлагаемый в настоящем изобретении, включают два полипептида, которые образуют Fc-домен, в котором аминокислота в положении 409 (EU-нумерация) в аминокислотной последовательности одного полипептида представляет собой аспарагиновую кислоту, а аминокислота в положении 399 (EU-нумерация) в аминокислотной последовательности другого полипептида представляет собой лизин. Согласно указанному выше варианту осуществления изобретения аминокислота в положении 409 может представлять собой глутаминовую кислоту вместо аспарагиновой кислоты, а аминокислота в положении 399 может представлять собой аргинин вместо лизина. Кроме того, аспарагиновую кислоту в положении 360 или 392 предпочтительно можно также применять в сочетании с лизином в положении 399.

В другом варианте осуществления изобретения предпочтительные домены, включающие в себя Fc-домен, предлагаемый в настоящем изобретении, включают два полипептида, которые образуют Fc-домен, в котором аминокислота в положении 370 (EU-нумерация) в аминокислотной последовательности одного полипептида представляет собой глутаминовую кислоту, а аминокислота в положении 357 (EU-нумерация) в аминокислотной последовательности другого полипептида представляет собой лизин.

В следующем варианте осуществления изобретения предпочтительные домены, включающие в себя Fc-домен, предлагаемый в настоящем изобретении, включают два полипептида, которые образуют Fc-домен, в котором аминокислота в положении 439 (EU-нумерация) в аминокислотной последовательности одного полипептида представляет собой глутаминовую кислоту, а аминокислота в положении 356 (EU-нумерация) в аминокислотной последовательности другого полипептида представляет собой лизин.

Кроме того, предпочтительные домены, включающие в себя Fc-домен, предлагаемый

в настоящем изобретении, включают варианты с их комбинацией:

два полипептида образуют Fc-домен, в котором аминокислоты в положениях 409 и 370 (EU-нумерация) в аминокислотной последовательности одного полипептида представляют собой аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту соответственно, а аминокислоты в положениях 399 и 357 (EU-нумерация) в аминокислотной последовательности другого полипептида обе представляют собой лизин (в этом варианте осуществления изобретения глутаминовую кислоту в положении 370 можно заменять на аспарагиновую кислоту, и глутаминовую кислоту в положении 370 можно заменять на аспарагиновую кислоту в положении 392);

два полипептида образуют Fc-домен, в котором аминокислоты в положениях 409 и 439 (EU-нумерация) в аминокислотной последовательности одного полипептида представляют собой аспарагиновую кислоту и глутаминовую кислоту соответственно, а аминокислоты в положениях 399 и 356 (EU-нумерация) в аминокислотной последовательности другого полипептида обе представляют собой лизин (в этом варианте осуществления изобретения глутаминовую кислоту в положении 439 можно заменять на аспарагиновую кислоту в положении 360, 392 или 439);

два полипептида образуют Fc-домен, в котором аминокислоты в положениях 370 и 439 (EU-нумерация) в аминокислотной последовательности одного полипептида обе представляют собой глутаминовую кислоту, а аминокислоты в положениях 357 и 356 (EU-нумерация) в аминокислотной последовательности другого полипептида обе представляют собой лизин; и

два полипептида образуют Fc-домен, в котором аминокислоты в положениях 409, 370 и 439 (EU-нумерация) в аминокислотной последовательности одного полипептида представляют собой аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту и глутаминовую кислоту соответственно, а аминокислоты в положениях 399, 357 и 356 (EU-нумерация) в аминокислотной последовательности другого полипептида все представляют собой лизин (в этом варианте осуществления изобретения аминокислоту в положении 370 нельзя заменять на глутаминовую кислоту; альтернативно этому, вместо замены аминокислоты в положении 370 на глутаминовую кислоту глутаминовую кислоту в положении 439 можно заменять на аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту в положении 439 можно заменять на аспарагиновую кислоту в положении 392).

В следующем варианте осуществления изобретения предпочтительные домены, включающие в себя Fc-домен, предлагаемый в настоящем изобретении, включают два полипептида, которые образуют Fc-домен, в котором аминокислота в положении 356 (EU-нумерация) в аминокислотной последовательности одного полипептида представляет собой лизин, а аминокислоты в положениях 435 и 439 (EU-нумерация) в аминокислотной последовательности другого полипептида представляет собой аргинин и глутаминовую кислоту соответственно.

Когда два указанных выше полипептида, которые образуют Fc-домен, выведенный из биспецифического антитела, применяют в качестве домена, включающего в себя Fc-домен, предлагаемый в настоящем изобретении, то антигенсвязывающие домены и/или CD3-связывающие домены, предлагаемые в настоящем изобретении, можно располагать в требуемой комбинации.

Fc-домен с пониженной С-концевой гетерогенностью

Согласно настоящему описанию Fc-домены, отличающиеся улучшенной С-концевой гетерогенностью в дополнение к указанным выше характеристикам, можно применять в качестве Fc-доменов с пониженной активностью связывания Fcγ-рецептора. Более конкретно, в настоящем изобретении предложены Fc-домены, в которых глицин и лизин

в положениях 446 и 447 (EU-нумерация) соответственно в аминокислотных последовательностях двух полипептидов, образующих Fc-домен, который выведен из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, удаляют путем делеции.

Домен, связывающий комплекс Т-клеточного рецептора

5 В контексте настоящего описания «домен, связывающий комплекс Т-клеточного рецептора» относится участку антитела к комплексу Т-клеточного рецептора, который содержит область, которая специфически связывается и является комплементарной
10 всему комплексу Т-клеточного рецептора или его части. Указанный комплекс Т-клеточного рецептора может представлять собой сам Т-клеточный рецептор или молекулу-адаптер, которая в сочетании с Т-клеточным рецептором образует комплекс Т-клеточного рецептора. Предпочтительным адаптером является CD3.

Домен, связывающий Т-клеточный рецептор

В контексте настоящего описания «домен, связывающий Т-клеточный рецептор» относится участку антитела к Т-клеточному рецептору, который содержит область,
15 которая специфически связывается и является комплементарной всему Т-клеточному рецептору или его части.

Можно применять вариабельную область или константную область Т-клеточного рецептора. Однако предпочтительными эпитопами, с которыми связывается CD3-связывающий домен, являются эпитопы, локализованные в константной области.

20 Последовательности константной области включают, например, последовательности α-цепи Т-клеточного рецептора (RefSeq, регистрационный номер CAA26636.1; SEQ ID NO:67), β-цепи Т-клеточного рецептора (RefSeq, регистрационный номер accession number C25777; SEQ ID NO:68), γ1-цепи Т-клеточного рецептора (RefSeq, регистрационный номер A26659; SEQ ID NO:69), γ2-цепи Т-клеточного рецептора (RefSeq, регистрационный
25 номер AAB63312.1; SEQ ID NO:70) и δ-цепи Т-клеточного рецептора (RefSeq, регистрационный номер AAA61033.1; SEQ ID NO:71).

CD3-связывающий домен

В контексте настоящего описания «CD3-связывающий домен» относится к участку антитела к CD3, содержащему область, которая специфически связывается и является
30 комплементарной всему CD3 или его части. CD3-связывающий домен можно выводить из одного или нескольких вариабельных доменов антитела. Предпочтительно CD3-связывающий домен включает как вариабельную область легкой цепи (VL) антитела к CD3, так и вариабельную область тяжелой цепи (VH) антитела к CD3. Указанные предпочтительные CD3-связывающие домены включают, например, «одноцепочечный
35 Fv (scFv)», «одноцепочечное антитело», «Fv», «одноцепочечный Fv2 (scFv2)», «Fab» и «F(ab')2».

CD3-связывающий домен, предлагаемый в настоящем изобретении, может связываться с любым эпитопом, если эпитоп локализован внутри γ-цепи, δ-цепи или ε-цепи последовательности, образующей человеческий CD3. Согласно настоящему изобретению
40 предпочтительные CD3-связывающие домены включают домены, которые содержат вариабельную область легкой цепи (VL) антитела к CD3 и вариабельную область тяжелой цепи (VH) антитела к CD3, которые связываются с эпитопом, который находится во внеклеточном домене ε-цепи человеческого комплекса CD3. Указанные предпочтительные CD3-связывающие домены включают домены, которые содержат
45 вариабельную область легкой цепи (VL) антитела к CD3 и вариабельную область тяжелой цепи (VH) антитела OKT3 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1980, сс.4914-4917) или различных известных антител к CD3. Кроме того, указанные приемлемые CD3-связывающие домены включают домены, выведенные из антитела к CD3 с требуемыми

характеристиками, которые получают путем иммунизации требуемого животного γ -цепью, δ -цепью или ϵ -цепью, образующей человеческий CD3, с использованием описанных выше методов. Приемлемыми антителами к CD3, из которых выводят CD3-связывающий домен, являются человеческие антитела и антитела, гуманизированные соответствующим описанным выше методом. Структуры γ -цепи, δ -цепи и ϵ -цепи, которые образуют CD3, представлены в виде полинуклеотидных последовательностей SEQ ID NO:27 (NM_000073.2), SEQ ID NO:29 (NM_000732.4) и SEQ ID NO:31 (NM_000733.3) соответственно и в виде полипептидных последовательностей SEQ ID NO:28 (NP_000064.1), SEQ ID NO:30 (NP_000723.1) и SEQ ID NO:32 (NP_000724.1) соответственно (в скобках представлены регистрационные номера RefSeq).

Полипептидный комплекс

На структуру полипептидного комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, не накладываются ограничения, если он содержит

(1) антигенсвязывающий домен;

(2) домен, содержащий Fc-домен с пониженной активностью связывания с Fc γ -рецептором; и

(3) домен, связывающий комплекс Т-клеточного рецептора, указанный выше.

Согласно настоящему изобретению предпочтительным доменом, связывающим комплекс Т-клеточного рецептора, является домен, связывающий Т-клеточный рецептор, или CD3-связывающий домен. Каждый из описанных выше доменов может быть сцеплен непосредственно через пептидную связь. Например, (1) F(ab')₂ применяют в качестве антигенсвязывающего домена и (2) Fc-домен с пониженной активностью связывания Fc γ -рецептора применяют в качестве домена, который содержит Fc-домен с пониженной активностью связывания с Fc γ -рецептором. В этом случае, когда антигенсвязывающий домен (1) соединяют через пептидную связь с доменом, который содержит Fc-домен (2), то сцепленный полипептид образует структуру антитела. Указанное антитело можно получать путем очистки культуральных сред описанных выше гибридом или очистки культуральных сред требуемых клеток-хозяев, стабильно несущих полинуклеотид, который кодирует образующий антитело полипептид.

Когда CD3-связывающий домен (3) соединяют со структурой антитела, то CD3-связывающий домен можно соединять через пептидную связь с С-концом константной области структуры антитела. В другом варианте осуществления изобретения CD3-связывающий домен соединяют через пептидную связь с N-концом вариательной области тяжелой цепи или вариательной области легкой цепи структуры антитела. В другом варианте осуществления изобретения CD3-связывающий домен можно соединять через пептидную связь с С-концом константной области легкой цепи структуры антитела. Подлежащий соединению CD3-связывающий домен может иметь любую требуемую структуру; однако указанный приемлемый CD3-связывающий домен включает предпочтительно Fv и более предпочтительно scFv. На валентность CD3-связывающего домена, который связывается со структурой антитела, ограничения не накладываются. Для соединения двухвалентного CD3-связывающего домена со структурой антитела одновалентный CD3-связывающий домен можно соединять через пептидную связь с соответствующими С-концами двух Fc-доменов, образующих константную область структуры антитела. Альтернативно этому, для соединения двухвалентного CD3-связывающего домена со структурой антитела двухвалентный scFv (т.е. sc(Fv)₂) можно соединять через пептидную связь с С-концом одного из двух Fc-доменов. В этом случае можно успешно получать полипептидный комплекс, в котором двухвалентный scFv (т.е. sc(Fv)₂) связан с С-концом только одного из двух Fc-доменов, образующих

константную область структуры антитела, с использованием указанного выше Fc-домена, выведенного из биспецифического антитела. Альтернативно этому, для соединения одновалентного CD3-связывающего домена со структурой антитела одновалентный scFv можно соединять через пептидную связь с С-концом одного из

5 двух Fc-доменов. В этом случае можно успешно получать полипептидный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, в котором одновалентный scFv сцеплен с С-концом только одного из двух Fc-доменов, образующих константную область структуры антитела, используя указанный выше Fc-домен, выведенный из биспецифического антитела.

10 Кроме того, когда CD3-связывающий домен (3) соединяют через пептидную связь с С-концом константной области структуры антитела, то приемлемые полипептидные комплексы включают комплексы, в которых Fv тяжелой цепи, образующий CD3-связывающий домен, соединяют с С-концом одной константной области (CH3-домен), образующей Fc-домен, и Fv-фрагмент легкой цепи, образующий CD3-связывающий

15 домен, соединяют с С-концом другой константной области (CH3-домен), образующей Fc-домен. В этом случае для соединения Fv-фрагмента тяжелой цепи или легкой цепи с С-концом константной области (CH3-домен) встраивают приемлемый линкер, такой как Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:7). Количество повторов в линкере не имеет решающего значения; однако их можно выбирать из 1-10, предпочтительно 2-8 или

20 более предпочтительно 2-6. В частности, можно встраивать приемлемый линкер, в котором количество повторов [Gly-Gly-Gly-Gly-Ser] (SEQ ID NO:7) составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

Альтернативно этому, когда получают полипептидный комплекс, в котором Fv-фрагмент тяжелой цепи, образующий CD3-связывающий домен, соединен с С-концом

25 одной константной области (CH3-домен), образующей Fc-домен, и Fv-фрагмент легкой цепи CD3-связывающего домена соединен с С-концом другой константной области (CH3-домен), образующей Fc-домен, то для повышения ассоциации между Fv-фрагментом тяжелой цепи и Fv-фрагментом легкой цепи можно осуществлять соответствующие изменения аминокислотных остатков, которые позволяют

30 образовывать дисульфидные мостики между Fv-фрагментом тяжелой цепи и Fv-фрагментом легкой цепи.

В другом варианте осуществления изобретения, когда получают полипептидный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, в котором Fv-фрагмент тяжелой цепи, образующий CD3-связывающий домен, соединен с С-концом одной константной

35 области (CH3-домен), образующей Fc-домен, а Fv-фрагмент легкой цепи, образующий CD3-связывающий домен, соединен С-концом другой константной области (CH3-домен), образующей Fc-домен, то для повышения ассоциации между Fv-фрагментом тяжелой цепи и Fv-фрагментом легкой цепи CH1- и CL-домены можно соединять и с Fv-фрагментом тяжелой цепи и с Fv-фрагментом легкой цепи.

40 Согласно еще одному варианту осуществления изобретения для того, чтобы соединять двухвалентный CD3-связывающий домен со структурой антитела, одновалентный CD3-связывающий домен можно соединять через пептидную связь с соответствующими С-концами двух константных областей легких цепей или соответствующими N-концами

45 варьируемых областей легких цепей структуры антитела. Альтернативно этому, для того, чтобы соединять двухвалентный CD3-связывающий домен со структурой антитела, двухвалентный scFv (т.е. sc(Fv)₂) можно соединять через пептидную связь с соответствующими С-концами двух константных областей легких цепей или соответствующими N-концами варьируемых областей легких цепей структуры антитела.

В этом случае, используя описанный выше Fc-домен, выведенный из биспецифического антитела, можно эффективно получать полипептидные комплексы, в которых двухвалентный scFv (т.е. sc(Fv)2) связан с C- или N-концом одной из двух переменных областей легких цепей структуры антитела. Альтернативно этому, для того, чтобы

5 соединять одновалентный CD3-связывающий домен со структурой антитела, одновалентный scFv можно соединять через пептидную связь с C- или N-концом одной из двух переменных областей легких цепей. В этом случае, используя описанный выше Fc-домен, выведенный из биспецифического антитела, можно эффективно получать полипептидные комплексы, в которых одновалентный scFv связан с N-или C-концом

10 одной переменной области легкой цепи из двух переменных областей легких цепей структуры антитела.

В другом варианте осуществления изобретения для того, чтобы соединять двухвалентный CD3-связывающий домен со структурой антитела, одновалентный CD3-связывающий домен можно соединять через пептидную связь с соответствующими N-

15 концами двух переменных областей тяжелых цепей структуры антитела.

Альтернативно этому, для того, чтобы соединять двухвалентный CD3-связывающий домен со структурой антитела, двухвалентный scFv (т.е. sc(Fv)2) можно соединять через пептидную связь с N-концом одной из двух переменных областей тяжелых цепей. В этом случае, используя описанный выше Fc-домен, выведенный из биспецифического

20 антитела, можно эффективно получать полипептидные комплексы, в которых двухвалентный scFv (т.е. sc(Fv)2) связан с N-концом только одной из двух переменных областей тяжелых цепей структуры антитела. Альтернативно этому, для того, чтобы соединять одновалентный CD3-связывающий домен со структурой антитела, одновалентный scFv можно соединять через пептидную связь с N-концом одной из двух

25 переменных областей тяжелых цепей. В этом случае, используя описанный выше Fc-домен, выведенный из биспецифического антитела, можно эффективно получать полипептидные комплексы, в которых одновалентный scFv связан с N-концом одной из двух переменных областей тяжелых цепей структуры антитела.

Кроме того, описанный выше полипептидный комплекс можно получать путем

30 соединения каждого домена непосредственно через пептидную связь или посредством пептидного связывания через пептидный линкер. В этом случае в качестве линкера, который следует применять, можно использовать, например, описанный выше линкер и соответствующие линкеры с пептидной меткой, например, с His-меткой, HA-меткой или FLAG-меткой. Кроме того, предпочтительно можно использовать способность к

35 взаимному связыванию на основе водородной связи, дисульфидной связи, ковалентной связи или ионного взаимодействия, или их комбинации. Например, можно использовать аффинность между CH1 и CL антитела или можно применять описанные выше Fc-домены, выведенные из биспецифического антитела, для гетеромерной ассоциации Fc-доменов. Кроме того, предпочтительно можно использовать внутридоменные

40 дисульфидные мостики, как это описано в примерах.

В другой структуре полипептидного комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, например, одновалентный Fv и одновалентный Fab предпочтительно применяют в качестве (1) антигенсвязывающего домена. В этом случае применяют представленную ниже структуру. Fv-фрагмент тяжелой цепи (VH) или Fv-фрагмент

45 легкой цепи (VL) одновалентного Fv соединяют через пептидную связь с CH1-доменом тяжелой цепи. CH1-домен тяжелой цепи соединяют через пептидную связь с одним из (2) двух Fc-доменов с пониженной активностью связывания с Fcγ-рецептором, которые образуют полипептидный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении. Другой

VL- или VH-фрагмент одновалентного Fv соединяют через пептидную связь с CL-доменом легкой цепи, который соединен через дисульфидный мостик с CH1-доменом тяжелой цепи. Таким образом, VH и VL соответственно соединенные с концами CH1-домена тяжелой цепи и CL-домена легкой цепи, образуют связывающий домен антитела.

5 sc(Fv)₂, который образует как (1) связывающий домен антитела, так и (3) CD3-связывающий домен, можно соединять через пептидную связь с N-концом другого Fc-домена из двух описанных выше доменов. В этом случае полипептидный комплекс, который имеет структуру, в которой CH1-домен тяжелой цепи соединен через пептидную связь с одним из двух Fc-доменов, образующих полипептидный комплекс, и sc(Fv)₂
10 соединен через пептидную связь с другим Fc-доменом, можно получать, используя описанный выше Fc-домен, выведенный из биспецифического антитела. Описанный выше полипептидный комплекс можно получать путем соединения каждого домена непосредственно через пептидную связь или путем пептидного связывания через пептидный линкер. В этом случае линкер, который следует применять, представляет собой, например, описанные выше в качестве примера линкеры и соответствующие
15 линкеры с пептидной меткой, например, с His-меткой, HA-меткой или FLAG-меткой.

В другой предпочтительной структуре полипептидного комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, в качестве (1) антигенсвязывающего домена применяют, например, также двухвалентный scFv. В одном из вариантов структуры можно получать
20 также полипептидный комплекс, в котором один из двухвалентных scFv соединяют через пептидную связь посредством VH, образующей (3) CD3-связывающий домен, с одним из двух (2) Fc-доменов с пониженной активностью связывания с Fcγ-рецептором, а другой двухвалентный scFv соединяют через пептидную связь посредством VL, образующей (3) CD3-связывающий домен, с одним из двух (2) Fc-доменов с пониженной
25 активностью связывания с Fcγ-рецептором. В этом случае можно применять описанный выше Fc-домен, выведенный из биспецифического антитела. Описанный выше полипептидный комплекс можно получать путем соединения каждого домена непосредственно через пептидную связь или путем пептидного связывания через пептидный линкер. В этом случае линкер, который следует применять, представляет собой, например, описанные выше в качестве примера линкеры и соответствующие
30 линкеры с пептидной меткой, например, с His-меткой, HA-меткой или FLAG-меткой.

В другом варианте структуры, для создания которой используют двухвалентный scFv в качестве (1) антигенсвязывающего домена, можно получать полипептидный комплекс, в котором один из двухвалентных scFv соединен через пептидную связь scFv, образующего (3) CD3-связывающий домен, с одним из двух (2) Fc-доменов с пониженной активностью связывания с Fcγ-рецептором, а другой двухвалентный scFv соединен
35 через пептидную связь с другим (2) Fc-доменом с пониженной активностью связывания с Fcγ-рецептором. В этом случае, используя описанный выше Fc-домен, выведенный из биспецифического антитела, можно получать полипептидный комплекс, в котором scFv, образующий антигенсвязывающий домен, соединен через пептидную связь посредством scFv, образующего CD3-связывающий домен, с одним из двух Fc-доменов, образующих полипептидный комплекс, и scFv, образующий антигенсвязывающий домен, соединен через пептидную связь с другим Fc-доменом. Описанный выше полипептидный комплекс можно получать путем соединения каждого домена
40 непосредственно через пептидную связь или путем пептидного связывания через пептидный линкер. В этом случае линкер, который можно применять, представляет собой, например, описанные выше в качестве примера линкеры и соответствующие линкеры с пептидной меткой, например, с His-меткой, HA-меткой или FLAG-меткой.

В другой предпочтительной структуре полипептидного комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, например, как антигенсвязывающий домен, так и домен, связывающий комплекс Т-клеточного рецептора, каждый присутствует в структуре

одновалентного Fab. Для создания одного из вариантов структуры можно получать

5 полипептидный комплекс, в котором Fv-фрагмент тяжелой цепи одновалентного Fab, образующего антигенсвязывающий домен, соединен посредством СН1-домена с одним из полипептидов, образующих Fc-домен, и Fv-фрагмент легкой цепи Fab соединен с CL-доменом, в то время как Fv-фрагмент тяжелой цепи Fab, образующего связывающий Т-клеточный рецептор домен соединен посредством СН1-домена с другим

10 полипептидом, образующим Fc-домен, а Fv-фрагмент легкой цепи Fab соединен с CL-доменом.

Для создания другого варианта структуры можно получать полипептидный комплекс, в котором Fv-фрагмент тяжелой цепи одновалентного Fab, образующего антигенсвязывающий домен, соединен посредством СН1-домена с одним полипептидом,

15 образующим Fc-домен, и Fv-фрагмент легкой цепи Fab соединен с CL-доменом, а Fv-фрагмент легкой цепи Fab, образующего домен, связывающий Т-клеточный рецептор, соединен посредством СН1-домена с другим полипептидом, образующим Fc-домен, и Fv-фрагмент тяжелой цепи Fab соединен с CL-доменом. Альтернативно этому, можно получать также полипептидный комплекс, в котором Fv-фрагмент тяжелой цепи

20 одновалентного Fab, образующего домен, связывающий Т-клеточный рецептор, соединен посредством СН1-домена с одним полипептидом, образующим Fc-домен, и Fv-фрагмент легкой цепи Fab соединен с CL-доменом, Fv-фрагмент легкой цепи Fab, образующего антигенсвязывающий домен, соединен посредством СН1-домена с другим полипептидом, образующим Fc-домен, и Fv-фрагмент тяжелой цепи Fab соединен с CL-доменом.

Для создания другого варианта структуры можно получать полипептидный комплекс, в котором Fv-фрагмент тяжелой цепи одновалентного Fab, образующего антигенсвязывающий домен, соединен посредством СН1-домена с одним полипептидом, образующим Fc-домен, и Fv-фрагмент легкой цепи Fab соединен с CL-доменом, а Fv-фрагмент легкой цепи Fab, образующего домен, связывающий Т-клеточный рецептор,

30 соединен посредством CL-домена с другим полипептидом, образующим Fc-домен, и Fv-фрагмент легкой цепи Fab соединен с СН1-доменом. Альтернативно этому, можно получать также полипептидный комплекс, в котором Fv-фрагмент тяжелой цепи одновалентного Fab, образующего домен, связывающий Т-клеточный рецептор, соединен посредством СН1-домена с одним полипептидом, образующим Fc-домен, и Fv-фрагмент

35 легкой цепи Fab соединен с CL-доменом, а Fv-фрагмент тяжелой цепи Fab, образующего антигенсвязывающий домен, соединен посредством CL-домена с другим полипептидом, образующим Fc-домен, и Fv-фрагмент легкой цепи Fab соединен с СН1-доменом.

В другом варианте структуры полипептидного комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, в котором как антигенсвязывающий домен, так и домен, связывающий комплекс Т-клеточного рецептора, каждый имеет структуру

40 одновалентного Fab, предпочтительные полипептиды, предлагаемые в настоящем изобретении, включают полипептиды, которые имеют:

(1) антигенсвязывающий домен, в котором Fv-фрагмент тяжелой цепи структуры одновалентного Fab, который связывается с антигеном, соединен посредством СН1-домена одного из описанных выше полипептидов, образующих Fc-домен, и Fv-фрагмент

45 структуры Fab соединен с CL-доменом; и

(2) домен, связывающий комплекс Т-клеточного рецептора, в котором Fv-фрагмент тяжелой цепи структуры одновалентного Fab, который связывается с комплексом Т-

клеточного рецептора, соединен посредством СН1-домена с другим полипептидом, образующим Fc-домен, и Fv-фрагмент легкой цепи структуры Fab сцеплен с CL-доменом;

и в которых электрические заряды СН1- и CL-доменов контролируют таким образом, чтобы имела место ассоциация Fv-фрагмента тяжелой цепи антигенсвязывающего домена с Fv-фрагментом легкой цепи антигенсвязывающего домена или ассоциация Fv-фрагмента тяжелой цепи домена, связывающего Т-клеточный рецептор, с Fv-фрагментом легкой цепи домена, связывающего Т-клеточный рецептор. В этом варианте осуществления изобретения структура (структура с контролируемой ассоциацией) полипептидного комплекса не ограничена конкретной структурой, если электрические заряды СН1- и CL-доменов контролируются таким образом, чтобы имела место ассоциация Fv-фрагмента тяжелой цепи антигенсвязывающего домена с Fv-фрагментом легкой цепи антигенсвязывающего домена или ассоциация Fv-фрагмента тяжелой цепи домена, связывающего Т-клеточный рецептор, с Fv-фрагментом легкой цепи домена, связывающего Т-клеточный рецептор.

Для создания варианта структуры с контролируемой ассоциацией можно получать полипептидный комплекс, в котором аминокислотные остатки СН1-домена, сцепленного с Fv-фрагментом тяжелой цепи домена, связывающего комплекс Т-клеточного рецептора, имеют такие же электрические заряды, что и аминокислотные остатки CL-домена, сцепленного с Fv-фрагментом легкой цепи антигенсвязывающего домена.

Для создания варианта структуры с контролируемой ассоциацией можно получать полипептидный комплекс, в котором аминокислотные остатки СН1-домена, сцепленного с Fv-фрагментом тяжелой цепи антигенсвязывающего домена, имеют такие же электрические заряды, что и аминокислотные остатки CL-домена, сцепленного с Fv-фрагментом легкой цепи домена, связывающего комплекс Т-клеточного рецептора.

Для создания варианта структуры с контролируемой ассоциацией можно получать полипептидный комплекс, в котором аминокислотные остатки СН1-домена, сцепленного с Fv-фрагментом тяжелой цепи домена, связывающего комплекс Т-клеточного рецептора, имеют такие же электрические заряды, что и аминокислотные остатки CL-домена, сцепленного с Fv-фрагментом легкой цепи антигенсвязывающего домена, и аминокислотные остатки СН1-домена, сцепленного с Fv-фрагментом тяжелой цепи антигенсвязывающего домена, имеют такие же электрические заряды, что и аминокислотные остатки CL-домена, сцепленного с Fv-фрагментом легкой цепи домена, связывающего комплекс Т-клеточного рецептора.

Для создания другого варианта структуры с контролируемой ассоциацией можно получать полипептидный комплекс, в котором аминокислотные остатки СН1-домена, сцепленного с Fv-фрагментом тяжелой цепи домена, связывающего комплекс Т-клеточного рецептора, имеют такие же электрические заряды, что и аминокислотные остатки CL-домена, сцепленного с Fv-фрагментом легкой цепи антигенсвязывающего домена, и аминокислотные остатки СН1-домена, сцепленного с Fv-фрагментом тяжелой цепи домена, связывающего комплекс Т-клеточного рецептора, имеют электрические заряды, противоположные зарядам аминокислотных остатков CL-домена, сцепленного с Fv-фрагментом легкой цепи домена, связывающего Т-клеточный рецептор.

Для создания еще одного варианта структуры с контролируемой ассоциацией можно получать полипептидный комплекс, в котором аминокислотные остатки СН1-домена, сцепленного с Fv-фрагментом тяжелой цепи домена, связывающего комплекс Т-клеточного рецептора, имеют такие же электрические заряды, что и аминокислотные остатки CL-домена, сцепленного с Fv-фрагментом легкой цепи антигенсвязывающего домена; аминокислотные остатки СН1-домена, сцепленного с Fv-фрагментом тяжелой

цепи антигенсвязывающего домена, имеют такие же электрические заряды, что и остатки CL-домена, сцепленного с Fv-фрагментом легкой цепи домена, связывающего комплекс Т-клеточного рецептора; аминокислотные остатки СН1-домена, сцепленного с Fv-фрагментом тяжелой цепи домена, связывающего комплекс Т-клеточного рецептора, имеют электрические заряды, противоположные зарядам аминокислотных остатков CL-домена, сцепленного с Fv-фрагментом легкой цепи домена, связывающего Т-клеточный рецептор.

Для создания еще одного варианта структуры с контролируемой ассоциацией можно получать полипептидный комплекс, в котором аминокислотные остатки СН1-домена, сцепленного с Fv-фрагментом тяжелой цепи антигенсвязывающего домена, имеют такие же электрические заряды, что и аминокислотные остатки CL-домена, сцепленного с Fv-фрагментом легкой цепи домена, связывающего комплекс Т-клеточного рецептора, и аминокислотные остатки СН1-домена, сцепленного с Fv-фрагментом тяжелой цепи антигенсвязывающего домена, имеют электрические заряды, противоположные зарядам аминокислотных остатков CL-домена, сцепленного с Fv-фрагментом легкой цепи антигенсвязывающего домена.

Для создания альтернативного варианта структуры с контролируемой ассоциацией можно получать полипептидный комплекс, в котором аминокислотные остатки СН1-домена, сцепленного с Fv-фрагментом тяжелой цепи домена, связывающего комплекс Т-клеточного рецептора, имеют такие же электрические заряды, что и аминокислотные остатки CL-домена, сцепленного с Fv-фрагментом легкой цепи антигенсвязывающего комплекса; аминокислотные остатки СН1-домена, сцепленного с Fv-фрагментом тяжелой цепи домена, связывающего комплекс Т-клеточного рецептора, имеют такие же электрические заряды, что и аминокислотные остатки CL-домена, сцепленного с Fv-фрагментом легкой цепи домена, связывающего комплекс Т-клеточного рецептора; и аминокислотные остатки СН1-домена, сцепленного с Fv-фрагментом тяжелой цепи антигенсвязывающего домена, имеют электрические заряды, противоположные зарядам аминокислотных остатков CL-домена, сцепленного с Fv-фрагментом легкой цепи антигенсвязывающего домена.

Для создания еще одного варианта структуры с контролируемой ассоциацией можно получать полипептидный комплекс, в котором аминокислотные остатки СН1-домена, сцепленного с Fv-фрагментом тяжелой цепи домена, связывающего комплекс Т-клеточного рецептора, имеют такие же электрические заряды, что и аминокислотные остатки CL-домена, сцепленного с Fv-фрагментом легкой цепи антигенсвязывающего домена; аминокислотные остатки СН1-домена, сцепленного с Fv-фрагментом тяжелой цепи антигенсвязывающего домена, имеют такие же электрические заряды, что и аминокислотные остатки CL-домена, сцепленного с Fv-фрагментом легкой цепи домена, связывающего комплекс Т-клеточного рецептора; аминокислотные остатки СН1-домена, сцепленного с Fv-фрагментом тяжелой цепи домена, связывающего комплекс Т-клеточного рецептора, имеют электрические заряды, противоположные зарядам аминокислотных остатков CL-домена, сцепленного с Fv-фрагментом легкой цепи домена, связывающего Т-клеточный рецептор; и аминокислотные остатки СН1-домена, сцепленного с Fv-фрагментом тяжелой цепи антигенсвязывающего домена, имеют электрические заряды, противоположные зарядам аминокислотных остатков CL-домена, сцепленного с Fv-фрагментом легкой цепи антигенсвязывающего домена.

Контроль электрических зарядов СН1- и CL-доменов

Для получения биспецифического полипептидного комплекса, который распознает эпитоп домена, связывающего Т-клеточный рецептор, посредством тяжелых и легких

цепей домена, связывающего Т-клеточный рецептор, и эпитоп антигена посредством тяжелых и легких цепей антигенсвязывающего домена, теоретически можно получать десять типов молекул полипептидных комплексов, если при создании полипептидного комплекса экспрессировать каждую из четырех цепей.

5 Однако требуемую молекулу полипептидного комплекса предпочтительно можно получать, например, осуществляя такой контроль доменов, который приводит к ингибированию ассоциации между тяжелой цепью домена, связывающего Т-клеточный рецептор, и легкой цепью антигенсвязывающего домена и/или ассоциацию между тяжелой цепью антигенсвязывающего домена и легкой цепью домена, связывающего
10 Т-клеточный рецептор.

Примерами являются изменения аминокислотных остатков, которые образуют поверхность раздела между СН1 тяжелой цепи домена, связывающего Т-клеточный рецептор, и СL легкой цепи антигенсвязывающего домена, на положительно заряженные аминокислотные остатки, и изменения аминокислотных остатков, которые образуют
15 поверхность раздела между СН1 тяжелой цепи и СL легкой цепи домена, связывающего Т-клеточный рецептор, на отрицательно заряженные аминокислотные остатки. В результате таких изменений нежелательная ассоциация между СН1 тяжелой цепи домена, связывающего Т-клеточный рецептор, и СL легкой цепи антигенсвязывающего домена ингибируется, поскольку электрические заряды аминокислотных остатков, которые
20 образуют поверхность раздела, в обоих случаях являются положительными, и нежелательная ассоциация между СН1 тяжелой цепи антигенсвязывающего домена и СL легкой цепи домена, связывающего Т-клеточный рецептор, также ингибируется, поскольку электрические заряды аминокислотных остатков, которые образуют поверхность раздела, в обоих случаях являются отрицательными. Требуемый
25 полипептидный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, можно эффективно создавать в результате требуемой ассоциации между СН1 тяжелой цепи домена, связывающего Т-клеточный рецептор, и СL легкой цепи домена, связывающего Т-клеточный рецептор, а также в результате требуемой ассоциации между СН1 тяжелой цепи антигенсвязывающего домена и СL легкой цепи антигенсвязывающего домена.
30 Кроме того, требуемая ассоциация между тяжелыми и легкими цепями домена, связывающего Т-клеточный рецептор, предпочтительно усиливается, поскольку аминокислотные остатки, которые образуют поверхность раздела, имеют противоположные друг другу электрические заряды. Требуемая ассоциация между тяжелыми и легкими цепями антигенсвязывающего домена также предпочтительно
35 усиливается, поскольку аминокислотные остатки, которые образуют поверхность раздела, имеют противоположные друг другу электрические заряды. Это позволяет эффективно создавать полипептидный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, с требуемой ассоциацией.

Кроме того, контроль ассоциации, предлагаемой в настоящем изобретении, можно
40 использовать также для ингибирования ассоциации между СН1-доменами (тяжелых цепей домена, связывающего Т-клеточный рецептор, и антигенсвязывающего домена) или между СL-доменами (легких цепей домена, связывающего Т-клеточный рецептор, и антигенсвязывающего домена).

Специалисты в данной области могут соответствующим образом отбирать требуемый
45 полипептидный комплекс, в котором ассоциация контролируется согласно настоящему изобретению типом аминокислотных остатков, локализованных в непосредственной близости к поверхности раздела СН1/СL при ассоциации.

Кроме того, с использованием публичных баз данных или т.п. специалисты в данной

области могут соответствующим образом отбирать приемлемые последовательности СН1 и СL антител в организме, таком как человек, обезьяна, мышь или кролик. Более конкретно, информацию об аминокислотных последовательностях СН1 и СL можно получить с помощью методов, описанных ниже в примерах.

5 В частности, как продемонстрировано в описанных ниже примерах, конкретные примеры комбинаций аминокислотных остатков, локализованных в непосредственной близости (граничащих или контактирующих) на поверхности раздела СН1/СL при ассоциации между СН1 и СL, которые соответствующим образом сцеплены с V_H и V_L, образующими домен, связывающий Т-клеточный рецептор, или антигенсвязывающий домен, включают:

- лизин (K) в положении 147 (EU-нумерация) в СН1 (например, в положении 147 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:1) и треонин (T) в положении 180 (EU-нумерация) в граничащем (контактирующем) СL;
- лизин (K) в положении 147 (EU-нумерация) в СН1 и серин (S) в положении 131 (EU-нумерация) в граничащем (контактирующем) СL;
- 15 - лизин (K) в положении 147 (EU-нумерация) в СН1 и треонин (T) в положении 164 (EU-нумерация) в граничащем (контактирующем) СL;
- лизин (K) в положении 147 (EU-нумерация) в СН1 и аспарагин (N) в положении 138 (EU-нумерация) в СL, которые граничат (контактируют) друг с другом;
- 20 - лизин (K) в положении 147 (EU-нумерация) в СН1 и глутаминовая кислота (E) в положении 123 (EU-нумерация) в граничащем (контактирующем) СL;
- глутамин (Q) в положении 175 (EU нумерация) в СН1 и глутамин (Q) в положении 160 (EU-нумерация) в граничащем (контактирующем) СL;

или

- 25 - лизин (K) в положении 213 (EU-нумерация) в СН1 и глутаминовая кислота (E) в положении 123 (EU-нумерация) в граничащем (контактирующем) СL.

Эти положения пронумерованы согласно руководству Кэбота с соавторами. (Kabat E.A. и др., Sequence of Proteins of Immunological Interest. NIH, 1991).

В контексте настоящего описания номера, обозначенные с помощью EU-индекса, соответствуют EU-нумерации (Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication №91-3242). Согласно настоящему изобретению понятия «аминокислотный остаток в положении X (EU-нумерация)» и «аминокислота в положении X (EU-нумерация)» (где X обозначает произвольный номер) применяют взаимозаменяемо с понятиями «аминокислотный остаток, соответствующий положению X (EU-нумерация)»,
35 «аминокислота, соответствующая положению X (EU-нумерация)».

Как описано ниже в примерах, требуемый полипептидный комплекс предпочтительно можно получать, осуществляя замену аминокислотных остатков и применяя способы, предлагаемые в настоящем изобретении.

В отношении указанных выше аминокислотных остатков известно, что они являются высококонсервативными у человека и мыши (J. Mol. Recognit. 16, 2003, сс.113-120). Таким образом, изменяя аминокислотные остатки, соответствующие указанным выше аминокислотным остаткам, можно контролировать также ассоциацию между СН1 и СL в константной области полипептидного комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, который отличается от полипептидных комплексов, описанных в примерах.

45 В частности, в настоящем изобретении предложены полипептидные комплексы с контролируемой ассоциацией между тяжелой цепью и легкой цепью, в которых одна, две или большее количество пар, выбранных из группы, состоящей из пар аминокислотных остатков, указанных ниже в подпунктах (а)-(е), имеют одинаковые

электрические заряды:

(а) аминокислотный остаток в положении 147 (EU-нумерация) в СН1 и аминокислотный остаток в положении 180 (EU нумерация) в СL;

(б) аминокислотный остаток в положении 147 (EU-нумерация) в СН1 и аминокислотный остаток в положении 131 (EU-нумерация) в СL;

(в) аминокислотный остаток в положении 147 (EU-нумерация) в СН1 и аминокислотный остаток в положении 164 (EU-нумерация) в СL;

(г) аминокислотный остаток в положении 147 (EU-нумерация) в СН1 и аминокислотный остаток в положении 138 (EU-нумерация) в СL;

(д) аминокислотный остаток в положении 147 (EU-нумерация) в СН1 и аминокислотный остаток в положении 123 (EU-нумерация) в СL и

(е) аминокислотный остаток в положении 175 (EU-нумерация) в СН1 и аминокислотный остаток в положении 160 (EU-нумерация) в СL.

Кроме того, другим вариантом осуществления настоящего изобретения являются антитела, в которых аминокислотные остатки в паре аминокислотных остатков, указанных ниже в подпункте (ж), имеют одинаковые электрические заряды:

(ж) аминокислотный остаток в положении 213 (EU-нумерация) в СН1 и аминокислотный остаток в положении 123 (EU-нумерация) в СL.

Аминокислотные остатки в каждой из указанных выше пар локализуются при ассоциации в непосредственной близости друг к другу, что описано ниже в примерах. С помощью методов моделирования на основе гомологии или других методов с использованием поступающих в продажу программ, специалисты в данной области могут соответствующим образом выявлять в требуемых СН1 или СL положения аминокислот, соответствующие аминокислотным остаткам, указанным выше в подпунктах (а)-(ж), и могут соответствующим образом изменять аминокислотные остатки в этих положениях.

Указанный «несущий электрический заряд аминокислотный остаток» в описанном выше антителе предпочтительно выбирают, например, из аминокислотных остатков, принадлежащих к указанной ниже группе (X) или (Y):

(X) глутаминовая кислота (E) и аспарагиновая кислота (D); и

(Y) лизин (K), аргинин (R), гистидин (H).

Касательно описанных выше полипептидных комплексов понятие «имеющий такой же электрический заряд» означает, например, что все из двух или большего количества аминокислотных остатков принадлежат к одной из описанных выше групп (X) и (Y).

С другой стороны, понятие «имеет противоположный электрический заряд» означает, например, что по меньшей мере один из двух или большего количества аминокислотных остатков представляет собой аминокислотный остаток, принадлежащий к одной из описанных выше групп (X) и (Y), а другие аминокислотные остатки представляют собой аминокислотные остатки, которые принадлежат к другой группе.

Предпочтительными вариантами осуществления настоящего изобретения являются также способы получения вышеописанных полипептидных комплексов и способы, предлагаемые в настоящем изобретении, контроля ассоциации путем замены аминокислотных остатков из групп, указанных выше в подпунктах (а)-(ж), на аминокислотные остатки, которые имеют такой же электрический заряд.

В контексте настоящего изобретения «подлежащие замене» аминокислотные остатки не ограничены указанными выше аминокислотными остатками константной области. С помощью метода моделирования на основе гомологии или других методов, основанных на использовании поступающих в продажу программ, специалисты в

данной области могут соответствующим образом идентифицировать аминокислотные остатки, которые образуют поверхность раздела в мутантном полипептиде или гетеромерном мультимере, и соответствующим образом заменять аминокислотные остатки в таких положениях с целью контроля ассоциации.

5 В методах ингибирования нежелательной ассоциации между тяжелой цепью и легкой цепью путем интродукции вызывающих отталкивание зарядов на поверхности раздела между переменными областями тяжелой цепи и легкой цепи, аминокислотные остатки, контактирующие друг с другом на поверхности раздела между переменной областью тяжелой цепи (VH) и переменной областью легкой цепи (VL), представляют собой, например, глутамин (Q) в положении 39 (например, в положении 39 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6, описанной в WO 2006/106905) в переменной области тяжелой цепи FR2 и глутамин (Q) в положении 38 (например, в положении 44 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:8, описанной в WO 2006/106905) в граничащей (контактирующей) переменной области легкой цепи FR2. Такие предпочтительные аминокислотные остатки представляют собой также, например, лейцин (L) в положении 45 (например, в положении 45 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:6, описанной в WO 2006/106905) в переменной области тяжелой цепи FR2 и пролин (P) в положении 44 (например, в положении 44 в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:8, представленной в WO 2006/106905) в граничащей (контактирующей) переменной области легкой цепи FR2. Указанные положения пронумерованы согласно руководству Кэбота соавторами (Kabat E.A. и др., Sequence of Proteins of Immunological Interest, изд-во NIH, 1991).

В отношении указанных выше аминокислотных остатков известно, что они являются высококонсервативными у человека и мыши (J. Mol. Recognit. 16, 2003, сс.113-120). Таким образом, изменяя аминокислотные остатки, соответствующие указанным выше аминокислотным остаткам, можно контролировать также ассоциацию между переменными областями VH и VL антител, отличающихся от полипептидных комплексов, описанных в примерах.

Более конкретно, указанные антитела, которые имеют переменные области тяжелых цепей и легких цепей, включают антитела, в которых указанные ниже аминокислотные остатки (1) и (2) или (3) и (4) имеют одинаковые электрические заряды:

- (1) аминокислотный остаток, соответствующий положению 39 (EU-нумерация) в переменной области тяжелой цепи;
- (2) аминокислотный остаток, соответствующий положению 38 (EU-нумерация) в переменной области легкой цепи;
- (3) аминокислотный остаток, соответствующий положению 45 (EU-нумерация) в переменной области тяжелой цепи;
- (4) аминокислотный остаток, соответствующий положению 44 (EU-нумерация) в переменной области легкой цепи.

40 Указанные выше аминокислотные остатки (1) и (2) или (3) и (4) локализуются при ассоциации в непосредственной близости друг к другу. С помощью метода моделирования на основе гомологии или других методов с использованием поступающих в продажу программ, специалисты в данной области могут соответствующим образом идентифицировать в требуемой переменной области тяжелой цепи или легкой цепи аминокислотные положения, соответствующие аминокислотным остаткам, указанным выше в (1)-(4), и может соответствующим образом изменять аминокислотные остатки в указанных положениях.

В указанном выше антителе «несущий электрический заряд аминокислотный остаток»

предпочтительно выбирают, например, из аминокислотных остатков, принадлежащих к указанной ниже группе (X) или (Y):

(X) глутаминовая кислота (E) и аспарагиновая кислота (D); и

(Y) лизин (K), аргинин (R), гистидин (H).

5 В человеческих и мышечных антителах, как правило, указанные выше аминокислотные остатки (1)-(4) представляют собой:

(1) глутамин (Q);

(2) глутамин (Q);

(3) лейцин (L) и

10 (4) пролин (P) соответственно.

В предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения указанные выше аминокислотные остатки изменяют (например, заменяют на имеющую заряд аминокислоту). Типы перечисленных выше аминокислотных остатков (1)-(4) не ограничены указанными выше. Эти аминокислоты могут представлять собой любые
15 другие аминокислоты, соответствующие указанным выше. Например, касательно человеческого антитела, аминокислота, соответствующая аминокислоте в положении 38 (EU-нумерация) в вариательной области легкой цепи, может представлять собой гистидин (H). На основе опубликованных документов (например, J. Mol. Recognit. 16, 2003, сс.113-120) или т.п. специалисты в данной области могут определять тип
20 аминокислотного остатка, который соответствует любому положению в легкой цепи, и следовательно могут соответственно изменять аминокислотный остаток (например, осуществлять замену на имеющую заряд аминокислоту).

В методиках ингибирования нежелательной ассоциации между тяжелой цепью и легкой цепью путем замены аминокислотных остатков, которые образуют гидрофобное
25 ядро на поверхности раздела между вариательными областями тяжелой цепи и легкой цепи, на несущие электрический заряд полярные аминокислоты предпочтительные аминокислотные остатки, обладающие способностью образовывать гидрофобное ядро на поверхности раздела между вариательной областью тяжелой цепи (VH) и вариательной области легкой цепи (VL), представляют собой лейцин (L) в положении
30 45 в вариательной области тяжелой цепи и пролин (P) в положении 44, граничащий в вариательной областью легкой цепи.

В целом, понятие «гидрофобное ядро» относится к участку, в котором боковые цепи гидрофобных аминокислот объединены внутри ассоциированного полипептида. К гидрофобным аминокислотам относятся, например, аланин, изолейцин, лейцин,
35 метионин, фенилаланин, пролин, триптофан и валин. Однако в образовании гидрофобного ядра могут принимать участие аминокислотные остатки, отличные от указанных гидрофобных аминокислот (например, тирозин). В сочетании с гидрофильной поверхностью, образованной выступающими боковыми цепями гидрофильных аминокислот, гидрофобное ядро служит в качестве «движущей силы», ускоряющей
40 ассоциацию водорастворимых полипептидов. Когда гидрофобные аминокислоты двух различных доменов присутствуют на поверхности молекулы и являются доступными для молекул воды, то энтропия возрастает, что приводит к увеличению свободной энергии. В результате ассоциация двух доменов друг с другом должна быть такой, чтобы снижать свободную энергию, что требуется для стабилизации. Гидрофобные
45 аминокислоты по поверхности раздела погружаются внутрь молекулы с образованием гидрофобного ядра.

Считается, что, когда гидрофобные аминокислоты, которые образуют гидрофобное ядро при ассоциации полипептидов, изменяют на полярные аминокислоты, несущие

электрический заряд, то образование гидрофобного ядра ингибируется. Это приводит к ингибированию ассоциации полипептидов.

Для создания полипептидных комплексов, предлагаемых в настоящем изобретении, можно применять также другие известные методики. Например, для усиления ассоциации первой VH (VH1) и первой VL (VL1) и/или второй VH (VH2) и второй VL (VL2), помимо «изменений», предлагаемых в настоящем изобретении, аминокислоты в одной из переменных областей Н-цепи заменяют на аминокислоты, которые имеют более крупную боковую цепь («выступ»; «выпуклость»), а аминокислоты в переменной области другой Н-цепи заменяют на аминокислоты с боковой цепью меньшего размера («впадина»; «пустота»), в результате чего «выступ» помещается во «впадину». Это усиливает ассоциацию VH1 и VL1 и/или VH2 и VL2, что приводит к дополнительному ингибированию ассоциации между полипептидами VH1 и VL2 и/или между VH2 и VL1 (WO 1996/027011; Ridgway J.B. и др., Protein Engineering 9, 1996, сс.617-621; Merchant A.M. и др., Nature Biotechnology 16, 1998, сс.677-681).

При создании описанного выше полипептидного комплекса каждый домен можно соединять непосредственно через пептидную связь или осуществлять связывание пептидов через пептидный линкер. В этом случае применяемый линкер может представлять собой линкер, описанный выше в качестве примера, и соответствующие линкеры с пептидной меткой, например, с His-меткой, HA-меткой, мус-меткой или FLAG-меткой. Кроме того, предпочтительно можно использовать способность к взаимному связыванию на основе водородных связей, дисульфидной связи, ковалентной связи или на основе ионного взаимодействия, или их комбинации. Например, можно использовать аффинность между CH1 и CL антитела, или описанные выше Fc-домены, выведенные из биспецифического антитела, можно применять для гетеромерной ассоциации Fc-доменов. Кроме того, предпочтительно можно использовать междоменные дисульфидные мостики, как это описано в примерах.

Полипептидные комплексы, предлагаемые в настоящем изобретении, включают, например, варианты, которые представлены на фиг.17, 19 и 24.

Полипептидные комплексы, предлагаемые в настоящем изобретении, можно получать теми же самыми методами, что и методы, описанные выше для получения рекомбинантных антител.

Кроме того, настоящее изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим полипептидный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении. Полипептидный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, можно встраивать в любые экспрессионные векторы. Для получения клеток, экспрессирующих полипептидный комплекс, соответствующего хозяина трансформируют экспрессионным вектором. Полипептидный комплекс, кодируемый полинуклеотидом, можно получать путем культивирования клеток, экспрессирующих полипептидный комплекс, и сбора продукта экспрессии из супернатанта культуры. В частности, настоящее изобретение относится к векторам, несущим полинуклеотид, который кодирует полипептидный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, клеткам, которые содержат векторы, и способам получения полипептидного комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, заключающимся в том, что культивируют клетки и собирают полипептидный комплекс из супернатанта культуры. Для описанных выше целей можно использовать такие же методики, которые описаны выше для рекомбинантных антител.

Фармацевтическая композиция

Другим объектом настоящего изобретения являются фармацевтические композиции, которые содержат в качестве действующего вещества полипептидный комплекс, который

включает:

- (1) антигенсвязывающий домен;
- (2) домен, содержащий Fc-домен с пониженной активностью связывания с Fcγ-рецептором и
- 5 (3) CD3-связывающий домен.

Настоящее изобретение относится также к терапевтическим агентам для индукции клеточной цитотоксичности, которые содержат в качестве действующего вещества описанный выше комплекс (терапевтические агенты для индукции клеточной цитотоксичности), агенты, подавляющие рост клеток, и противораковые агенты.

- 10 Фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, можно применять в качестве средства для осуществления терапии или профилактики рака. Согласно настоящему изобретению терапевтические агенты для индукции клеточной цитотоксичности, агенты, подавляющие рост клеток, и противораковые агенты, предлагаемые в настоящем изобретении, предпочтительно вводят индивидуумам,
- 15 страдающим раком или имеющим вероятность рецидива рака.

Согласно настоящему изобретению терапевтические агенты для индукции клеточной цитотоксичности, агенты, подавляющие рост клеток, и противораковые агенты, которые содержат в качестве действующего вещества полипептидный комплекс, который включает:

- 20 (1) антигенсвязывающий домен;
- (2) домен, содержащий Fc-домен с пониженной активностью связывания с Fcγ-рецептором и
- (3) CD3-связывающий домен,

- можно рассматривать также в качестве способа предупреждения или лечения рака,
- 25 который заключается в том, что осуществляют стадию, на которой вводят полипептидный комплекс индивидууму, или полипептидный комплекс можно применять для приготовления терапевтических агентов для индукции клеточной цитотоксичности, агентов, подавляющих рост клеток, или противораковых агентов.

- В контексте настоящего описания понятие «содержат в качестве действующего вещества полипептидный комплекс, который включает:
- 30 (1) антигенсвязывающий домен;

- (2) домен, содержащий Fc-домен с пониженной активностью связывания с Fcγ-рецептором и
- (3) CD3-связывающий домен»,

- 35 означает, что композиция содержит полипептидный комплекс в качестве основного действующего вещества; однако относительное содержание полипептидного комплекса конкретно не указано.

- Фармацевтическую композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, терапевтический агент для индукции клеточной цитотоксичности, агент, подавляющий
- 40 рост клеток, или противораковый агент, предлагаемый в настоящем изобретении, можно приготавливать при необходимости с использованием различных типов полипептидных комплексов. Например, цитотоксическое действие в отношении клеток, экспрессирующих антиген, можно усиливать с использованием смеси из множества полипептидных комплексов, предлагаемых в настоящем изобретении, которые
- 45 связываются с одним и тем же антигеном. Альтернативно этому, терапевтическое действие можно повышать путем приготовления полипептидного комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, содержащего антигенсвязывающий домен, который связывается с раковым антигеном, в комбинации с другими полипептидными

комплексами, предлагаемыми в настоящем изобретении, который содержат антигенсвязывающий домен для другого антигена.

При необходимости полипептидные комплексы, предлагаемые в настоящем изобретении, можно капсулировать с микрокапсулы (микрокапсулы, изготовленные из гидроксиметилцеллюлозы, желатина, поли(метилметакрилата) и т.п.), и можно включать в компоненты коллоидных систем, предназначенных для введения лекарственных веществ (липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) (например, см. «Remington's Pharmaceutical Science 16-е изд.», под ред. Oslo, 1980)). Кроме того, известны методы приготовления агентов в виде средств с замедленным высвобождением, и их можно применять для полипептидных комплексов, предлагаемых в настоящем изобретении (J. Biomed. Mater. Res. 15, 1981, сс.267-277; Chemtech. 12, 1982, сс.98-105; US №3773719; опубликованные европейские патенты (EP) EP 58481 и EP 133988; Biopolymers 22, 1983, сс.547-556).

Фармацевтические композиции, агенты, подавляющие рост клеток, или противораковые агенты, предлагаемые в настоящем изобретении, можно вводить пациенту либо орально, либо парентерально. Предпочтительным является парентеральное введение. В частности, указанные методы введения включают инъекцию, введение в нос, транспульмонарное введение и чрескожное введение. Инъекции включают, например, внутривенные инъекции, внутримышечные инъекции, внутрибрюшинные инъекции и подкожные инъекции. Например, фармацевтические композиции, терапевтические агенты для индукции клеточной цитотоксичности, агенты, подавляющие рост клеток, или противораковые агенты, предлагаемые в настоящем изобретении, можно применять местно или системно путем инъекции. Кроме того, приемлемые методы введения можно выбирать в зависимости от возраста пациента и симптомов. Вводимую дозу можно выбирать, например, из следующего диапазона: от 0,0001 до 1000 мг на кг веса тела на каждое введение. Альтернативно этому, дозу можно выбирать, например, из следующего диапазона: от 0,001 до 100000 мг/пациента. Однако доза фармацевтической композиции, предлагаемой в настоящем изобретении, не ограничена указанными дозами.

Фармацевтические композиции, предлагаемые в настоящем изобретении, можно приготавливать с помощью общепринятых методов (например, см. Remington's Pharmaceutical Science, последнее изд., изд-во Mark Publishing Company, Easton, U.S.A.), и они могут содержать также фармацевтически приемлемые носители и добавки. Их примерами являются (но, не ограничиваясь только ими) поверхностно-активные вещества, эксципиенты, красители, ароматизаторы, консерванты, стабилизаторы, буферы, суспендирующие агенты, придающие изотоничность агенты, связывающие вещества, разрыхлители, замасливатели, повышающие текучесть агенты и корригенты и можно применять другие общепринятые носители. Конкретными примерами носителей являются легкая безводная кремниевая кислота, лактоза, кристаллическая целлюлоза, маннит, крахмал, кармеллоза кальция, кармеллоза натрия, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, поливинилацетальдиэтиламиноацетат, поливинилпирролидон, желатин, триглицерид со средней длиной цепи, полиоксиэтиленированное гидрогенизированное касторовое масло 60, сахароза, карбоксиметилцеллюлоза, кукурузный крахмал, неорганическая соль и т.п.

В настоящем изобретении предложены также способы повреждения клеток, экспрессирующих раковый антиген, или подавления клеточного роста, заключающиеся в том, что приводят в контакт клетки, экспрессирующие раковый антиген, с полипептидным комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении, который

связывается с раковым антигеном. Моноклональные антитела, которые связываются с раковым антигеном, описаны выше как связывающий раковый антиген полипептидный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, который входит в состав терапевтических агентов для индукции клеточной цитотоксичности, агентов, подавляющих рост клеток, или противораковых агентов, предлагаемых в настоящем изобретении. Изобретение не ограничено клетками, с которыми связывается связывающий раковый антиген полипептидный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, если они экспрессируют раковый антиген. В частности, в настоящем изобретении предпочтительными экспрессирующими раковый антиген клетками являются клетки рака яичника, клетки рака предстательной железы, клетки рака молочной железы, клетки рака матки, клетки рака печени, клетки рака легкого, клетки рака поджелудочной железы, клетки рака желудка, клетки рака мочевого пузыря и клетки рака ободочной кишки. Если раковый антиген представляет собой GPC3, то изобретение не ограничено конкретными клетками, если они экспрессируют GPC3. Однако предпочтительными раковыми клетками являются клетки гепатокарциномы, клетки рака легкого и клетки рака яичника.

Согласно настоящему изобретению «приведение в контакт» можно осуществлять, например, добавляя связывающий раковый антиген полипептидный комплекс, предлагаемый в изобретении, к культуральным средам клеток, экспрессирующих раковый антиген, которые культивируют *in vitro*. В этом случае добавляемый полипептидный комплекс можно применять в пригодной для этой цели форме, такой как раствор или твердое вещество, полученное путем лиофилизации, или т.п. Когда полипептидный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, добавляют в виде водного раствора, то раствор может представлять собой чистый водный раствор, содержащий только полипептидный комплекс, или раствор, содержащий, например, указанные выше поверхностно-активное вещество, эксципиент, краситель, ароматизатор, консервант, стабилизатор, буфер, суспендирующий агент, придающий изотоничность агент, связующее вещество, разрыхлитель, замасливатель, повышающий текучесть агент и корригент. Концентрация добавляемого комплекса не имеет решающего значения; однако конечная концентрация в культуральной среде предпочтительно составляет от 1 пг/мл до 1 г/мл, более предпочтительно от 1 нг/мл до 1 мг/мл и еще более предпочтительно от 1 мкг/мл до 1 мг/мл.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения «приведение в контакт» можно осуществлять также *in vivo* путем обработки животных кроме человека, которым трансплантированы экспрессирующие раковый антиген клетки, или животных, у которых эндогенно происходит экспрессия ракового антигена. Метод введения может быть оральным или парентеральным. Предпочтительным является парентеральное введение. В частности, указанные методы введения включают инъекцию, введение в нос, введение в легкое и чрескожное введение. Инъекции включают, например, внутривенные инъекции, внутримышечные инъекции, внутрибрюшинные инъекции и подкожные инъекции. Например, фармацевтические композиции, терапевтические агенты для индукции клеточной цитотоксичности, агенты, подавляющие рост клеток, или противораковые агенты, предлагаемые в настоящем изобретении, можно применять местно или системно путем инъекции. Кроме того, приемлемые методы введения можно выбирать в зависимости от возраста животного и симптомов. Когда полипептидный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, добавляют в виде водного раствора, то раствор может представлять собой чистый водный раствор, содержащий только полипептидный комплекс, или раствор, содержащий, например, указанные выше

поверхностно-активное вещество, эксципиент, краситель, ароматизатор, консервант, стабилизатор, буфер, суспендирующий агент, придающий изотоничность агент, связующее вещество, разрыхлитель, замасливатель, повышающий текучесть агент и корригент. Вводимую дозу можно выбирать, например, из следующего диапазона: от 0,0001 до 1000 мг на кг веса тела на каждое введение. Альтернативно этому, дозу можно выбирать, например, из следующего диапазона: от 0,001 до 100000 мг/пациента. Однако доза полипептидного комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, не ограничена указанными примерами.

Описанные ниже методы предпочтительно используют в качестве метода оценки или определения клеточной цитотоксичности, обусловленной контактированием полипептидного комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, с экспрессирующими антиген клетками, с которыми связывается антигенсвязывающий домен, входящий в полипептидный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении. Методы оценки или определения цитотоксической активности *in vitro* включают методы определения активности цитотоксических Т-клеток или т.п. Обладает ли полипептидный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, способностью индуцировать опосредуемую Т-клетками клеточную цитотоксичность, можно определять с помощью известных методов (см., например, *Current protocols in Immunology*, глава 7. *Immunologic studies in humans*, под ред. John E. Coligan и др., изд-во, John Wiley & Sons, Inc., 1993). При осуществлении анализа цитотоксичности полипептидный комплекс, антигенсвязывающий домен которого связывается с антигеном, отличным от антигена, распознаваемого антигенсвязывающим доменом полипептидного комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, и который не экспрессируется на клетках, применяют в качестве контрольного полипептидного комплекса. Контрольный полипептидный комплекс анализируют таким же образом. Затем оценивают активность, определяя, обладает ли полипептидный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, более выраженной цитотоксической активностью, чем контрольный полипептидный комплекс.

Цитотоксическую активность *in vivo* оценивают или определяют, например, с помощью следующей процедуры. Клетки, экспрессирующие антиген, с которым связывается антигенсвязывающий домен, входящий в полипептидный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, трансплантируют внутрикожно или подкожно животному кроме человека. Затем, начиная со дня трансплантации или после него, вводят тестируемый полипептидный комплекс в вену или перитонеальную полость каждый день или с интервалами в несколько дней. В течение времени определяют размер опухоли. Различие в изменении размера опухоли можно рассматривать как цитотоксическую активность. Также как и в анализе *in vitro*, вводят контрольный полипептидный комплекс. Можно считать, что полипептидный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, обладает цитотоксической активностью, когда размер опухолей является меньшим в группе, которую обрабатывали полипептидным комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении, чем в группе, которую обрабатывали контрольным полипептидным комплексом.

МТТ-метод и измерение меченого с помощью изотопа поглощения тимидина в клетки предпочтительно применяют для оценки или определения воздействия контакта с полипептидным комплексом, предлагаемым в настоящем изобретении, на подавление роста клеток, экспрессирующих антиген, с которым связывается антигенсвязывающий домен, входящий в полипептидный комплекс. При этом методы, аналогичные описанным выше для оценки или определения цитотоксической активности *in vivo*, предпочтительно

можно использовать для оценки или определения способности подавлять рост клеток *in vivo*.

В настоящем изобретении предложены также наборы, которые можно применять в способе, предлагаемом в настоящем изобретении, которые содержат полипептидный комплекс, предлагаемый в настоящем изобретении, или полипептидный комплекс, полученный способом, предлагаемом в настоящем изобретении. Наборы могут быть упакованы вместе с дополнительным фармацевтически приемлемым носителем или средой, или с инструкцией, включающей руководство по применению наборов и т.д.

Кроме того, настоящее изобретение относится к полипептидным комплексам, предлагаемым в настоящем изобретении, или полипептидным комплексам, полученным способом, предлагаемом в настоящем изобретении, для применения в способе, предлагаемом в настоящем изобретении.

Все процитированные в настоящем описании документы, характеризующие известный уровень техники, включены в настоящее описание в качестве ссылки.

Примеры

Ниже настоящее изобретение описано со ссылкой на конкретные примеры, которые не ограничивают объем изобретения.

Пример 1. Конструирование и изучение GPC3 ERY2

(1) Основные принципы

Существует хорошо известный метод пролонгирования времени полужизни в крови вводимого белка *in vivo*, который основан на опосредуемой FcRn рециркуляции с использованием представляющего интерес белка, конъюгированного с Fc-доменом антитела. Однако конъюгация Fc естественного типа с BiTE может приводить к индукции различных цитокинов, поскольку одна и та же молекула может связываться с T-клеткой через анти-CD3 scFv-фрагмент ее BiTE-остатка и одновременно связываться с FcγR (Fcγ-рецептор) на клеточной мембране, например, NK-клетки или макрофага, через ее Fc-домен, и образовавшаяся перекрестная сшивка может активировать эти клетки независимым от ракового антигена образом. Таким образом, получали молекулу, обозначенную как ERY2, в которой антитело в виде BiTE сцеплено через полипептидный линкер с Fc-доменом, обладающим пониженной активностью связывания с Fcγ-рецептором (молчащий Fc), и активность ERY2 оценивали путем сравнения с активностью BiTE. scFv антитела к эпислон цепи CD3, соединяли через короткий пептидный линкер с scFv антитела к глипикану 3 (GPC3), который представляет собой заякоренный с помощью GPI белок, для которого известен высокий уровень экспрессии на клетках рака печени, с получением BiTE к GPC3 (GPC3 BiTE) (фиг.17A). Затем его соединяли с молчащим Fc с получением ERY2 к GPC3 (GPC3 ERY2) (фиг.17B). Кроме того, для сравнения создавали антитела к GPC3 обычного IgG-типа. Антитело к GPC3 IgG-типа получали в виде антитела с пониженным содержанием фукозы во фрагменте сахарной цепи, т.е. антитела с низким уровнем фукозы, которое, как известно, обладает повышенной ADCC-активностью.

(2) Конструирование GPC3 BiTE

С помощью ПЦР-амплификации с использованием в качестве матрицы экспрессионного вектора для антитела к GPC3 получали кДНК, каждая из которых кодировала либо вариабельную область H-цепи (анти-GPC3 VH), либо вариабельную область L-цепи (анти-GPC3 VL). ПЦР осуществляли с помощью праймеров, содержащих соответствующие дополнительные последовательности, и указанных выше кДНК в качестве матриц для конструирования кДНК-фрагмента, кодирующего анти-GPC3 scFv, имеющего аминокислотную последовательность, в которой анти-GPC3 VH и анти-

GPC3 VL сцеплены с помощью линкера с тремя повторами Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:7).

Кроме того, получали серии олигонуклеотидов, каждый из которых имел нуклеотидную последовательность, кодирующую частичную последовательность 5
вариабельной области Н-цепи (M12 VH) или вариабельную область L-цепи (M12 VL) антитела к CD3 (M12), и имел на концах комплементарные последовательности. Олигонуклеотиды создавали таким образом, чтобы их можно было связывать друг с другом через области комплементарных последовательностей с помощью полимеразной реакции для синтеза полинуклеотида, соответствующего вариабельной области Н-цепи 10
(M12 VH) и вариабельной области L-цепи (M12 VL). Олигонуклеотиды смешивали и затем связывали друг с другом с помощью ПЦР с получением двух кДНК, кодирующих аминокислотные последовательности соответствующих вариабельных областей. ПЦР осуществляли с помощью праймеров, содержащих соответствующие дополнительные последовательности, и указанных выше кДНК в качестве матриц для конструирования 15
кДНК-фрагмента, кодирующего scFv M12, имеющего аминокислотную последовательность, в которой M12 VL и M12 VH сцеплены через линкер, имеющий три повтора Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:7).

Затем, с помощью ПЦР с использованием праймеров, содержащих соответствующие дополнительные последовательности, и указанных выше кДНК-фрагментов, каждый 20
из которых кодировал либо анти-GPC3 scFv, либо M12 scFv, в качестве матриц, конструировали кДНК-фрагмент, который кодировал аминокислотную последовательность, в которой анти-GPC3 scFv и M12 scFv соединяли через линкер, состоящий из Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:7), и с His-меткой на С-конце (восемь остатков гистидина) (последовательность SEQ ID NO:33 без 19 аминокислот на 25
аминоконце).

Осуществляли ПЦР с использованием праймеров, содержащих соответствующие дополнительные последовательности, и в качестве матрицы кДНК-фрагмента, кодирующего аминокислотную последовательность SEQ ID NO:33, лишенную 19 30
аминоконцевых аминокислот, для получения кДНК-фрагмента, в котором расщепляемую EcoRI последовательность, последовательность Козак, и нуклеотидную последовательность, кодирующую секреторную сигнальную последовательность, присоединяли к 5'-концу указанного выше кДНК-фрагмента, а расщепляемую NotI последовательность присоединяли к 3'-концу. Образовавшийся кДНК-фрагмент расщепляли с помощью EcoRI и NotI и встраивали в экспрессионный вектор для клеток 35
млекопитающих с получением экспрессионного вектора для GPC3 BiTE (SEQ ID NO: 33; зрелая последовательность не содержит 19 аминокислот на аминоконце, которые служат в качестве сигнальной последовательности).

Вектор интродуцировали в клетки CHO DG44 с помощью электропорации. После серийного разведения клетки культивировали в присутствии 1 мг/мл генетицина для 40
выделения устойчивых к лекарственному средству клеточных линий. Супернатант культуры полученных клеточных линий анализировали с помощью вестерн-блоттинга с использованием антитела к His-метке для отбора клеточных линий, экспрессирующих GPC3 BiTE.

Супернатант культуры, полученный в результате крупномасштабного 45
культивирования указанной клеточной линии, вносили в колонку, заполненную SP Сефарозой FF column (фирма GE Healthcare). После отмывки колонки фракцию, содержащую GPC3 BiTE, элюировали с использованием концентрационного градиента NaCl. Фракцию вносили в колонку HisTrap HP (фирма GE Healthcare). После отмывки

колонки фракцию, содержащую GPC3 BiTE, элюировали с использованием концентрационного градиента имидазола. Фракцию концентрировали ультрафильтрацией и затем концентрат вносили в колонку, заполненную Супердекс 200 (фирма GE Healthcare). Собирали только мономерную содержащую GPC3 BiTE фракцию с получением очищенного GPC3 BiTE.

(3) Конструирование GPC3 ERY2

Осуществляли ПЦР с использованием праймеров, содержащих такие же соответствующие дополнительные последовательности, что и в описанном выше методе, и с использованием метода, хорошо известного специалистам в данной области, такого метода сайтнаправленного мутагенеза с использованием набора QuikChange Site-Directed Mutagenesis (фирма Stratagene), для получения экспрессионных векторов, в которые встроен полинуклеотид, кодирующий GPC3 ERY2_Hk (SEQ ID NO:34; зрелая последовательность, которая не содержит 19 аминокислот на аминоконце, служащих в качестве сигнальной последовательности) или GPC3 ERY2_Hh (SEQ ID NO:35; зрелая последовательность, которая не содержит 19 аминокислот на аминоконце, служащих в качестве сигнальной последовательности).

Эти экспрессионные векторы совместно интродуцировали в клетки линии FreeStyle293-F (фирма Invitrogen) для кратковременной экспрессии GPC3 ERY2. Образовавшийся супернатант культуры вносили в колонку, содержащую Anti FLAG M2 (фирма Sigma). После отмывки колонку элюировали, используя FLAG-пептид в концентрации 0,1 мг/мл (фирма Sigma). Фракцию, содержащую GPC3 ERY2, вносили в колонку HisTrap HP (фирма GE Healthcare). После отмывки колонку элюировали с использованием концентрационного градиента имидазола. Фракцию, содержащую GPC3 ERY2, концентрировали ультрафильтрацией и затем концентрат вносили в колонку, заполненную Супердекс 200 (фирма GE Healthcare). Собирали только мономерную содержащую GPC3 ERY2 фракцию с получением очищенного GPC3 ERY2.

(4) Конструирование антитела к GPC3 с низким уровнем фукозы

Экспрессионный вектор для антитела к GPC3 (обозначено как гуманизированное антитело GC33 в WO 2006/006693) интродуцировали в клетки с «выключенным» геном ГДФ-фукозы линии CHO DXB11 (Cancer Sci. 101(10), 2010, сс.2227-2233) путем электропорации. После серийного разведения клетки культивировали в присутствии 0,5 мг/мл генетицина для отбора устойчивых к лекарственному средству линий, и получали клеточные линии, экспрессирующие антитело GPC3 с низким уровнем фукозы. Из супернатанта культуры, полученного при культивировании этих клеток, получали содержащую антитело фракцию путем общепринятой очистки посредством аффинной хроматографии с использованием колонки Nitrap®, заполненной белком А (фирма Pharmacia). Затем содержащую антитело фракцию очищали с помощью гель-фильтрации с использованием Супердекс 20026/60 (фирма Pharmacia). Из элюата собирали мономерную фракцию с получением антитела к GPC3 с низким уровнем фукозы.

(5) Анализ цитотоксичности с использованием моноклеарных клеток периферической крови человека

(5-1) Получение суспензии моноклеарных клеток периферической крови человека (PBMC)

Получали образцы по 50 мл периферической крови здоровых добровольцев (взрослых) с использованием шприцев, предварительно заполненных 100 мкл (1000 ед./мл) раствора гепарина (Novo-Heparin 5000 ед. на инъекцию; фирма Novo Nordisk). Периферическую кровь двукратно разводили 3ФР(-), разделяли на четыре одинаковые аликвоты и добавляли в пробирки для разделения лимфоцитов Leucosep (каталожный

№227290; система Greiner bio-one), в которые предварительно инъецировали 15 мл фиколл-пак PLUS и центрифугировали. После центрифугирования пробирок для разделения (2150 об/мин, 10 мин, комнатная температура) собирали слой фракции моноклеарных клеток. Клетки во фракции моноклеарных клеток однократно отмывали с использованием модифицированной по методу Дульбекко среды Игла (фирма SIGMA), содержащей 10% FBS (далее в контексте настоящего описания обозначена как 10% FBS/D-MEM), а затем плотность клеток доводили до 4×10^6 клеток/мл с помощью 10% FBS/D-MEM. Полученную таким образом клеточную суспензию применяли в качестве суспензии человеческих РВМС в последующих экспериментах.

(5-2) Анализ цитотоксической активности

Цитотоксическую активность оценивали на основе степени ингибирования клеточного роста с помощью анализатора клеток в реальном времени xCELLigence (фирма Roche Diagnostics). Применяемые клетки-мишени представляли собой клеточную линию SK-pc13a, созданную на основе клеточной линии SK-HEP-1, в которой усилили экспрессию человеческого GPC3. Клетки SK-pc13a отделяли от чашек и высевали в планшеты E-Plate 96 (фирма Roche Diagnostics) из расчета 1×10^4 клеток/лунку (100 мкл/лунку). Затем начинали анализ жизнеспособных клеток с помощью анализатора клеток в реальном времени xCELLigence. На следующий день планшеты удаляли из анализатора клеток в реальном времени xCELLigence и в планшеты добавляли по 50 мкл каждого полученного антитела в различных концентрациях (0,004, 0,04, 0,4 и 4 нМ). После осуществления реакции в течение 15 мин при комнатной температуре добавляли 50 мкл суспензии человеческих РВМС (2×10^5 клеток/лунку), полученной согласно методу, описанному в разделе (5-1). Клетки вновь помещали в анализатор клеток в реальном времени xCELLigence для начала анализа жизнеспособных клеток. Реакцию проводили в атмосфере 5% газообразного диоксида азота при 37°C. Степень ингибирования роста клеток (%) определяли с помощью приведенной ниже формулы с использованием величины клеточного индекса, определенной через 72 ч после добавления человеческих РВМС. Применяемую для расчета величину клеточного индекса стандартизовали таким образом, что величину клеточного индекса, определенную непосредственно перед добавлением антитела, принимали за 1.

$$\text{Степень ингибирования роста клеток (\%)} = (A - B) \times 100 / (A - 1)$$

А обозначает среднюю величину клеточного индекса в лунке без антитела (только клетка-мишень и человеческие РВМС), а Б обозначает среднюю величину клеточного индекса в каждой лунке. Измерение осуществляли в трех повторностях.

Цитотоксическую активность GPC3 BiTE, GPC3 ERY2 и антитела к GPC3 IgG-типа оценивали с использованием полученных из человеческой крови РВМС (моноклеарные клетки периферической крови) в качестве эффекторных клеток. У GPC3 BiTE обнаружена очень сильная активность (фиг.1). Эта активность существенно превышала активность антитела к GPC3 с низким уровнем фукозы. Таким образом, GPC3 BiTE может служить в качестве эффективного терапевтического агента, превышающего по своей активности антитело IgG-типа. С другой стороны, активность GPC3 ERY2 была не столь сильной, как у GPC3 BiTE, хотя она тоже превышала активность антитела к GPC3 IgG-типа. Это позволяет предположить, что добавление только Fc в BiTE не приводит к созданию требуемой молекулы.

Пример 2. Конструирование и оценка GPC3 ERY5, GPC3 ERY6 и GPC3 ERY7

Далее с целью улучшения специфической активности домен, связывающий раковый агент (GPC3), превращали в двухвалентный для повышения активности связывания с

раковой клеткой. К GPC3 ERY2 добавляли другой анти-GPC3 scFv, создавая GPC3 ERY5 (фиг.17Г). Кроме того, вместо scFv добавляли GPC3-связывающий домен Fab-типа, создавая GPC3 ERY7 (фиг.17Е). Кроме того, конструировали также GPC3 ERY6 (фиг.17Д), в котором scFv к эпсилон-цепи CD3 GPC3 ERY5 расщепляли на два плеча.

Конкретно, для получения серий экспрессионных векторов, в которые встраивали полинуклеотид, кодирующий GPC3 ERY5_Hh, GPC3 ERY6_Hk, GPC3 ERY6_Hh, GPC3 ERY7_Hh или GPC3 ERY7_L, применяли известный специалистам в данной области метод, такой как ПЦР с использованием праймеров, содержащих такие же соответствующие дополнительные последовательности, что и в описанном выше методе.

Для кратковременной экспрессии каждой сконструированной молекулы в клетки FreeStyle293-F интродуцировали следующие комбинации экспрессионных векторов:

А. Сконструированная молекула: GPC3 ERY5

Полипептиды, кодируемые полинуклеотидами, встроенными в экспрессионные векторы: GPC3 ERY5_Hh (SEQ ID NO:36; зрелая последовательность, которая не содержит 19 аминокислот на аминоконце, служащих в качестве сигнальной последовательности) и GPC3 ERY2_Hk.

Б. Сконструированная молекула: GPC3 ERY6

Полипептиды, кодируемые полинуклеотидами, встроенными в экспрессионные векторы: GPC3 ERY6_Hk (SEQ ID NO:37; зрелая последовательность, которая не содержит 19 аминокислот на аминоконце, служащих в качестве сигнальной последовательности) и GPC3 ERY6_Hh (SEQ ID NO:38; зрелая последовательность, которая не содержит 19 аминокислот на аминоконце, служащих в качестве сигнальной последовательности).

В. Сконструированная молекула: GPC3 ERY7

Полипептиды, кодируемые полинуклеотидами, встроенными в экспрессионные векторы: GPC3 ERY7_Hh (SEQ ID NO:39; зрелая последовательность, которая не содержит 19 аминокислот на аминоконце, служащих в качестве сигнальной последовательности), GPC3 ERY7_L (SEQ ID NO:40; зрелая последовательность, которая не содержит 19 аминокислот на аминоконце, служащих в качестве сигнальной последовательности) и GPC3 ERY2_Hk.

Полученный супернатант культуры вносили в колонку Anti FLAG M2 (фирма Sigma). После отмывки колонку элюировали FLAG-пептидом в концентрации 0,1 мг/мл (фирма Sigma). Фракцию, содержащую созданную молекулу, вносили в колонку HisTrap HP (фирма GE Healthcare). После отмывки колонку элюировали концентрационным градиентом имидазола. Фракцию, содержащую созданную молекулу, концентрировали путем ультрафильтрации. Затем фракцию вносили в колонку Супердекс 200 (фирма GE Healthcare). Из элюата собирали только мономерную фракцию, получая каждую очищенную созданную молекулу.

Эти полипептидные комплексы сравнивали с GPC3 ViTE с точки зрения цитотоксической активности. В результате продемонстрировано, что цитотоксическая активность этих полипептидных комплексов оказалась не столь высокой, как у GPC3 ViTE (фиг.2-4). Этот результат позволяет предположить, что добавление Fc к структуре ViTE или имитирующей указанную конструкцию структуре и наличие конфигурация, которая позволяет осуществлять двухвалентное связывание с раковым антигеном, не приводит к созданию требуемой молекулы.

Пример 3. Конструирование и оценка GPC3 ERY8-2, GPC3 ERY9-1 и GPC3 ERY10-1

(1) Конструирование GPC3 ERY8-2, GPC3 ERY9-1 и GPC3 ERY10-1

Далее создавали молекулы, не имеющие структуру ViTE, но обладающие требуемой

активностью. В качестве основы применяли IgG к раковому антигену (GPC3) и создавали молекулу, в которой к этому каркасу добавляли scFv к эпсилон-цепи CD3. Fc IgG, применяемый в качестве каркаса, как и в описанных выше случаях, представлял собой молчащий Fc с пониженной активностью связывания с FcγR (Fcγ-рецептор).

- 5 Конструировали GPC3 ERY8-2 (фиг.17Ж), GPC3 ERY10-1 (фиг.17И) и GPC3 ERY9-1 (фиг.17З), в которых scFv к эпсилон-цепи CD3 присоединяли к N-концу H-цепи, C-концу H-цепи и C-концу L-цепи антитела к GPC3 IgG-типа соответственно.

- Конкретно, применяли известный специалистам в данной области метод, такой как ПЦР с использованием праймеров, содержащих такие же соответствующие
10 дополнительные последовательности, что и в описанном выше методе, для получения серий экспрессионных векторов, в которые встраивали полинуклеотид, кодирующий GPC3 ERY8-2_Hk (SEQ ID NO:41; зрелая последовательность, которая не содержит 19 аминокислот на аминоконце, служащих в качестве сигнальной последовательности), GPC3 ERY8-2_Hh (SEQ ID NO:42; зрелая последовательность, которая не содержит 19
15 аминокислот на аминоконце, служащих в качестве сигнальной последовательности), GPC3 ERY9-1_H (SEQ ID NO:43; зрелая последовательность, которая не содержит 19 аминокислот на аминоконце, служащих в качестве сигнальной последовательности), GPC3 ERY9-1_L-His (SEQ ID NO:44; зрелая последовательность, которая не содержит 19 аминокислот на аминоконце, служащих в качестве сигнальной последовательности),
20 GPC3 ERY9-1_L-FLAG (SEQ ID NO:45; зрелая последовательность, которая не содержит 19 аминокислот на аминоконце, служащих в качестве сигнальной последовательности) или GPC3 ERY10-1_Hh (SEQ ID NO:46; зрелая последовательность, которая не содержит 19 аминокислот на аминоконце, служащих в качестве сигнальной последовательности).

- Для кратковременной экспрессии каждой созданной молекулы в клетки FreeStyle293-F
25 интродуцировали следующие комбинации экспрессионных векторов.

Г. Сконструированная молекула: GPC3 ERY8-2

- Полипептиды, кодируемые полинуклеотидами, встроенными в экспрессионные векторы: GPC3 ERY8-2_Hk (SEQ ID NO:41; зрелая последовательность, которая не содержит 19 аминокислот на аминоконце, служащих в качестве сигнальной
30 последовательности), GPC3 ERY8-2_Hh (SEQ ID NO:42; зрелая последовательность, которая не содержит 19 аминокислот на аминоконце, служащих в качестве сигнальной последовательности) и GPC3 ERY7_L.

Д. Сконструированная молекула: GPC3 ERY9-1

- Полипептиды, кодируемые полинуклеотидами, встроенными в экспрессионные
35 векторы: GPC3 ERY9-1_H (SEQ ID NO:43; зрелая последовательность, которая не содержит 19 аминокислот на аминоконце, служащих в качестве сигнальной последовательности), GPC3 ERY9-1_L-His (SEQ ID NO:44; зрелая последовательность, которая не содержит 19 аминокислот на аминоконце, служащих в качестве сигнальной последовательности) и GPC3 ERY9-1_L-FLAG (SEQ ID NO:45; зрелая последовательность,
40 которая не содержит 19 аминокислот на аминоконце, служащих в качестве сигнальной последовательности).

Е. Сконструированная молекула: GPC3 ERY10-1

- Полипептиды, кодируемые полинуклеотидами, встроенными в экспрессионные векторы: GPC3 ERY10-1_Hh (SEQ ID NO:46; зрелая последовательность, которая не
45 содержит 19 аминокислот на аминоконце, служащих в качестве сигнальной последовательности) и GPC3 ERY8-2_Hk, GPC3 ERY7_L.

Полученный супернатант культуры вносили в колонку Anti FLAG M2 (фирма Sigma). После отмывки колонку элюировали FLAG-пептидом в концентрации 0,1 мг/мл (фирма

Sigma). Фракцию, содержащую созданную молекулу, вносили в колонку HisTrap HP (фирма GE Healthcare). После отмывки колонку элюировали концентрационным градиентом имидазола. Фракцию, содержащую созданную молекулу, концентрировали путем ультрафильтрации. Затем фракцию вносили в колонку Супердекс 200 (фирма GE Healthcare). Из элюата собирали только мономерную фракцию, получая каждую очищенную созданную молекулу.

Эти молекулы оценивали в отношении цитотоксической активности *in vitro*. Результат свидетельствует о том, что все молекулы обладали цитотоксической активностью, сопоставимой или более высокой по сравнению с активностью GPC3 BiTE (фиг.5). В частности, установлено, что GPC3 ERY9-1 и GPC3 ERY10-1 обладали выражением более высокой цитотоксической активностью, чем GPC3 BiTE. В настоящем изобретении впервые продемонстрировано, что молекулы, созданные путем добавления scFv к эпсилон-цепи CD3 к IgG к раковому антигену, обладали цитотоксической активностью, сопоставимой или более высокой, чем у BiTE. В частности, при создании изобретения неожиданно было установлено, что такие молекулы, как GPC3 ERY9-1 и GPC3 ERY10-1, обладали выражением более высокой цитотоксической активностью по сравнению с BiTE, несмотря на большое расстояние между их связывающим раковый антиген доменом и связывающим доменом эпсилон-цепи CD3.

(2) Оценка эффективности *in vivo* GPC3 ERY8-2 и GPC3 ERY10-1:

Определяли эффективность *in vivo* GPC3 ERY8-2 и GPC3 ERY10-1, для которых продемонстрировано наличие цитотоксической активности, сопоставимой или более высокой по сравнению с GPC3 BiTE при оценке с использованием анализа *in vitro*, описанного в разделе (1). Экспрессирующие GPC3 клетки клеточной линии человеческого рака легкого PC-10 смешивали с человеческими PBMC, а затем трансплантировали мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом линии NOD. Мышей обрабатывали путем введения GPC3 ERY8-2 или GPC3 ERY10-1 (что обозначали как «pre-mix» модель).

В частности, оценку эффективности GPC3 ERY8-2 на «pre-mix» модели с использованием PC-10 осуществляли следующим образом. PBMC выделяли из крови здоровых доноров. NK-клетки выделяли из PBMC с помощью микрогранул CD56 MicroBeads, предназначенных для разделения человеческой крови (фирма MCAS Miltenyi biotec). Смешивали клеточную линию человеческой плоскоклеточной карциномы легкого PC-10 (фирма Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.) (5×10^6 клеток), человеческие PBMC без NK-клеток ($4,5 \times 10^6$ клеток) и (искусственную) базальную мембрану Матригель Матрикс (фирма BD) и затем трансплантировали подкожно в паховую область мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом линии NOD (фирма CLEA Japan Inc.; самки возрастом 7 недель). День трансплантации обозначали как день 0. За 1 день до трансплантации мышам внутрибрюшинно вводили антитело к асиалоганглиозиду M1 (асиало-GM1) (фирма Wako Pure Chemical Industries) из расчета 0,2 мг/особь. Через 2 ч после трансплантации вводили внутрибрюшинно GPC ERY8-2 из расчета 30 мкг/особь. GPC ERY8-2 вводили в целом пять раз в течение периода времени с 0 по 4 день.

Кроме того, оценку эффективности GPC3 ERY10-1 на «pre-mix» модели с использованием PC-10 осуществляли следующим образом. PBMC выделяли из крови здоровых доноров. NK-клетки выделяли из PBMC с помощью микрогранул CD56 MicroBeads, предназначенных для разделения человеческой крови (фирма MCAS Miltenyi biotec). Смешивали клеточную линию человеческой плоскоклеточной карциномы

легкого PC-10 (фирма Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.) (5×10^6 клеток), человеческие PBMC без NK-клеток ($4,5 \times 10^6$ клеток) и базальную мембрану Матригель Матрикс (фирма BD) и затем трансплантировали подкожно в паховую область мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом линии NOD (фирма CLEA Japan Inc.; самки 5
возрастом 7 недель). День трансплантации обозначали как день 0. За 1 день до трансплантации мышам внутрибрюшинно вводили антитело к асиало-GM1 (фирма Wako Pure Chemical Industries) из расчета 0,2 мг/особь. Через 2 ч после трансплантации вводили внутрибрюшинно GPC ERY10-1 из расчета 30 мкг/особь. GPC ERY10-1 вводили 10
в целом 13 раз в течение периодов времени с 0 по 4 день, с 7 по 11 день и с 14 по 16 день.

Результат демонстрирует, что в группах, которых обрабатывали GPC3 ERY8-2 и GPC3 ERY10-1, рост опухолей выражение подавлялся по сравнению с группой, обработанной растворителем (ЗФР) (фиг.6 и 7).

Кроме того, эффективность *in vivo* GPC3 ERY10-1 оценивали также с использованием 15
альтернативной модели. В частности, выращивали Т-клетки путем культивирования человеческих PBMC *in vitro* и затем интродуцировали мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом линии NOD, которые имели развитые опухоли, образовавшиеся после трансплантации PC-10. Мышей обрабатывали путем введения GPC3 ERY10-1 (обозначена как модель Т-клеточного переноса).

В частности, оценку эффективности GPC3 ERY10-1 на основе модели Т-клеточного 20
переноса с использованием клеточной линии PC-10, осуществляли следующим образом. Осуществляли культуральную экспансию Т-клеток с использованием набора для активации/экспансии человеческих клеток (фирма MACS Miltenyi biotec) и PBMC, выделенных из крови здоровых добровольцев. Клеточную линию человеческой 25
плоскоклеточной карциномы легкого PC-10 (фирма Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.) (1×10^7 клеток) смешивали с базальной мембраной Матригель Матрикс (фирма BD) и затем трансплантировали подкожно в паховую область мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом линии NOD (фирма CLEA Japan Inc.; самки 30
возрастом 7 недель). День трансплантации обозначали как день 0. За 1 день до трансплантации и в дни 6, 8, 12, 16 и 20 мышам внутрибрюшинно вводили антитело к асиало-GM1 (фирма Wako Pure Chemical Industries) из расчета 0,2 мг/особь. В день 6 после трансплантации мышей группировали по размеру опухоли и весу тела, а затем трансплантировали Т-клетки, полученные путем культуральной экспансии, как описано 35
выше, из расчета 1×10^7 клеток/особь в брюшную полость. Через 2 ч после трансплантации вводили внутрибрюшинно GPC ERY10-1 из расчета 30 мкг/особь. GPC ERY10-1 вводили в общей сложности 5 раз в дни 7, 8, 12, 16 и 17.

Результат свидетельствует о том, что при использовании указанной модели в группе, которую обрабатывали GPC3 ERY10-1, также имело место выраженное 40
противоопухолевое действие по сравнению с группой, обработанной растворителем (ЗФР) (фиг.8).

Описанные выше данные демонстрируют, что серии молекул, в которых к IgG-каркасу, имеющему молчащий Fc, добавлен один scFv антитела к эпислон-цепи CD3, обладают выраженным противоопухолевым действием *in vivo*.

(3) Оценка удерживания (ретенции) в плазме

Для решения вопроса о том, обладают ли такие молекулы, как GPC3 ERY8-2, GPC3 45
ERY9-1 и GPC3 ERY10-1, существенно более продолжительным временем полужизни в плазме по сравнению с GPC3 BiTE, вводили GPC3 ERY9-1 и GPC3 ERY10-1 из расчета 30 мкг/особь мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом линии NOD,

которым не были трансплантированы раковые клетки, и в течение времени определяли их концентрации в плазме.

В частности, осуществляли фармакокинетический (ФК) анализ следующим образом. GPC3 ERY9-1 и GPC3 ERY10-1 вводили внутривенно мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом линии NOD NOD (фирма CLEA Japan Inc.; самки возрастом 8 недель) из расчета 30 мкг/особь. Собирали образцы крови из щечной вены мышей с использованием гематокритного капилляра (фирма Terumo) через 15 мин, 2 ч, 1 день, 2 дня и 7 дней после введения. Из крови получали плазму.

GPC3 ERY9-1 и GPC3 ERY10-1 разводили соответствующим образом и добавляли к экспрессирующим GPC3 клеткам линии Ba/F3 (GPC3/BaF) или экспрессирующим эпсилон-цепь человеческого CD3 клеткам линии Ba/F3 (CD3/BaF), давая прореагировать GPC3 ERY9-1 или GPC3 ERY10-1 с GPC3/BaF и CD3/BaF. После отмывки указанных клеток добавляли для дополнительного взаимодействия меченное ФИТЦ вторичное антитело. После отмывки указанных клеток оценивали интенсивность флуоресценции метки на клетках с помощью проточного цитометра Epics XL (фирма Beckman Coulter), получая калибровочную кривую для каждого антитела.

В течение определенного промежутка времени собирали образцы крови мышей, которые были обработаны GPC3 ERY9-1 или GPC3 ERY10-1. Из крови получали плазму и соответствующим образом разводили. С помощью метода, аналогичного описанному выше, который применяли для получения калибровочных кривых, образцы плазмы подвергали взаимодействию с GPC3/BaF или CD3/BaF, определяя количество GPC3 ERY9-1 и GPC3 ERY10-1 в плазме, связанных с каждой клеткой. На основе измеренных величин рассчитывали концентрацию каждого антитела в плазме и строили калибровочные кривые согласно описанному выше методу.

Результат свидетельствует о том, что концентрация как GPC3 ERY9-1, так и GPC3 ERY10-1, в крови сохранялась на уровне, превышающем 10 нМ, через 2 дня после введения (фиг.9 и 10). Эти данные свидетельствуют о том, что такие молекулы, как GPC3 ERY9-1 и GPC3 ERY10-1, обладают значительно более продолжительным временем полужизни в плазме по сравнению с BiTE.

(4) Воздействие молчащего Fc на независимую от ракового антигена индукцию цитокинов

(4-1) Конструирование GPC3 ERY15-L имеющего FcγR-связывающий Fc

Для решения вопроса о том, могут ли молекулы, такие как GPC3 ERY8-2, GPC3 ERY9-1 и GPC3 ERY10-1, вызывать независимую от ракового антигена индукцию цитокинов, конструировали GPC3 ERY15-1, имеющий FcγR-связывающий Fc (фиг.17К).

В частности, аналогично описанному выше методу, применяли ПЦР с использованием праймеров, содержащих соответствующие дополнительные последовательности, и метод, хорошо известный специалистам в данной области, такой как метод с использованием набора для сайтнаправленного мутагенеза QuikChange Site-Directed Mutagenesis (фирма Stratagene), для создания экспрессионных векторов, в которые встроен полинуклеотид, кодирующий GPC3 ERY15-1_Hh (SEQ ID NO:47; зрелая последовательность, которая не содержит на аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности) или GPC3 ERY15-1_Hk (SEQ ID NO:48; зрелая последовательность, которая не содержит на аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности).

Экспрессионные векторы для GPC3 ERY15-1_Hh (SEQ ID NO:47; зрелая последовательность, которая не содержит 19 аминокислот на аминоконце, служащих в качестве сигнальной последовательности), GPC3 ERY15-1_Hk (SEQ ID NO:48; зрелая

последовательность, которая не содержит 19 аминокислот на аминоконце, служащих в качестве сигнальной последовательности) и GPC3 ERY7_L совместно интродуцировали в клетки FreeStyle293-F для кратковременной экспрессии GPC3 ERY15-1. Полученный супернатант культуры вносили в колонку Anti FLAG M2 (фирма Sigma). После отмывки колонку элюировали FLAG-пептидом в концентрации 0,1 мг/мл (фирма Sigma). Фракцию, содержащую GPC3 ERY15-1, вносили в колонку HisTrap HP (фирма GE Healthcare). После отмывки колонку элюировали концентрационным градиентом имидазола. Фракцию, содержащую созданную молекулу, концентрировали путем ультрафильтрации. Затем фракцию, содержащую GPC3 ERY15-1, вносили в колонку Супердекс 200 (фирма GE Healthcare). Из элюата собирали только мономерную фракцию GPC3 ERY15-1, получая очищенную молекулу GPC3 ERY15-1.

(4-2) Анализ способности вызывать независимую от ракового антигена индукцию цитокинов

Способность GPC3 ERY15-1 вызывать независимую от ракового антигена индукцию цитокинов сравнивали со способностью GPC3 BiTE, GPC3 ERY9-1, GPC3 ERY10-1 и катумаксомаба. С помощью описанного выше метода получали PBMC из крови здоровых добровольцев. По 50 мкл каждого антитела, концентрацию которого доводили до 40 нМ, добавляли к 50 мкл суспензии человеческих PBMC (2×10^5 клеток/лунку), а затем к ним добавляли по 100 мкл 10% FBS/D-MEM. Реакционную смесь инкубировали в атмосфере, содержащей 5% газообразного диоксида азота, при 37°C. После инкубации в течение 72 ч собирали супернатант культуры и количественно оценивали цитокины, которые секретиrowались в супернатант культуры, на основе технологии Cytometric Beads Array (CBA)) с использованием набора человеческих Th1/Th2/Th17 (фирма BD). Анализ осуществляли в трех повторностях с помощью метода, указанного в прилагаемом протоколе.

Установлено, что GPC3 ERY15-1 и катумаксомаб, которые имеют FcγR-связывающий Fc, обладали выраженной способностью индуцировать цитокины. В противоположность этому, у антитела GPC3 BiTE, у которого отсутствовал Fc, и у GPC3 ERY9-1 и GPC3 ERY10-1, которые несли молчащий Fc, способность индуцировать цитокины не была обнаружена (фиг.11). Этот результат позволяет предположить, что молекулы, которые имеют молчащий Fc, такие как GPC3 ERY8-2, GPC3 ERY9-1 и GPC3 ERY10-1, представляют собой отличающиеся высокой безопасностью молекулы, которые не обладают способностью индуцировать цитокины независимым от ракового антигена образом.

Пример 4. Конструирование и оценка GPC3 ERY18 L1, L2, L3, L4 и S1

Оценивали молекулы, имеющие CD3-связывающий домен, отличный по структуре от scFv. Конструировали GPC3 ERY18 (Fig.17Л), в котором VH- и VL-домены антитела к CD3 были соединены с С-концами двух Н-цепей IgG к раковому антигену GPC3. С помощью такого конструирования создавали серии молекул (GPC3 ERY18 L1, L2, L3 и L4), которые имели в области стыка 1-4 линкерных единицы (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser). Одновременно конструировали другую молекулу (GPC3 ERY18 S1), в которой аминокислоты в соответствующих положениях были заменены на Cys, что позволяло интродуцировать дисульфидный мостик.

С частности, осуществляли метод, известный в данной области, такой как ПЦР с использованием праймеров, содержащих, как и в описанном выше методе, соответствующие дополнительные последовательности, для создания серий экспрессионных векторов, в которые встраивали полинуклеотид, кодирующий GPC3 ERY18 L1_Hh (SEQ ID NO:49; зрелая последовательность, которая не содержит на

в качестве сигнальной последовательности), GPC3 ERY18 S1_Hk (SEQ ID NO:58; зрелая последовательность, которая не содержит на аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности) и GPC3 ERY7 L.

Полученный супернатант культуры вносили в колонку Anti FLAG M2 (фирма Sigma).
 5 После отмывки колонку элюировали FLAG-пептидом в концентрации 0,1 мг/мл (фирма Sigma). Фракцию, содержащую созданную молекулу, вносили в колонку HisTrap HP (фирма GE Healthcare). После отмывки колонку элюировали концентрационным градиентом имидазола. Фракцию, содержащую созданную молекулу, концентрировали путем ультрафильтрации. Затем фракцию вносили в колонку Супердекс 200 (фирма GE
 10 Healthcare). Из элюата собирали только мономерную фракцию, получая каждую очищенную созданную молекулу.

Для каждой из молекул GPC3 ERY18 L1, GPC3 ERY18L2, GPC3 ERY18L3, GPC3 ERY18L4 и GPC3 ERY18S1 оценивали *in vitro* цитотоксическую активность (фиг.12 и 13). Результат свидетельствует о том, что все молекулы за исключением GPC3 ERY18
 15 L1 имели активность, сопоставимую с активностью GPC3 ERY10-1. Этот результат демонстрирует, что молекулы, которые имеют структуру, отличную от структуры scFv, обладают сопоставимой цитотоксической активностью. Структура, в которой и VH- и VL-домены антитела к CD3 сцеплены с С-концами двух Н-цепей IgG к раковому антигену (GPC3), вероятно, принимает участие в стабилизации полипептидных комплексов,
 20 предлагаемых в настоящем изобретении.

Пример 5. Конструирование и оценка GPC3 ERY19-3

Затем исследовали молекулы, имеющие Fab-подобный CD3-связывающий домен. Конструировали GPC3 ERY19-3 (фиг.17М), в котором VH- и CH1-домены и VL- и CL-домены антитела к CD3 все были связаны с С-концами двух Н-цепей антитела к
 25 противораковому антигену (GPC3) IgG-типа. В частности, осуществляли метод, известный в данной области, такой как ПЦР с использованием праймеров, содержащих, как и в описанном выше методе, соответствующие дополнительные последовательности, создавая экспрессионные векторы, в которые встраивали полинуклеотид, кодирующий GPC3 ERY19-3_Hh (SEQ ID NO:59; зрелая последовательность, которая не содержит на
 30 аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности) или GPC3 ERY19-3_Hk (SEQ ID NO:60; зрелая последовательность, которая не содержит на аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности).

Экспрессионные векторы для GPC3 ERY19-3_Hh (SEQ ID NO:59; зрелая последовательность, которая не содержит на аминоконце 19 аминокислот, служащих
 35 в качестве сигнальной последовательности), GPC3 ERY19-3_Hk (SEQ ID NO:60; зрелая последовательность, которая не содержит на аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности) и GPC3 ERY7_L совместно интродуцировали в клетки FreeStyle293-F для кратковременной экспрессии GPC3 ERY19-3. Полученный супернатант культуры вносили в колонку с рекомбинантным белком A HiTrap rProtein A FF (фирма GE Healthcare). После отмывки колонку элюировали кислотой. Фракцию,
 40 содержащую GPC3 ERY19-3, концентрировали путем ультрафильтрации и затем вносили в колонку Супердекс 200 (фирма GE Healthcare). Из элюата собирали только мономерную фракцию GPC3 ERY19-3, получая очищенную молекулу GPC3 ERY19-3.

Оценивали цитотоксическую активность молекулы GPC3 ERY19-3 *in vitro*. Результат
 45 продемонстрировал, что молекула обладала активностью, сопоставимой с активностью GPC3 BiTE (фиг.14). CD3-связывающий домен с Fab-подобной структурой, по-видимому, принимает участие в стабилизации молекул полипептидных комплексов, предлагаемых в настоящем изобретении.

Пример 6. Получение полипептидных комплексов с использованием только стадии очистки на белке А путем интродукции мутации в CH3-домен GPC3 ERY 10-1

(1) Основные принципы

В GPC3 ERY10-1, полученном согласно методу, описанному в примере 3, CH3-домен имеет структуру типа «выступ-впадина». Требуемую молекулу GPC3 ERY 10-1, в которой две Н-цепи гетеромерно ассоциированы, очищали с помощью двух типов очистки на основе аффинности с использованием His-метки и FLAG-метки, присоединенных к С-концу каждой Н-цепи. Если молекулу GPC3 ERY 10-1 получают в качестве фармацевтического агента, то сначала осуществляют хроматографию на белке А супернатанта культуры экспрессирующих GPC3 ERY10-1 клеток для очистки полипептидного комплекса, имеющего Fc-домен. За этой стадией следует дополнительная стадия хроматографической очистки с использованием аффинной хроматографии на основе His-метки и аффинной хроматографии на основе FLAG-метки. Это повышает стоимость процесса очистки. Таким образом, в приведенном ниже примере исследовали молекулярные модификации, которые позволяют очищать требуемую молекулу GPC3 ERY10-1, имеющую две гетеромерно ассоциированные Н-цепи, с помощью только хроматографии на белке А без использования His-метки и FLAG-метки.

В частности, исследовали модификации, приводящие к элиминации связывания белка А в одной из двух Н-цепей. В результате таких модификаций, при которых имела место гомомерная ассоциация не связывающих белок А Н-цепей, молекула не могла связываться с белком А и поэтому проходила через колонку с белком А при хроматографии. С другой стороны, молекулу в которой имела место гетеромерная ассоциация не связывающей белок А Н-цепи со связывающей белок А Н-цепью, и молекулу, в которой имела место гомомерная ассоциация связывающих белок А Н-цепей, можно разделять с помощью хроматографии на белке А на основе различий в аффинности к белку А. Однако в Fc-домене антитела сайт связывания белка А перекрывается с сайтом связывания FcRn, что имеет решающее значение для времени удерживания антитела в плазме. Таким образом, необходимо избирательно снижать только активность связывания с белком А, поддерживая при этом активность связывания с FcRn. В качестве такой модификации была выявлена замена His в положении 435 (EU-нумерация) на Arg. Комбинацию указанной мутации с мутациями, описанными в WO 2006/106905 (замена Asp в положении 356 (EU-нумерация) в одной из Н-цепей на Lys и Lys в положении 439 (EU-нумерация) в другой Н-цепи на Glu), которые усиливают гетеромерную ассоциацию двух Н-цепей, оценивали в отношении того, может ли это облегчать очистку полипептидных комплексов, таких как GPC3 ERY10-1, с использованием только хроматографии на белке А.

(2) Конструирование экспрессионных векторов, несущих гены антитела, и экспрессия соответствующих антител

Для получения вариабельной области Н-цепи антитела конструировали ген, кодирующий GC33(2)H (вариабельная область Н-цепи антитела к человеческому глипикану, SEQ ID NO:61; зрелая последовательность, которая не содержит на аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности), с помощью метода, известного специалистам в данной области. Аналогично этому, для получения L-цепи антитела конструировали ген, кодирующий GC33-k0 (L-цепь антитела к человеческому глипикану, SEQ ID NO:62; зрелая последовательность, которая не содержит на аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности), с помощью метода, известного специалистам в данной области.

Затем для получения константной области Н-цепи антитела конструировали описанные ниже гены с помощью метода, известного специалистам в данной области.

М. Сконструированная молекула: LALA-G1d

LALA-G1d (SEQ ID NO:63; зрелая последовательность, которая не содержит на
5 аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности), в которой Leu в положениях 234 и 235 (EU-нумерация) заменены на Ala, Asn в положении 297 заменен на Ala, а Gly и Lys на С-конце удалены из последовательности IgG1.

Н. Сконструированная молекула: LALA-G1d-CD3

LALA-G1d-CD3 (SEQ ID NO:64; зрелая последовательность, которая не содержит на
10 аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности), в которой CD3 scFv (вариабельная область Н-цепи антитела к человеческому CD3 и вариабельная область L-цепи антитела к человеческому CD3 соединены через полипептидный линкер) сцеплены с С-концом LALA-G1d (SEQ ID NO:63; зрелая последовательность, которая не содержит на аминоконце 19 аминокислот, служащих
15 в качестве сигнальной последовательности).

О. Сконструированная молекула: LALA-G3S3E-G1d

LALA-G3S3E-G1d (SEQ ID NO:65; зрелая последовательность, которая не содержит на аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности), в которой His в положении 435 (EU-нумерация) заменен на Arg и Lys в положении 439
20 (EU-нумерация) заменен на Glu в последовательности LALA-G1d (SEQ ID NO:63; зрелая последовательность, которая не содержит на аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности).

П. Сконструированная молекула: LALA-S3K-G1d-CD3

LALA-S3K-G1d-CD3 (SEQ ID NO:66; зрелая последовательность, которая не содержит
25 на аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности), в которой Asp в положении 356 (EU-нумерация) заменен на Lys в последовательности LALA-G1d-CD3 (SEQ ID NO:64; зрелая последовательность, которая не содержит на аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности).

Гены NTA1L и NTA1R Н-цепей антитела к человеческому GPC3 конструировали,
30 присоединяя LALA-G1d-CD3 или LALA-G1d по ходу транскрипции относительно GC33 (2)Н соответственно. А гены NTA2L и NTA2R Н-цепей антитела к человеческому GPC3 конструировали, присоединяя LALA-S3K-G1d-CD3 или LALA-G3S3E-G1d по ходу транскрипции относительно GC33(2)Н соответственно.

Экспрессионные векторы для NTA1L, NTA1R, NTA2L, NTA2R (Н-цепи) и GC33-k0
35 (L-цепь) конструировали, встраивая каждый ген в экспрессионный вектор, пригодный для клеток животных. Эти векторы объединяли согласно описанному ниже методу и интродуцировали в клетки FreeStyle293 (фирма Invitrogen) с помощью метода, известного специалистам в данной области, для кратковременной экспрессии полипептидных комплексов, описанных ниже. Как указано ниже, полипептидные комплексы обозначали
40 по названиям интродуцированных генов, объединенных в следующем порядке [первая Н-цепь/вторая Н-цепь/L-цепь].

NTA1L/NTA1R/GC33-k0

NTA2L/NTA2R/GC33-k0

(3) Очистка экспрессированных образцов и оценка их в отношении способности
45 образовывать гетеромерные комплексы

Клеточный супернатант FreeStyle293-клеток (обозначен далее как CM), содержащий указанный ниже полипептидный комплекс, применяли в качестве образца.

NTA1L/NTA1R/GC33-k0

NTA2L/NTA2R/GC33-k0

СМ фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм и вносили в колонку, заполненную rProtein A-Сефарозой Fast Flow (фирма GE Healthcare), уравновешенную с помощью D-3ФР. Стадии отмывки 1 и 2 и стадию элюции 1 осуществляли с использованием буферов, указанных в таблице 1. Вносимое количество СМ регулировали так, чтобы вносимое количество антитела составляло 20 мг/мл смолы. Элюированные фракции собирали и анализировали с помощью гель-фильтрации для идентификации компонентов во фракциях.

Таблица 1

Уравновешение	D-3ФР
Отмывка 1	1 мМ ацетат натрия, 150 мМ NaCl, pH 6,5
Отмывка 2	0,3 мМ HCl, 150 мМ NaCl, pH 3,7
Элюция 1	2 мМ HCl, pH 2,7

Результаты анализа методом гель-фильтрации каждой элюированной фракции представлены на фиг.15 и в таблице 2. Указанные величины представляют собой площадь элюированного пика в процентах. При экспрессии NTA1L/NTA1R/GC33-k0 или NTA2L/NTA2R/GC33-k0 гомомерное антитело к GPC3 (NTA1L/GC33-k0 or NTA2L/GC33-k0) практически не удалось обнаруживать в СМ. При этом, содержание гомомерного антитела к GPC3 (NTA2R/GC33-k0) в СМ составляло лишь примерно 2% при экспрессии NTA2L/NTA2R/GC33-k0, в то время как его содержание в СМ составляло примерно 76% при экспрессии NTA1L/NTA1R/GC33-k0. Этот результат демонстрирует, что, когда His в положении 435 (EU-нумерация) заменяют на Arg, и для обеспечения эффективного образования гетеромерной молекулы, содержащей соответствующие Н-цепи. Asp в положении 356 (EU-нумерация) в полипептидной последовательности одной из Н-цепей заменяют на Lys, а Lys в положении 439 (EU-нумерация) в полипептидной последовательности другой Н-цепи заменяют на Glu, то гетеромерные полипептидные комплексы, имеющие такую же молекулярную форму, что и GPC3 ERY10-1, можно эффективно очищать, достигая степени чистоты более 98%, только с помощью одной стадии очистки с использованием белка А.

Таблица 2

	Гомомерное антитело к CD3	Гетеромерное антитело	Гомомерное антитело к GPC3
NTA1L/NTA1R/GC33-k0	0,7	23,5	75,8
NTA2L/NTA2R/GC33-k0	-	98,2	1,8

Пример 7. Конструирование и оценка GPC3 ERY17-2 и GPC3 ERY17-3

(1) Конструирование GPC3 ERY17-2 и GPC3 ERY17-3

Затем, создавали молекулу путем использования IgG к противораковому антигену (GPC3) в качестве каркаса и замены одного из Fab на домен, связывающий эпсилон-цепь CD3. Также как и в описанных выше вариантах, Fc применяемого в качестве каркаса IgG представлял собой молчащий Fc с пониженной активностью связывания с FcγR (Fcγ-рецептор). Для доменов, связывающих эпсилон-цепь CD3, изменяли VH- и VL-домены Fab антитела к эпсилон-цепи CD3 для получения GPC3 ERY17-2 (фиг.19А), а CH1- и CL-домены изменяли для получения GPC3 ERY17-3 (фиг.19Б).

В частности, с помощью метода, хорошо известного специалистам в данной области, такого как ПЦР с использованием праймеров, содержащих такие же соответствующие дополнительные последовательности, что и в описанном выше методе, конструировали серии экспрессионных векторов, в которые был встроен полинуклеотид, кодирующий ERY17-2_Hh (SEQ ID NO:73; зрелая последовательность, которая не содержит на

аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности), ERY17-2_L (SEQ ID NO:74; зрелая последовательность, которая не содержит на аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности), ERY17-3_Hh (SEQ ID NO:75; зрелая последовательность, которая не содержит на

5 аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности) или ERY17-3_L (SEQ ID NO:76; зрелая последовательность, которая не содержит на аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности).

Для кратковременной экспрессии каждой созданной молекулы в клетки FreeStyle293-F интродуцировали следующие комбинации экспрессионных векторов.

10 Р. Сконструированная молекула: GPC3 ERY17-2

Полипептиды, кодируемые полинуклеотидами, встроенными в экспрессионные векторы: GPC3 ERY8-2_Hk, GPC3 ERY7_L, ERY17-2_Hh (SEQ ID NO:73; зрелая последовательность, которая не содержит на аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности) и ERY 17-2_L (SEQ ID NO:74; зрелая

15 последовательность, которая не содержит на аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности).

С. Сконструированная молекула: GPC3 ERY17-3

Полипептиды, кодируемые полинуклеотидами, встроенными в экспрессионные векторы: GPC3 ERY8-2_Hk, GPC3 ERY7_L, ERY17-3_Hh (SEQ ID NO:75; зрелая

20 последовательность, которая не содержит на аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности) и ERY 17-3_L (SEQ ID NO:76; зрелая последовательность, которая не содержит на аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности).

(2) Очистка GPC3 ERY 17-2 и GPC3 ERY 17-3

25 Полученный супернатант культуры вносили в колонку Anti FLAG M2 (фирма Sigma). После отмывки колонку элюировали FLAG-пептидом в концентрации 0,1 мг/мл (фирма Sigma). Фракцию, содержащую созданную молекулу, вносили в колонку HisTrap HP (фирма GE Healthcare). После отмывки колонку элюировали концентрационным градиентом имидазола. Фракцию, содержащую созданную молекулу, концентрировали

30 путем ультрафильтрации. Затем фракцию вносили в колонку Супердекс 200 (фирма GE Healthcare). Из элюата собирали только мономерную фракцию, получая каждую очищенную созданную молекулу.

(3) Цитотоксическая активность GPC3 ERY17-2 и GPC3 ERY17-3

Для GPC3 ERY17-2 и GPC3 ERY17-3 оценивали цитотоксическую активность *in vitro*

35 (фиг.20). Результат продемонстрировал, что обе молекулы обладали заметно более высокой цитотоксической активностью, чем GPC3 BiTE. Таким образом, в настоящем изобретении впервые продемонстрировано, что молекулы, в которых IgG к противораковому антигену применяли в виде каркаса и один из Fab заменяли на домен, связывающий эпсилон-цепь CD3, обладали цитотоксической активностью, сопоставимой

40 или более высокой, чем активность BiTE.

(4) Оценка эффективности GPC3 ERY17-2 на основе модели Т-клеточного переноса с использованием PC-10

Для GPC3 ERY17-2, для которого продемонстрировано наличие цитотоксической активности, сопоставимой или более высокой, чем активность GPC3 BiTE, в анализе *in vitro*,

45 *in vitro*, оценивали эффективность *in vivo* на основе модели Т-клеточного переноса с использованием клеток PC-10. В частности, оценку эффективности GPC3 ERY17-2 на основе модели Т-клеточного переноса с использованием клеток PC-10 осуществляли следующим образом. Осуществляли культуральную экспансию Т-клеток с

использованием набора для активации/экспансии человеческих клеток (фирма MACS Miltenyi biotec) и РВМС, выделенных из крови здоровых добровольцев. Клеточную линию человеческой плоскоклеточной карциномы легкого PC-10 (фирма Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.) (1×10^7 клеток) смешивали с базальной мембраной Матригель Матрикс (фирма BD) и затем трансплантировали подкожно в паховую область мышей с тяжелым комбинированным иммунодефицитом линии NOD (фирма CLEA Japan Inc.; самки возрастом 7 недель). День трансплантации обозначали как день 0. За 1 день до трансплантации и в дни 13, 17, 21 и 25 мышам вводили внутривенно антитело к асиало-GM1 (фирма Wako Pure Chemical Industries) из расчета 0,2 мг/особь. В день 13 после трансплантации мышей группировали по размеру опухоли и весу тела. В день 14 после трансплантации трансплантировали Т-клетки, полученные путем культуральной экспансии, как описано выше, из расчета 3×10^7 клеток/особь в брюшную полость. Через 2 ч после трансплантации вводили внутривенно GPC ERY17-2 из расчета 30 мкг/особь. GPC ERY10-1 вводили в целом 5 раз в дни 14, 15, 16, 17 и 18.

Результат продемонстрировал, что при использовании этой модели также имело место выраженное противораковое действие в группе, обработанной GPC3 ERY17-2, по сравнению с группой, обработанной растворителем (фиг.21).

Описанные выше данные продемонстрировали, что молекулы, в которых в качестве каркаса использован противораковый IgG и один из Fab заменен на домен, связывающий эпислон-цепь CD3, обладали выраженным противораковым действием *in vivo*.

Пример 8. Конструирование и оценка GPC3 ERY17-2-M20

(1) Конструирование GPC3 ERY17-2-M20

Далее конструировали молекулу, сохраняющую требуемую активность даже после изменений в домене, связывающем эпислон-цепь CD3. Создавали GPC3 ERY17-2-M20 (фиг.19А), в котором была изменена последовательность домена, связывающего эпислон-цепь CD3. В частности, с использованием в качестве матрицы экспрессионного вектора для антитела к CD3 (M20) с помощью метода, хорошо известного специалистам в данной области, такого как ПЦР с использованием праймеров, содержащих такие же соответствующие дополнительные последовательности, что и в описанном выше методе, получали серии экспрессионных векторов, в которые был встроен полинуклеотид, кодирующий ERY17-2-M20_Hh (SEQ ID NO:77; зрелая последовательность, которая не содержит на аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности) или ERY17-2-M20_L (SEQ ID NO:78; зрелая последовательность, которая не содержит на аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности).

(2) Очистка GPC3 ERY17-2-M20

Экспрессионные векторы для GPC3 ERY8-2_Hk, GPC3 ERY7_L, ERY17-2-M20_Hh (SEQ ID NO:77) и ERY17-2-M20_L (SEQ ID NO:78) совместно интродуцировали в клетки FreeStyle293-F для кратковременной экспрессии GPC3 ERY17-2-M20. Полученный супернатант культуры фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм, а затем вносили в уравновешенную колонку, упакованную rProtein A-Сефарозой Fast Flow (фирма GE Healthcare). Очищенный GPC3 ERY17-2-M20 получали после стадий отмывки 1 и 2 и стадии элюции 1 с использованием буферов, указанных в таблице 3.

Таблица 3	
Уравновешивание	Среда для экспрессии FreeStyle293 (фирма Invitrogen) 1% Pen Strep (фирма Invitrogen)
Отмывка 1	1 mM ацетат натрия, 150 mM NaCl, pH 6,5
Отмывка 2	0,3 mM HCl, 150 mM NaCl, pH 3,7

(3) Цитотоксическая активность GPC3 ERY17-2-M20

Оценивали цитотоксическую активность GPC3 ERY17-2-M20 *in vitro*, и было установлено, что цитотоксическая активность сопоставима с активностью GPC3 ERY17-2 (фиг.22). Эти данные демонстрируют, что даже молекулы с измененной последовательностью домена, связывающего эпсилон-цепь CD3, обладают сопоставимой цитотоксической активностью.

Пример 9. Конструирование и оценка ErCAM ERY17-2 и ErCAM ERY17-3

(1) Конструирование ErCAM ERY17-2 и ErCAM ERY17-3 Далее конструировали молекулы, мишенью которых являлся другой раковый антиген, но которые сохраняли требуемую активность. Получали ErCAM ERY17-2 (фиг.19А), в котором анти-GPC3 Fab в GPC3 ERY17-2 был заменен на анти-ErCAM Fab, и ErCAM ERY17-3 (фиг.19Б), в котором анти-GPC3 Fab в GPC3 ERY17-3 был заменен на анти-ErCAM Fab. В частности, с использованием в качестве матрицы экспрессионного вектора для антитела к ErCAM, с помощью метода, хорошо известного специалистам в данной области, такого как ПЦР с использованием праймеров, содержащих такие же соответствующие дополнительные последовательности, что и в описанном выше методе, конструировали серии экспрессионных векторов, в которые был встроен полинуклеотид, кодирующий ErCAM ERY17_Hk (SEQ ID NO:79; зрелая последовательность, которая не содержит на аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности) или ErCAM ERY17_L (SEQ ID NO:80; зрелая последовательность, которая не содержит на аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности).

Для кратковременной экспрессии каждой созданной молекулы в клетки FreeStyle293-F интродуцировали следующие комбинации экспрессионных векторов.

Т. Сконструированная молекула: ErCAM ERY17-2

Полипептиды, кодируемые полинуклеотидами, встроенными в экспрессионные векторы: ErCAM ERY17_Hk (SEQ ID NO:79; зрелая последовательность, которая не содержит на аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности), ErCAM ERY17_L (SEQ ID NO:80; зрелая последовательность, которая не содержит на аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности), ERY17-2_Hh и ERY17-2_L

У. Сконструированная молекула: ErCAM ERY17-3

Полипептиды, кодируемые полинуклеотидами, встроенными в экспрессионные векторы: ErCAM ERY17_Hk, ErCAM ERY17_L, ERY17-3_Hh и ERY17-3_L.

(2) Очистка ErCAM ERY17-2 и ErCAM ERY17-3

Полученный супернатант культуры вносили в колонку Anti FLAG M2 (фирма Sigma). После отмывки колонку элюировали FLAG-пептидом в концентрации 0,1 мг/мл (фирма Sigma). Фракцию, содержащую созданную молекулу, вносили в колонку HisTrap HP (фирма GE Healthcare). После отмывки колонку элюировали концентрационным градиентом имидазола. Фракцию, содержащую созданную молекулу, концентрировали путем ультрафильтрации. Затем фракцию вносили в колонку Супердекс 200 (фирма GE Healthcare). Из элюата собирали только мономерную фракцию, получая каждую очищенную созданную молекулу.

(3) Цитотоксическая активность ErCAM ERY17-2 и ErCAM ERY17-3

Для ErCAM ERY17-2 и ErCAM ERY17-3 оценивали цитотоксическую активность *in vitro*, и было установлено, что обе молекулы обладали сильной цитотоксической активностью (фиг.23). Таким образом, в настоящем изобретении продемонстрировано, что молекулы, в которых в качестве каркаса использован IgG к противораковому

антигену и один из Fab заменен на домен, связывающий эпсилон-цепь CD3, обладали цитотоксической активностью, даже при замене типа ракового антигена.

Пример 10. Конструирование и оценка биспецифических антител с модулированной ассоциацией на поверхности раздела CH1/CL

(1) Создание биспецифического антитела

Путем интродукции мутаций в каждый из CH1- и CL-доменов биспецифического антитела и модулирования тем самым ассоциации на поверхности раздела CH1/CL с использованием отталкивания электрических зарядов на поверхности раздела CH1/CL, можно создавать условия для того, чтобы имела место специфическая ассоциация между Н-цепью и L-цепью антитела к GPC3 и между Н-цепью и L-цепью антитела к CD3. Для того, чтобы модулировать ассоциацию на поверхности раздела CH1/CL с использованием отталкивания электрических зарядов, аминокислотные остатки в CH1 Н-цепей или в CL L-цепей заменяли на Lys, который представляет собой положительно заряженную аминокислоту, или на Glu, который представляет собой отрицательно заряженную аминокислоту.

(2) Конструирование экспрессионных векторов, несущих гены антитела, и экспрессия соответствующих антител

Биспецифическое антитело (фиг.24А) создавали путем модуляции ассоциации на поверхности раздела CH1/CL антитела к CD3 M12 (Н-цепь, SEQ ID NO:81; L-цепь, SEQ ID NO:82) и антитела к GPC3 GC33(2) (Н-цепь, SEQ ID NO:83; L-цепь, SEQ ID NO:84) и дополнительной интродукции в них модификаций типа «выступ-впадина» (KiH) (WO 1996/027011; Ridgway J.B. и др., Protein Engineering 9, 1996, сс.617-621, Merchant A.M. и др., Nat. Biotechnol. 16, 1998, сс.677-681) для того, чтобы избежать ассоциации Н-цепей друг с другом. Конструировали также контрольное биспецифическое антитело (фиг.24Б), в которое не интродуцировали ни модуляцию ассоциации на поверхности раздела CH1/CL, ни модификации типа «выступ-впадина» (KiH). В частности, с помощью метода, известного специалистам в данной области, конструировали экспрессионные векторы, несущие в виде вставки полинуклеотид, кодирующий M12_TH2h (SEQ ID NO:85), в котором несколько аминокислот в CH1 Н-цепи антитела M12 (SEQ ID NO:81) заменены на Lys, или M12_TL17 (SEQ ID NO:86), в котором несколько аминокислот в CL L-цепи (SEQ ID NO:82) заменены на Glu. Аналогично этому, с помощью метода, известного специалистам в данной области, конструировали экспрессионные векторы, несущие в виде вставки полинуклеотид, кодирующий GC33(2)_TH13k (SEQ ID NO:87) или GC33(2)_TH15k (SEQ ID NO:88), в котором несколько аминокислот в CH1 Н-цепи антитела GC33(2) (SEQ ID NO:83) заменены на Glu, или GC33(2)_TL16 (SEQ ID NO:89) или GC33(2)_TL19 (SEQ ID NO:90), в котором несколько аминокислот в CL L-цепи (SEQ ID NO:84) заменены на Lys.

Для кратковременной экспрессии каждой созданной молекулы в клетки FreeStyle293-F интродуцировали следующие комбинации экспрессионных векторов.

Ф. Сконструированная молекула: GM1

Экспрессионные векторы: M12_TH2h (SEQ ID NO:85), M12_TL17 (SEQ ID NO:86), GC33(2)_TH13k (SEQ ID NO:87) и GC33(2)_TL16 (SEQ ID NO:89)

Х. Сконструированная: GM2

Экспрессионные векторы: M12_TH2h (SEQ ID NO:85), M12_TL17 (SEQ ID NO:86), GC33(2)_TH15k (SEQ ID NO:88) и GC33(2)_TL19 (SEQ ID NO:90)

Ц. Сконструированная молекула: GM0

Экспрессионные векторы: Н-цепь M12 (SEQ ID NO:81), L-цепь M12 (SEQ ID NO:82), Н-цепь GC33(2) (SEQ ID NO:83) и L-цепь of GC33(2) (SEQ ID NO:84).

Из полученного супернатанта клеток очищали антитела с помощью метода, известного специалистам в данной области, с использованием колонки rProtein A Sepharose™ Fast Flow (фирма GE Healthcare).

(3) Цитотоксическая активность GM1, GM2 и GM0

Оценивали цитотоксическую активность полипептидных комплексов GM1, GM2 и GM0 *in vitro*. Результат демонстрирует, что GM1 и GM2 обладали сопоставимой цитотоксической активностью, и эта активность выше, чем у GM0 (фиг.25). Таким образом, в настоящем изобретении продемонстрировано, что комбинация модуляции ассоциации на поверхности раздела CH1/CL и KiH-модификаций позволяет эффективно получать биспецифические антитела.

Пример 11. Конструирование и оценка EGFR ERY17-2

(1) Конструирование EGFR ERY17-2

Кроме того, создавали молекулу, обладающую требуемой активностью, мишенью которой являются другой раковый антиген. Конструировали EGFR ERY17-2 (фиг.19A) путем замены анти-GPC3 Fab антитела GPC3 ERY17-2 на анти-EGFR Fab. В частности, используя в качестве матрицы экспрессионный вектор для антитела к EGFR, с помощью метода, хорошо известного специалистам в данной области, такого как ПЦР с использованием праймеров, содержащих такие же соответствующие дополнительные последовательности, что и в описанном выше методе, конструировали серии экспрессионных векторов, в которые был встроен полинуклеотид, кодирующий EGFR ERY17_Hk (SEQ ID NO:91; зрелая последовательность, которая не содержит на аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности) или EGFR ERY17_L (SEQ ID NO:92: зрелая последовательность, которая не содержит на аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности).

Для кратковременной экспрессии каждой сконструированной молекулы в клетки FreeStyle293-F интродуцировали следующие комбинации экспрессионных векторов.

Ч. Сконструированная молекула: EGFR ERY17-2

Полипептиды, кодируемые полинуклеотидами, встроенными в экспрессионные векторы: EGFR ERY17_Hk (SEQ ID NO:91: зрелая последовательность, которая не содержит на аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности), EGFR ERY17_L (SEQ ID NO:92: зрелая последовательность, которая не содержит на аминоконце 19 аминокислот, служащих в качестве сигнальной последовательности), ERY17-2_Hh и ERY17-2_L.

(2) Очистка EGFR ERY17-2

Полученный супернатант культуры вносили в колонку Anti FLAG M2 (фирма Sigma). После отмывки колонку элюировали FLAG-пептидом в концентрации 0,1 мг/мл (фирма Sigma). Фракцию, содержащую созданную молекулу, вносили в колонку HisTrap HP (фирма GE Healthcare). После отмывки колонку элюировали концентрационным градиентом имидазола. Фракцию, содержащую созданную молекулу, концентрировали путем ультрафильтрации. Затем фракцию вносили в колонку Супердекс 200 (фирма GE Healthcare). Из элюата собирали только мономерную фракцию, получая каждую очищенную созданную молекулу.

(3) Цитотоксическая активность EGFR ERY17-2

Для EGFR ERY17-2 оценивали цитотоксическую активность *in vitro*, и в этом случае была выявлена сильная цитотоксическая активность (фиг.26). Таким образом, в настоящем изобретении продемонстрировано, что молекулы, в которых в качестве каркаса служил IgG к противораковому антигену и один из Fab был заменен на домен, связывающий эпсилон-цепь CD3, обладали цитотоксической активностью, даже в том

случае, когда раковый антиген, представляющий собой GPC3 или EpCAM, дополнительно заменяли на другой тип антигена.

Промышленная применимость

В настоящем изобретении предложены новые полипептидные комплексы, которые сохраняют сильную противораковую активность ViTE и обладают продолжительным временем полужизни в крови, а также характеризуются очень высокой безопасностью, что проявляется в отсутствии индукции независимого от ракового антигена цитокинового шторма, или т.п. При замене антигенсвязывающего домена полипептидного комплекса, предлагаемого в настоящем изобретении, терапевтические агенты, которые содержат в качестве действующего вещества полипептидный комплекс для индукции клеточной цитотоксичности, могут направлено воздействовать на различные клетки, включая раковые клетки, и повреждать их. Таким образом, можно лечить или предупреждать различные типы рака. Это позволяет осуществлять требуемое лечение, отличающееся высокой безопасностью и удобством, и снижать физическую нагрузку на пациентов.

(57) Формула изобретения

1. Полипептидный комплекс, обладающий клеточной цитотоксичностью, который содержит:

- (1) раковый антигенсвязывающий домен;
- (2) любой из Fc-доменов SEQ ID NO: 23, 24, 25 и 26, в которых аминокислота(ы), образующая(ие) Fc-домен, мутирована(ы), который обладает пониженной активностью связывания с Fcγ-рецептором по сравнению с контрольным полипептидным комплексом, включающим Fc-домен моноклонального антитела IgG1 дикого типа, IgG2 дикого типа, IgG3 дикого типа или IgG4 дикого типа того же изотипа; и
- (3) CD3-связывающий домен,

где указанный антигенсвязывающий домен и CD3-связывающий домен каждый представляет собой одновалентный Fab,

и где

 - (i) Fv-фрагмент тяжелой цепи одновалентного Fab, образующего антигенсвязывающий домен, сцеплен с одним из полипептидов, образующих Fc-домен, через CH1-домен и Fv-фрагмент легкой цепи Fab сцеплен с CL-доменом; и Fv-фрагмент тяжелой цепи Fab, образующий CD3-связывающий домен, сцеплен с другим полипептидом, образующим Fc-домен, через CH1-домен и Fv-фрагмент легкой цепи Fab сцеплен с CL-доменом,
 - (ii) Fv-фрагмент тяжелой цепи одновалентного Fab, образующего антигенсвязывающий домен, сцеплен с одним из полипептидов, образующих Fc-домен, через CH1-домен и Fv-фрагмент легкой цепи Fab сцеплен с CL-доменом; и Fv-фрагмент легкой цепи Fab, образующего CD3-связывающий домен, сцеплен с другим полипептидом, образующим Fc-домен, через CH1-домен и Fv-фрагмент тяжелой цепи Fab сцеплен с CL-доменом,
 - (iii) Fv-фрагмент тяжелой цепи одновалентного Fab, образующего антигенсвязывающий домен, сцеплен с одним из полипептидов, образующих Fc-домен, через CH1-домен и Fv-фрагмент легкой цепи Fab сцеплен с CL-доменом; и Fv-фрагмент тяжелой цепи Fab, образующего CD3-связывающий домен, сцеплен с другим полипептидом, образующим Fc-домен, через CL-домен и Fv-фрагмент легкой цепи Fab сцеплен с CH1-доменом,
 - (iv) Fv-фрагмент тяжелой цепи одновалентного Fab, образующего CD3-связывающий домен, сцеплен с одним из полипептидов, образующих Fc-домен, через CH1-домен и

Fv-фрагмент легкой цепи Fab сцеплен с CL-доменом; и Fv-фрагмент легкой цепи Fab, образующего антигенсвязывающий домен, сцеплен с другим полипептидом, образующим Fc-домен, через CH1-домен и Fv-фрагмент тяжелой цепи Fab сцеплен с CL-доменом,

или

- 5 (v) Fv-фрагмент тяжелой цепи одновалентного Fab, образующего CD3-связывающий домен, сцеплен с одним из полипептидов, образующих Fc-домен, через CH1-домен и Fv-фрагмент легкой цепи Fab сцеплен с CL-доменом; и Fv-фрагмент тяжелой цепи Fab, образующего антигенсвязывающий домен, сцеплен с другим полипептидом, образующим Fc-домен, через CL-домен и Fv-фрагмент легкой цепи Fab сцеплен с CH1-доменом.

10 2. Полипептидный комплекс по п. 1, который содержит:

(1) антигенсвязывающий домен, в котором Fv-фрагмент тяжелой цепи одновалентной структуры Fab, который связывается с антигеном, сцеплен через CH1-домен с одним из полипептидов, образующих Fc-домен, и Fv-фрагмент легкой цепи структуры Fab сцеплен с CL-доменом; и

- 15 (2) CD3-связывающий домен, в котором Fv-фрагмент тяжелой цепи одновалентной структуры Fab, который связывается с CD3, сцеплен через CH1 с другим полипептидом, образующим Fc-домен, и Fv-фрагмент легкой цепи структуры Fab сцеплен с CL-доменом;

при этом электрические заряды CH1- и CL-доменов контролируют таким образом, чтобы Fv-фрагмент тяжелой цепи антигенсвязывающего домена соединялся с Fv-

- 20 фрагментом легкой цепи антигенсвязывающего домена или Fv-фрагмент тяжелой цепи CD3-связывающего домена соединялся с Fv-фрагментом легкой цепи CD3-связывающего домена.

3. Полипептидный комплекс по п. 2, в котором

- 25 (i) аминокислотный остаток в CH1-домене, сцепленный с Fv-фрагментом тяжелой цепи CD3-связывающего домена, имеет такой же тип электрического заряда, что и аминокислотный остаток в CL-домене, сцепленный с Fv-фрагментом антигенсвязывающего домена;

- и в котором аминокислотный остаток в CH1-домене, сцепленный с Fv-фрагментом тяжелой цепи CD3-связывающего домена, имеет электрический заряд, противоположный заряду аминокислотного остатка в CL-домене, сцепленного с Fv-фрагментом легкой цепи CD3-связывающего домена;

- 35 (ii) аминокислотный остаток в CH1-домене, сцепленный с Fv-фрагментом тяжелой цепи антигенсвязывающего домена, имеет такой же тип электрического заряда, что и аминокислотный остаток в CL-домене, сцепленный с Fv-фрагментом легкой цепи CD3-связывающего домена;

и в котором аминокислотный остаток в CH1-домене, сцепленный с Fv-фрагментом тяжелой цепи антигенсвязывающего домена, имеет электрический заряд, противоположный заряду аминокислотного остатка в CL-домене, сцепленного с Fv-фрагментом легкой цепи антигенсвязывающего домена, или

- 40 (iii) аминокислотный остаток в CH1-домене, сцепленный с Fv-фрагментом тяжелой цепи CD3-связывающего домена, имеет такой же тип электрического заряда, что и аминокислота в CL-домене, сцепленная с Fv-фрагментом легкой цепи антигенсвязывающего домена, и

- аминокислотный остаток в CH1-домене, сцепленный с Fv-фрагментом тяжелой цепи антигенсвязывающего домена, имеет такой же тип электрического заряда, что и аминокислота в CL-домене, сцепленная с Fv-фрагментом легкой цепи CD3-связывающего домена;

и в котором аминокислотный остаток в CH1-домене, сцепленный с Fv-фрагментом

тяжелой цепи CD3-связывающего домена, имеет электрический заряд, противоположный заряду аминокислотного остатка в CL-доме, сцепленного с Fv-фрагментом легкой цепи CD3-связывающего домена;

в котором аминокислотный остаток в CH1-доме, сцепленный с Fv-фрагментом тяжелой цепи антигенсвязывающего домена, имеет электрический заряд, противоположный заряду аминокислотного остатка в CL-доме, сцепленного с Fv-фрагментом легкой цепи антигенсвязывающего домена.

4. Полипептидный комплекс по п. 3, в котором аминокислотные остатки в CH1- и CL-доменах представляют собой одну, две или большее количество комбинаций аминокислотных остатков, выбранных из группы, включающей комбинации:

(а) аминокислотного остатка в положении 147 (EU-нумерация) в CH1-доме и аминокислотного остатка в положении 180 (EU-нумерация) в CL-доме;

(б) аминокислотного остатка в положении 147 (EU-нумерация) в CH1-доме и аминокислотного остатка в положении 131 (EU-нумерация) в CL-доме;

(в) аминокислотного остатка в положении 147 (EU-нумерация) в CH1-доме и аминокислотного остатка в положении 164 (EU-нумерация) в CL-доме;

(г) аминокислотного остатка в положении 147 (EU-нумерация) в CH1-доме и аминокислотного остатка в положении 138 (EU-нумерация) в CL-доме;

(д) аминокислотного остатка в положении 147 (EU-нумерация) в CH1-доме и аминокислотного остатка в положении 123 (EU-нумерация) в CL-доме; и

(е) аминокислотного остатка в положении 175 (EU-нумерация) в CH1-доме и аминокислотного остатка в положении 160 (EU-нумерация) в CL-доме; или

(ж) необязательно содержащий аминокислотный остаток в положении 213 (EU-нумерация) в CH1-доме и аминокислотный остаток в положении 123 (EU-нумерация)

в CL-доме любой одной, двух или более комбинаций (а)-(е),

и в котором аминокислотный остаток в CH1-доме имеет электрический заряд, противоположный заряду аминокислотного остатка в CL-доме,

и в котором аминокислотный остаток, имеющий противоположный электрический заряд, выбран из аминокислотного остатка, входящего в любую из групп:

(X) глутаминовая кислота (E) и аспарагиновая кислота (D); или

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

5. Полипептидный комплекс по п. 4, в котором аминокислотные остатки, имеющие противоположный электрический заряд, представляют собой:

Lys в положении 175 (EU-нумерация) в CH1-доме и Glu в положениях 131, 160 и 180 (EU-нумерация) в CL-доме.

6. Полипептидный комплекс по п. 4, в котором аминокислотные остатки, имеющие противоположный электрический заряд, представляют собой:

Glu в положениях 147 и 175 (EU-нумерация) в CH1-доме и Lys в положениях 131, 160 и 180 (EU-нумерация) в CL-доме.

7. Полипептидный комплекс по п. 6, в котором аминокислотный остаток в положении 213 (EU-нумерация) в CH1-доме представляет собой Glu и аминокислотный остаток в положении 123 (EU-нумерация) в CL-доме представляет собой Lys.

8. Полипептидный комплекс по п. 1, в котором Fc-домен представляет собой любой из Fc-доменов, имеющих SEQ ID NO: 23, 24, 25 и 26, в котором аминокислота(ы), образующая(ие) Fc-домен, изменена(ы) в результате мутации, и характеризуется пониженной активностью связывания с Fcγ-рецептором в отношении FcγI, FcγIIA, FcγIIB, FcγIIIA и/или FcγIIIB, где мутация содержит изменение одного или многих аминокислот в положении, выбранном из: 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 (EU-нумерация).

9. Полипептидный комплекс по п. 8, в котором Fc-домен содержит любую из указанных ниже аминокислот:

5 аминокислотную последовательность, простирающуюся от положения 118 до положения 260 (EU-нумерация), которая представляет собой последовательность SEQ ID NO: 24; или

аминокислотную последовательность, простирающуюся от положения 261 до положения 447 (EU-нумерация), которая представляет собой последовательность SEQ ID NO: 26.

10. Полипептидный комплекс по п. 8, в котором Fc-домен содержит мутацию в аминокислотах SEQ ID NO: 23, образующих Fc-домен, и аминокислоты, образующие Fc-домен, содержат мутацию в любом из следующих положений: 220, 226, 229, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 264, 265, 266, 267, 269, 270, 295, 296, 15 297, 298, 299, 300, 325, 327, 328, 329, 330, 331 и 332 (EU-нумерация).

11. Полипептидный комплекс по п. 10, в котором Fc-домен представляет собой Fc-домен, содержащий аминокислотную замену в положении 233, 234, 235, 236, 237, 327, 330 или 331 (EU-нумерация) на аминокислоту, присутствующую в соответствующем положении (EU-нумерация) в соответствующем IgG2 или IgG4.

12. Полипептидный комплекс по п. 10, в котором Fc-домен содержит аминокислотную мутацию в положении 234, 235 или 297 (EU-нумерация), и в котором аминокислота(ы) в положении 234, 235 и/или 297 заменена(ы) на аланин.

13. Полипептидный комплекс по п. 9, в котором последовательности двух полипептидов, образующих Fc-домен, отличаются друг от друга и в котором 25 аминокислота в положении 349 заменена на цистеин и аминокислота в положении 366 (EU-нумерация) заменена на триптофан в последовательности аминокислотных остатков одного из двух полипептидов, образующих Fc-домен; и в котором аминокислота в положении 356 заменена на цистеин, аминокислота в положении 366 заменена на серин, аминокислота в положении 368 заменена на аланин и аминокислота в положении 407 30 (EU-нумерация) заменена на валин в последовательности аминокислотных остатков другого полипептида.

14. Полипептидный комплекс по п. 9, в котором последовательности двух полипептидов, образующих Fc-домен, отличаются друг от друга и в котором аминокислота в положении 356 (EU-нумерация) заменена на лизин в последовательности 35 аминокислотных остатков одного из двух полипептидов, образующих Fc-домен; аминокислота в положении 439 (EU-нумерация) заменена на глутаминовую кислоту в другом полипептиде; и аминокислота в положении 435 (EU-нумерация) заменена на аргинин в последовательности аминокислотных остатков любого из двух полипептидов.

15. Полипептидный комплекс по п. 13, в котором последовательность GK удалена 40 в результате делеции из карбоксильных концов двух полипептидов, образующих Fc-домен.

16. Полипептидный комплекс по п. 14, в котором последовательность GK удалена в результате делеции из карбоксильных концов двух полипептидов, образующих Fc-домен.

17. Полинуклеотид, кодирующий полипептидный комплекс, обладающий клеточной цитотоксичностью, по одному из пп. 1-16.

18. Вектор для экспрессии полипептидного комплекса по пп. 1-16, содержащий полинуклеотид по п. 17.

19. Клетка для получения полипептидного комплекса по пп. 1-16, содержащая вектор по п. 18.

20. Способ получения полипептидного комплекса, включающий культивирование клетки по п. 19 и выделение полипептидного комплекса из супернатанта культуры.

5 21. Терапевтический агент для лечения рака, который содержит эффективное количество полипептидного комплекса по любому из пп. 1-16 в качестве действующего вещества.

10

15

20

25

30

35

40

45

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Чугаи Сеияку Кабушики Каиша

<120> Индуцирующий цитотоксичность терапевтический агент

<130> C1-A1010Y2P

<150> JP 2010-266760

<151> 2010-11-30

<150> JP 2011-121771

<151> 2011-05-31

<150> JP 2011-238818

<151> 2011-10-31

<160> 92

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 1812

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 1

atggccggga ccggtgcgcac cgcgtgcttg gtggtggcga tgctgctcag cttggacttc 60

ccgggacagg cgcagccccc gccgccgccc ccggacgcca cctgtcacca agtccgctcc 120

ttcttccaga gactgcagcc cggactcaag tgggtgccag aaactcccgt gccaggatca 180

gatttgcaag tatgtctccc taagggccca acatgctgct caagaaagat ggaagaaaaa 240

taccaactaa cagcacgatt gaacatggaa cagctgcttc agtctgcaag tatggagctc 300

aagttcttaa ttattcagaa tgctgcggtt ttccaagagg cctttgaaat tgttggttcgc 360

catgccaaaga actacaccaa tgccatgttc aagaacaact acccaagcct gactccacaa 420

gcttttgagt ttgtgggtga atttttcaca gatgtgtctc tctacatctt gggttctgac 480

atcaatgtag atgacatggt caatgaattg ttgacagcc tgtttccagt catctatacc 540

cagctaataa acccaggcct gcctgattca gccttggaac tcaatgagtg cctccgagga 600

gcaagacgtg acctgaaagt atttgggaat ttccccaagc ttattatgac ccaggtttcc 660

aagtcactgc aagtcactag gatcttcctt caggctctga atcttggaat tgaagtgatc 720

aacacaactg atcacctgaa gttcagtaag gactgtggcc gaatgctcac cagaatgtgg 780

- 130 -

```
tactgctctt actgccaggg actgatgatg gttaaaccct gtggcgggta ctgcaatgtg      840
gtcatgcaag gctgtatggc aggtgtggtg gagattgaca agtactggag agaatacatt      900
ctgtcccttg aagaacttgt gaatggcatg tacagaatct atgacatgga gaacgtactg      960
cttggctctt tttcaacaat ccatgattct atccagtatg tccagaagaa tgcaggaaag     1020
ctgaccacca ctgaaactga gaagaaaata tggcacttca aatatactat cttcttcttg     1080
tgtatagggc tagacttaca gattggcaag ttatgtgccc attctcaaca acgccaatat     1140
agatctgctt attatctga agatctcttt attgacaaga aagtattaaa agttgctcat     1200
gtagaacatg aagaaacctt atccagccga agaagggaac taattcagaa gttgaagtct     1260
ttcatcagct tctatagtgc ttgcctggc tacatctgca gccatagccc tgtggcggaa     1320
aacgacaccc ttgctggaa tggacaagaa ctctgggaga gatacagcca aaaggcagca     1380
aggaatggaa tgaaaaacca gttcaatctc catgagctga aaatgaaggg ccctgagcca     1440
gtggtcagtc aaattattga caaactgaag cacattaacc agctcctgag aaccatgtct     1500
atgccc aaag gtagagttct ggataaaaac ctggatgagg aagggtttga aagtggagac     1560
tgcggtgatg atgaagatga gtgcattgga ggctctggtg atggaatgat aaaagtgaag     1620
aatcagctcc gcttccttgc agaactggcc tatgatctgg atgtggatga tgcgccctgga     1680
aacagtcagc aggcaactcc gaaggacaac gagataagca cctttcacia cctcggaac      1740
gttcattccc cgctgaagct tctcaccagc atggccatct cggtggtgtg cttcttcttc     1800
ctggtgcact ga                                     1812
```

```
<210> 2
<211> 603
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

```
<400> 2
```

```
Met Ala Gly Thr Val Arg Thr Ala Cys Leu Val Val Ala Met Leu Leu
1           5           10           15
```

```
Ser Leu Asp Phe Pro Gly Gln Ala Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Asp
20           25           30
```

- 131 -

Ala Thr Cys His Gln Val Arg Ser Phe Phe Gln Arg Leu Gln Pro Gly
 35 40 45

Leu Lys Trp Val Pro Glu Thr Pro Val Pro Gly Ser Asp Leu Gln Val
 50 55 60

Cys Leu Pro Lys Gly Pro Thr Cys Cys Ser Arg Lys Met Glu Glu Lys
 65 70 75 80

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

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

Glu Ala Phe Glu Ile Val Val Arg His Ala Lys Asn Tyr Thr Asn Ala
 115 120 125

Met Phe Lys Asn Asn Tyr Pro Ser Leu Thr Pro Gln Ala Phe Glu Phe
 130 135 140

Val Gly Glu Phe Phe Thr Asp Val Ser Leu Tyr Ile Leu Gly Ser Asp
 145 150 155 160

Ile Asn Val Asp Asp Met Val Asn Glu Leu Phe Asp Ser Leu Phe Pro
 165 170 175

Val Ile Tyr Thr Gln Leu Met Asn Pro Gly Leu Pro Asp Ser Ala Leu
 180 185 190

Asp Ile Asn Glu Cys Leu Arg Gly Ala Arg Arg Asp Leu Lys Val Phe
 195 200 205

Gly Asn Phe Pro Lys Leu Ile Met Thr Gln Val Ser Lys Ser Leu Gln
 210 215 220

Val Thr Arg Ile Phe Leu Gln Ala Leu Asn Leu Gly Ile Glu Val Ile
 225 230 235 240

- 132 -

Asn Thr Thr Asp His Leu Lys Phe Ser Lys Asp Cys Gly Arg Met Leu
 245 250 255

Thr Arg Met Trp Tyr Cys Ser Tyr Cys Gln Gly Leu Met Met Val Lys
 260 265 270

Pro Cys Gly Gly Tyr Cys Asn Val Val Met Gln Gly Cys Met Ala Gly
 275 280 285

Val Val Glu Ile Asp Lys Tyr Trp Arg Glu Tyr Ile Leu Ser Leu Glu
 290 295 300

Glu Leu Val Asn Gly Met Tyr Arg Ile Tyr Asp Met Glu Asn Val Leu
 305 310 315 320

Leu Gly Leu Phe Ser Thr Ile His Asp Ser Ile Gln Tyr Val Gln Lys
 325 330 335

Asn Ala Gly Lys Leu Thr Thr Thr Glu Thr Glu Lys Lys Ile Trp His
 340 345 350

Phe Lys Tyr Pro Ile Phe Phe Leu Cys Ile Gly Leu Asp Leu Gln Ile
 355 360 365

Gly Lys Leu Cys Ala His Ser Gln Gln Arg Gln Tyr Arg Ser Ala Tyr
 370 375 380

Tyr Pro Glu Asp Leu Phe Ile Asp Lys Lys Val Leu Lys Val Ala His
 385 390 395 400

Val Glu His Glu Glu Thr Leu Ser Ser Arg Arg Arg Glu Leu Ile Gln
 405 410 415

Lys Leu Lys Ser Phe Ile Ser Phe Tyr Ser Ala Leu Pro Gly Tyr Ile
 420 425 430

Cys Ser His Ser Pro Val Ala Glu Asn Asp Thr Leu Cys Trp Asn Gly
 435 440 445

- 133 -

Gln Glu Leu Val Glu Arg Tyr Ser Gln Lys Ala Ala Arg Asn Gly Met
450 455 460

Lys Asn Gln Phe Asn Leu His Glu Leu Lys Met Lys Gly Pro Glu Pro
465 470 475 480

Val Val Ser Gln Ile Ile Asp Lys Leu Lys His Ile Asn Gln Leu Leu
485 490 495

Arg Thr Met Ser Met Pro Lys Gly Arg Val Leu Asp Lys Asn Leu Asp
500 505 510

Glu Glu Gly Phe Glu Ser Gly Asp Cys Gly Asp Asp Glu Asp Glu Cys
515 520 525

Ile Gly Gly Ser Gly Asp Gly Met Ile Lys Val Lys Asn Gln Leu Arg
530 535 540

Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr Asp Leu Asp Val Asp Asp Ala Pro Gly
545 550 555 560

Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe His
565 570 575

Asn Leu Gly Asn Val His Ser Pro Leu Lys Leu Leu Thr Ser Met Ala
580 585 590

Ile Ser Val Val Cys Phe Phe Phe Leu Val His
595 600

<210> 3

<211> 945

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 3

atggcgcccc cgcaggtcct cgcgttcggg cttctgcttg ccgcggcgac ggcgactttt 60

gccgcagctc aggaagaatg tgtctgtgaa aactacaagc tggccgtaaa ctgctttgtg 120

aataataatc gtcaatgccca gtgtacttca gttggtgcac aaaatactgt catttgctca 180

- 134 -

```

aagctggctg ccaaatgttt ggtgatgaag gcagaaatga atggctcaaa acttggggaga 240
agagcaaaac ctgaaggggc cctccagaac aatgatgggc tttatgatcc tgactgcgat 300
gagagcgggc tctttaaggc caagcagtgc aacggcacct ccatgtgctg gtgtgtgaac 360
actgctgggg tcagaagaac agacaaggac actgaaataa cctgctctga gcgagtgaga 420
acctactgga tcatcattga actaaaacac aaagcaagag aaaaacctta tgatagtaaa 480
agtttgcgga ctgcacttca gaaggagatc acaacgcgtt atcaactgga tccaaaattt 540
atcacgagta ttttgtatga gaataatgtt atcactattg atctggttca aaattcttct 600
caaaaaactc agaatgatgt ggacatagct gatgtggcctt attattttga aaaagatgtt 660
aaaggtgaat ccttgtttca ttctaagaaa atggacctga cagtaaatgg ggaacaactg 720
gatctggatc ctgggtcaaac tttaatattat tatgttgatg aaaaagcacc tgaattctca 780
atgcagggtc taaaagctgg tgttattgct gttattgtgg ttgtggtgat agcagttgtt 840
gctggaattg ttgtgctggt tatttccaga aagaagagaa tggcaaagta tgagaaggct 900
gagataaagg agatgggtga gatgcatagg gaactcaatg cataa 945

```

```

<210> 4
<211> 314
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 4

```

```

Met Ala Pro Pro Gln Val Leu Ala Phe Gly Leu Leu Leu Ala Ala Ala
1          5          10          15

```

```

Thr Ala Thr Phe Ala Ala Ala Gln Glu Glu Cys Val Cys Glu Asn Tyr
          20          25          30

```

```

Lys Leu Ala Val Asn Cys Phe Val Asn Asn Asn Arg Gln Cys Gln Cys
          35          40          45

```

```

Thr Ser Val Gly Ala Gln Asn Thr Val Ile Cys Ser Lys Leu Ala Ala
          50          55          60

```

```

Lys Cys Leu Val Met Lys Ala Glu Met Asn Gly Ser Lys Leu Gly Arg

```

- 135 -

65		70		75		80									
Arg	Ala	Lys	Pro	Glu	Gly	Ala	Leu	Gln	Asn	Asn	Asp	Gly	Leu	Tyr	Asp
			85					90						95	
Pro	Asp	Cys	Asp	Glu	Ser	Gly	Leu	Phe	Lys	Ala	Lys	Gln	Cys	Asn	Gly
			100					105					110		
Thr	Ser	Met	Cys	Trp	Cys	Val	Asn	Thr	Ala	Gly	Val	Arg	Arg	Thr	Asp
		115					120					125			
Lys	Asp	Thr	Glu	Ile	Thr	Cys	Ser	Glu	Arg	Val	Arg	Thr	Tyr	Trp	Ile
	130					135					140				
Ile	Ile	Glu	Leu	Lys	His	Lys	Ala	Arg	Glu	Lys	Pro	Tyr	Asp	Ser	Lys
145					150					155					160
Ser	Leu	Arg	Thr	Ala	Leu	Gln	Lys	Glu	Ile	Thr	Thr	Arg	Tyr	Gln	Leu
			165						170					175	
Asp	Pro	Lys	Phe	Ile	Thr	Ser	Ile	Leu	Tyr	Glu	Asn	Asn	Val	Ile	Thr
			180					185					190		
Ile	Asp	Leu	Val	Gln	Asn	Ser	Ser	Gln	Lys	Thr	Gln	Asn	Asp	Val	Asp
	195						200					205			
Ile	Ala	Asp	Val	Ala	Tyr	Tyr	Phe	Glu	Lys	Asp	Val	Lys	Gly	Glu	Ser
	210						215					220			
Leu	Phe	His	Ser	Lys	Lys	Met	Asp	Leu	Thr	Val	Asn	Gly	Glu	Gln	Leu
225				230						235					240
Asp	Leu	Asp	Pro	Gly	Gln	Thr	Leu	Ile	Tyr	Tyr	Val	Asp	Glu	Lys	Ala
				245					250					255	
Pro	Glu	Phe	Ser	Met	Gln	Gly	Leu	Lys	Ala	Gly	Val	Ile	Ala	Val	Ile
			260					265					270		
Val	Val	Val	Val	Ile	Ala	Val	Val	Ala	Gly	Ile	Val	Val	Leu	Val	Ile

- 136 -

	275		280		285
Ser	Arg	Lys	Lys	Arg	Met
	290		295		300
Ala	Lys	Tyr	Glu	Lys	Ala
					Glu
					Ile
					Lys
					Glu

Met	Gly	Glu	Met	His	Arg	Glu	Leu	Asn	Ala
305					310				

<210> 5
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 5

Gly Gly Gly Ser
 1

<210> 6
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 6

Ser Gly Gly Gly
 1

<210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 7

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

- 137 -

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 8

Ser Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 9

Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 10
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 10

Ser Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 11

- 138 -

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная

<220>
<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 12

Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 13
<211> 1125
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 13
atgtggttct tgacaactct gtccttttgg gttccagttg atgggcaagt ggacaccaca 60
aaggcagtga tcacttttga gcctccatgg gtcagcgtgt tccaagagga aaccgtaacc 120
ttgcactgtg aggtgctcca tctgcctggg agcagctcta cacagtgggt tctcaatggc 180
acagccactc agacctcgac ccccagctac agaatcacct ctgccagtgt caatgacagt 240
ggggaataca ggtgccagag aggtctctca gggcgaagt accccatata gctggaaatc 300
cacagaggct ggctactact gcaggctctc agcagagtct tcacggaagg agaacctctg 360
gccttgaggt gtcattgcgtg gaaggataag ctgggtgtaca atgtgcttta ctatcgaaat 420
ggcaaagcct ttaagttttt ccaactggaat tctaacctca ccattctgaa aaccaacata 480
agtcacaatg gcacctacca ttgctcaggc atgggaaagc atcgctacac atcagcagga 540
atatctgtca ctgtgaaaga gctattttcca gctccagtgc tgaatgcac tgtagacatcc 600
ccactcctgg aggggaatct ggtcaccttg agctgtgaaa caaagttgct cttgcagagg 660
cctgggtttgc agctttactt ctccttctac atgggcagca agacctgagc aggcaggaac 720
acatcctctg aataccaaat actaactgct agaagagaag actctgggtt atactgggtg 780
gaggctgcca cagaggatgg aaatgtcctt aagcgcagcc ctgagttgga gcttcaagtg 840

- 139 -

cttggcctcc agttaccaac tcctgtctgg tttcatgtcc ttttctatct ggcagtggga 900
 ataatgtttt tagtgaacac tgttctctgg gtgacaatac gtaaagaact gaaaagaaag 960
 aaaaagtggg atttagaaat ctctttggat tctggtcatg agaagaaggt aatttccagc 1020
 cttcaagaag acagacattt agaagaagag ctgaaatgtc aggaacaaaa agaagaacag 1080
 ctgcaggaag ggggtgcaccg gaaggagccc cagggggcca cgtag 1125

<210> 14
 <211> 374
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14

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

Val Asp Thr Thr Lys Ala Val Ile Thr Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser
 20 25 30

Val Phe Gln Glu Glu Thr Val Thr Leu His Cys Glu Val Leu His Leu
 35 40 45

Pro Gly Ser Ser Ser Thr Gln Trp Phe Leu Asn Gly Thr Ala Thr Gln
 50 55 60

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

Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Arg Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Pro Ile
 85 90 95

Gln Leu Glu Ile His Arg Gly Trp Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser Arg
 100 105 110

Val Phe Thr Glu Gly Glu Pro Leu Ala Leu Arg Cys His Ala Trp Lys
 115 120 125

Asp Lys Leu Val Tyr Asn Val Leu Tyr Tyr Arg Asn Gly Lys Ala Phe

- 140 -

130	135	140
Lys Phe Phe His Trp Asn Ser Asn Leu Thr Ile Leu Lys Thr Asn Ile		
145	150	155 160
Ser His Asn Gly Thr Tyr His Cys Ser Gly Met Gly Lys His Arg Tyr		
	165	170 175
Thr Ser Ala Gly Ile Ser Val Thr Val Lys Glu Leu Phe Pro Ala Pro		
	180	185 190
Val Leu Asn Ala Ser Val Thr Ser Pro Leu Leu Glu Gly Asn Leu Val		
	195	200 205
Thr Leu Ser Cys Glu Thr Lys Leu Leu Leu Gln Arg Pro Gly Leu Gln		
	210	215 220
Leu Tyr Phe Ser Phe Tyr Met Gly Ser Lys Thr Leu Arg Gly Arg Asn		
	225	230 235 240
Thr Ser Ser Glu Tyr Gln Ile Leu Thr Ala Arg Arg Glu Asp Ser Gly		
	245	250 255
Leu Tyr Trp Cys Glu Ala Ala Thr Glu Asp Gly Asn Val Leu Lys Arg		
	260	265 270
Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln Val Leu Gly Leu Gln Leu Pro Thr Pro		
	275	280 285
Val Trp Phe His Val Leu Phe Tyr Leu Ala Val Gly Ile Met Phe Leu		
	290	295 300
Val Asn Thr Val Leu Trp Val Thr Ile Arg Lys Glu Leu Lys Arg Lys		
	305	310 315 320
Lys Lys Trp Asp Leu Glu Ile Ser Leu Asp Ser Gly His Glu Lys Lys		
	325	330 335
Val Ile Ser Ser Leu Gln Glu Asp Arg His Leu Glu Glu Glu Leu Lys		

- 141 -

340	345	350	
Cys Gln Glu Gln Lys Glu Glu Gln Leu Gln Glu Gly Val His Arg Lys			
355	360	365	
Glu Pro Gln Gly Ala Thr			
370			
<210>	15		
<211>	951		
<212>	ДНК		
<213>	Homo sapiens		
<400>	15		
atgactatgg agacccaaat gtctcagaat gtatgtccca gaaacctgtg gctgcttcaa		60	
ccattgacag ttttgctgct gctggcttct gcagacagtc aagctgctcc cccaaaggct		120	
gtgtgtgaaac ttgagccccc gtggatcaac gtgctccagg aggactctgt gactctgaca		180	
tgccaggggg ctcgcagccc tgagagcgac tccattcagt ggttcacaa tgggaatctc		240	
attccccacc acacgcagcc cagctacagg ttcaaggcca acaacaatga cagcggggag		300	
tacacgtgcc agactggcca gaccagcctc agcgaccctg tgcatctgac tgtgctttcc		360	
gaatggctgg tgctccagac ccctcacctg gagttccagg agggagaaac catcatgctg		420	
agggtgccaca gctggaagga caagcctctg gtcaaggcca cattcttcca gaatggaaaa		480	
tcccagaaat tctccattt ggatccccacc ttctccatcc cacaagcaaa ccacagtcac		540	
agtggtgatt accactgcac aggaacata ggctacacgc tgttctcatc caagcctgtg		600	
accatcactg tccaagtgcc cagcatgggc agctcttcac caatgggggt cattgtggct		660	
gtggtcattg cgactgctgt agcagccatt gttgctgctg tagtggcctt gatctactgc		720	
aggaaaaagc ggatttcagc caattccact gatcctgtga aggctgcca atttgagcca		780	
cctggacgtc aatgattgc catcagaaag agacaacttg aagaaaccaa caatgactat		840	
gaaacagctg acggcgggcta catgactctg aaccccaggg cacctactga cgatgataaa		900	
aacatctacc tgactcttcc tccaacgac catgtcaaca gtaataacta a		951	
<210>	16		
<211>	316		

- 142 -

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Thr Met Glu Thr Gln Met Ser Gln Asn Val Cys Pro Arg Asn Leu
 1 5 10 15

Trp Leu Leu Gln Pro Leu Thr Val Leu Leu Leu Leu Ala Ser Ala Asp
 20 25 30

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

Ile Asn Val Leu Gln Glu Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Gln Gly Ala
 50 55 60

Arg Ser Pro Glu Ser Asp Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu
 65 70 75 80

Ile Pro Thr His Thr Gln Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn
 85 90 95

Asp Ser Gly Glu Tyr Thr Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp
 100 105 110

Pro Val His Leu Thr Val Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro
 115 120 125

His Leu Glu Phe Gln Glu Gly Glu Thr Ile Met Leu Arg Cys His Ser
 130 135 140

Trp Lys Asp Lys Pro Leu Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys
 145 150 155 160

Ser Gln Lys Phe Ser His Leu Asp Pro Thr Phe Ser Ile Pro Gln Ala
 165 170 175

Asn His Ser His Ser Gly Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr
 180 185 190

- 143 -

Thr Leu Phe Ser Ser Lys Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Val Pro Ser
195 200 205

Met Gly Ser Ser Ser Pro Met Gly Val Ile Val Ala Val Val Ile Ala
210 215 220

Thr Ala Val Ala Ala Ile Val Ala Ala Val Val Ala Leu Ile Tyr Cys
225 230 235 240

Arg Lys Lys Arg Ile Ser Ala Asn Ser Thr Asp Pro Val Lys Ala Ala
245 250 255

Gln Phe Glu Pro Pro Gly Arg Gln Met Ile Ala Ile Arg Lys Arg Gln
260 265 270

Leu Glu Glu Thr Asn Asn Asp Tyr Glu Thr Ala Asp Gly Gly Tyr Met
275 280 285

Thr Leu Asn Pro Arg Ala Pro Thr Asp Asp Asp Lys Asn Ile Tyr Leu
290 295 300

Thr Leu Pro Pro Asn Asp His Val Asn Ser Asn Asn
305 310 315

<210> 17
<211> 876
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 17
atgggaatcc tgtcattctt acctgtcctt gccactgaga gtgactgggc tgactgcaag 60
tccccccagc cttgggggtca tatgcttctg tggacagctg tgctattcct ggctcctgtt 120
gctgggacac ctgcagctcc cccaaaggct gtgctgaaac tcgagcccca gtggatcaac 180
gtgctccagg aggactctgt gactctgaca tgccggggga ctcacagccc tgagagcgac 240
tccattcagt ggttcacaa tgggaatctc attccaccc acacgcagcc cagctacagg 300
ttcaaggcca acaacaatga cagcggggag tacacgtgcc agactggcca gaccagcctc 360
agcgaccctg tgcattctgac tgtgctttct gagtggctgg tgctccagac ccctcacctg 420

- 144 -

```

gagttccagg agggagaaac catcgtgctg aggtgccaca gctggaagga caagcctctg 480
gtcaagggtca cattcttcca gaatggaaaa tccaagaaat tttcccgttc ggatcccaac 540
ttctccatcc cacaagcaaa ccacagtcac agtgggtgatt accactgcac aggaaacata 600
ggctacacgc tgtactcatc caagcctgtg accatcactg tccaagctcc cagctcttca 660
ccgatgggga tcattgtggc tgtgggtcact gggattgctg tagcggccat tgttgctgct 720
gtagtggcct tgatctactg caggaaaaag cggatttcag ccaatcccac taatcctgat 780
gaggctgaca aagttggggc tgagaacaca atcacctatt cacttctcat gcacccggat 840
gctctggaag agcctgatga ccagaaccgt atttag 876

```

<210> 18

<211> 291

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

```

Met Gly Ile Leu Ser Phe Leu Pro Val Leu Ala Thr Glu Ser Asp Trp
1           5           10          15

```

```

Ala Asp Cys Lys Ser Pro Gln Pro Trp Gly His Met Leu Leu Trp Thr
          20           25           30

```

```

Ala Val Leu Phe Leu Ala Pro Val Ala Gly Thr Pro Ala Ala Pro Pro
          35           40           45

```

```

Lys Ala Val Leu Lys Leu Glu Pro Gln Trp Ile Asn Val Leu Gln Glu
          50           55           60

```

```

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

```

```

Ser Ile Gln Trp Phe His Asn Gly Asn Leu Ile Pro Thr His Thr Gln
          85           90           95

```

```

Pro Ser Tyr Arg Phe Lys Ala Asn Asn Asn Asp Ser Gly Glu Tyr Thr
          100          105          110

```

- 145 -

Cys Gln Thr Gly Gln Thr Ser Leu Ser Asp Pro Val His Leu Thr Val
115 120 125

Leu Ser Glu Trp Leu Val Leu Gln Thr Pro His Leu Glu Phe Gln Glu
130 135 140

Gly Glu Thr Ile Val Leu Arg Cys His Ser Trp Lys Asp Lys Pro Leu
145 150 155 160

Val Lys Val Thr Phe Phe Gln Asn Gly Lys Ser Lys Lys Phe Ser Arg
165 170 175

Ser Asp Pro Asn Phe Ser Ile Pro Gln Ala Asn His Ser His Ser Gly
180 185 190

Asp Tyr His Cys Thr Gly Asn Ile Gly Tyr Thr Leu Tyr Ser Ser Lys
195 200 205

Pro Val Thr Ile Thr Val Gln Ala Pro Ser Ser Ser Pro Met Gly Ile
210 215 220

Ile Val Ala Val Val Thr Gly Ile Ala Val Ala Ala Ile Val Ala Ala
225 230 235 240

Val Val Ala Leu Ile Tyr Cys Arg Lys Lys Arg Ile Ser Ala Asn Pro
245 250 255

Thr Asn Pro Asp Glu Ala Asp Lys Val Gly Ala Glu Asn Thr Ile Thr
260 265 270

Tyr Ser Leu Leu Met His Pro Asp Ala Leu Glu Glu Pro Asp Asp Gln
275 280 285

Asn Arg Ile
290

<210> 19
<211> 765
<212> ДНК

- 146 -

<213> Homo sapiens

<400> 19

```

atgtggcagc tgctcctccc aactgctctg ctacttctag tttcagctgg catgcggact    60
gaagatctcc caaaggctgt ggtgttctctg gaggctcaat ggtacagggt gctcgagaag    120
gacagtgtga ctctgaagtg ccaggggagcc tactcccctg aggacaattc cacacagtgg    180
tttcacaatg agagcctcat ctcaagccag gcctcgagct acttcattga cgctgccaca    240
gttgacgaca gtggagagta cagggtgccag acaaacctct ccaccctcag tgacccggtg    300
cagctagaag tccatatcgg ctggctgttg ctccaggccc ctcgggtgggt gttcaaggag    360
gaagacccta ttcacctgag gtgtcacagc tggaagaaca ctgctctgca taaggtcaca    420
tatttacaga atggcaaagg caggaagtat tttcatcata attctgactt ctacattcca    480
aaagccacac tcaaagacag cggctcctac ttctgcaggg ggcttgttgg gagtaaaaat    540
gtgtcttcag agactgtgaa catcaccatc actcaagggt tgtcagtgtc aaccatctca    600
tcattctttc cacctgggta ccaagtctct ttctgcttgg tgatggtact cctttttgca    660
gtggacacag gactatattt ctctgtgaag acaaacattc gaagctcaac aagagactgg    720
aaggaccata aatttaaatg gagaaaggac cctcaagaca aatga                        765

```

<210> 20

<211> 254

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

```

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
1           5           10           15

```

```

Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
          20           25           30

```

```

Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
          35           40           45

```

```

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
          50           55           60

```

- 147 -

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

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

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln
100 105 110

Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys
115 120 125

His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn
130 135 140

Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro
145 150 155 160

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

Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln
180 185 190

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

Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly
210 215 220

Leu Tyr Phe Ser Val Lys Thr Asn Ile Arg Ser Ser Thr Arg Asp Trp
225 230 235 240

Lys Asp His Lys Phe Lys Trp Arg Lys Asp Pro Gln Asp Lys
245 250

<210> 21
<211> 702
<212> ДНК

- 148 -

<213> Homo sapiens

<400> 21

```

atgtggcagc tgctcctccc aactgctctg ctacttctag tttcagctgg catgcggact    60
gaagatctcc caaaggctgt ggtgttcctg gagcctcaat ggtacagcgt gcttgagaag    120
gacagtgtga ctctgaagtg ccaggagacc tactcccctg aggacaattc cacacagtgg    180
tttcacaatg agagcctcat ctcaagccag gcctcgagct acttcattga cgctgccaca    240
gtcaacgaca gtggagagta cagggtgccag acaaacctct ccaccctcag tgacccgggt    300
cagctagaag tccatatcgg ctggctgttg ctccaggccc ctcggtgggt gttcaaggag    360
gaagacccta ttcacctgag gtgtcacagc tggaagaaca ctgctctgca taaggtcaca    420
tatttacaga atggcaaaga caggaagtat tttcatcata attctgactt ccacattcca    480
aaagccacac tcaaagatag cggctcctac ttctgcaggg ggcttggtgg gagtaaaaat    540
gtgtcttcag agactgtgaa catcaccatc actcaaggtt tggcagtgtc aaccatctca    600
tcattctctc cacctgggta ccaagtctct ttctgcttgg tgatgggtact cctttttgca    660
gtggacacag gactatattt ctctgtgaag acaaacattt ga                          702

```

<210> 22

<211> 233

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

```

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala
1              5              10              15

Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro
                20              25              30

Gln Trp Tyr Ser Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln
                35              40              45

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu
                50              55              60

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr

```

- 149 -

65		70		75		80									
Val	Asn	Asp	Ser	Gly	Glu	Tyr	Arg	Cys	Gln	Thr	Asn	Leu	Ser	Thr	Leu
				85					90					95	
Ser	Asp	Pro	Val	Gln	Leu	Glu	Val	His	Ile	Gly	Trp	Leu	Leu	Leu	Gln
			100					105					110		
Ala	Pro	Arg	Trp	Val	Phe	Lys	Glu	Glu	Asp	Pro	Ile	His	Leu	Arg	Cys
			115				120					125			
His	Ser	Trp	Lys	Asn	Thr	Ala	Leu	His	Lys	Val	Thr	Tyr	Leu	Gln	Asn
			130				135				140				
Gly	Lys	Asp	Arg	Lys	Tyr	Phe	His	His	Asn	Ser	Asp	Phe	His	Ile	Pro
145					150					155					160
Lys	Ala	Thr	Leu	Lys	Asp	Ser	Gly	Ser	Tyr	Phe	Cys	Arg	Gly	Leu	Val
				165					170					175	
Gly	Ser	Lys	Asn	Val	Ser	Ser	Glu	Thr	Val	Asn	Ile	Thr	Ile	Thr	Gln
			180					185					190		
Gly	Leu	Ala	Val	Ser	Thr	Ile	Ser	Ser	Phe	Ser	Pro	Pro	Gly	Tyr	Gln
		195					200					205			
Val	Ser	Phe	Cys	Leu	Val	Met	Val	Leu	Leu	Phe	Ala	Val	Asp	Thr	Gly
		210				215					220				
Leu	Tyr	Phe	Ser	Val	Lys	Thr	Asn	Ile							
225					230										

<210> 23
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Искусственно синтезированная последовательность

 <400> 23

- 150 -

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

- 151 -

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> 24

<211> 326

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 24

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

25

- 153 -

	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> 25					
<211> 377					
<212> PRT					
<213> Искусственная					
<220>					
<223> Искусственно синтезированная последовательность					
<400> 25					
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg					
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

- 154 -

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

- 155 -

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> 26

<211> 327

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 26

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

- 156 -

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	
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	
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						

- 157 -

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> 27

<211> 549

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 27

atggaacagg ggaagggcct ggctgtcctc atcctggcta tcattcttct tcaaggtact 60

ttggcccagt caatcaaagg aaaccacttg gttaagggtg atgactatca agaagatggt 120

tcggtacttc tgacttgtga tgcagaagcc aaaaatatca catggtttaa agatgggaag 180

atgatcggct tcctaactga agataaaaaa aaatggaatc tgggaagtaa tgccaaggac 240

cctcgaggga tgtatcagtg taaaggatca cagaacaagt caaaaccact ccaagtgtat 300

tacagaatgt gtcagaactg cattgaacta aatgcagcca ccatatctgg ctttctcttt 360

gctgaaatcg tcagcatttt cgtccttgct gttgggtct acttcattgc tggacaggat 420

ggagttcgcc agtcgagagc ttcagacaag cagactctgt tgcccaatga ccagctctac 480

cagcccctca aggatcgaga agatgaccag tacagccacc ttcaaggaaa ccagttgagg 540

aggaattga 549

<210> 28

<211> 182

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Glu Gln Gly Lys Gly Leu Ala Val Leu Ile Leu Ala Ile Ile Leu

1 5 10 15

- 158 -

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> 29

<211> 516

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 29

atggaacata gcacgtttct ctctggcctg gtactggcta cccttctctc gcaagtgaga 60

- 159 -

```

cccttcaaga tacctataga ggaacttgag gacagagtgt ttgtgaattg caataccagc 120
atcacatggg tagaggggaac ggtgggaaca ctgctctcag acattacaag actggacctg 180
ggaaaaacgca tcctggaccc acgaggaata tataggtgta atgggacaga tatatacaag 240
gacaaagaat ctaccgtgca agttcattat cgaatgtgcc agagctgtgt ggagctggat 300
ccagccaccg tggttgcat cattgtcact gatgtcattg ccactctgct ccttgctttg 360
ggagtcttct gctttgctgg acatgagact ggaaggctgt ctggggctgc cgacacacaa 420
gctctgttga ggaatgacca ggtctatcag cccctccgag atcgagatga tgctcagtac 480
agccaccttg gaggaaactg ggctcggaac aagtga 516

```

<210> 30

<211> 171

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

```

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

```

- 160 -

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 Asp Ala Gln Tyr
145 150 155 160

Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys
165 170

<210> 31
<211> 624
<212> ДНК
<213> Homo sapiens

<400> 31
atgcagtcgg gcactcactg gagagttctg ggcctctgcc tcttatcagt tggcgtttgg 60
gggcaagatg gtaatgaaga aatgggtggt attacacaga caccatataa agtctccatc 120
tctggaacca cagtaatatt gacatgccct cagtatcctg gatctgaaat actatggcaa 180
cacaatgata aaaacatagg cggatgatgag gatgataaaa acataggcag tgatgaggat 240
cacctgtcac tgaaggaatt ttcagaattg gagcaaagt gttattatgt ctgctacccc 300
agaggaagca aaccagaaga tgcgaacttt tatctctacc tgagggcaag agtgtgtgag 360
aactgcatgg agatggatgt gatgtcgggt gccacaattg tcatagtgga catctgcatc 420
actgggggct tgctgctgct gggtttactac tggagcaaga atagaaaggc caaggccaag 480
cctgtgacac gaggagcggg tgctggcggc aggcaaagg gacaaaacaa ggagaggcca 540
ccacctgttc ccaaccaga ctatgagccc atccggaaag gccagcgga cctgtattct 600
ggcctgaatc agagacgcat ctga 624

<210> 32
<211> 207
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 32

- 161 -

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

- 162 -

<210> 33
 <211> 523
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 33

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu
 145 150 155 160

Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln

- 163 -

165	170	175
Ser Leu Val His Ser Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln		
180	185	190
Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg		
195	200	205
Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp		
210	215	220
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr		
225	230	235 240
Tyr Cys Ser Gln Asn Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr		
245	250	255
Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln		
260	265	270
Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys		
275	280	285
Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val		
290	295	300
Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn		
305	310	315 320
Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly		
325	330	335
Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala		
340	345	350
Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly		
355	360	365
Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly		

- 164 -

370 375 380
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly
 385 390 395 400
 Leu Val Gln Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 405 410 415
 Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 420 425 430
 Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr
 435 440 445
 Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 450 455 460
 Asp Asp Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr
 465 470 475 480
 Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
 485 490 495
 Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 500 505 510
 Val Ser Ala His His His His His His His His
 515 520
 <210> 34
 <211> 753
 <212> PRT
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Искусственно синтезированная последовательность
 <400> 34
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

- 165 -

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu
 145 150 155 160

Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln
 165 170 175

Ser Leu Val His Ser Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln
 180 185 190

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
 195 200 205

Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 210 215 220

- 166 -

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr
 225 230 235 240

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

Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln
 260 265 270

Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys
 275 280 285

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val
 290 295 300

Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn
 305 310 315 320

Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly
 325 330 335

Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala
 340 345 350

Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly
 355 360 365

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 370 375 380

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly
 385 390 395 400

Leu Val Gln Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 405 410 415

Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 420 425 430

- 167 -

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr
 435 440 445

Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 450 455 460

Asp Asp Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr
 465 470 475 480

Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn
 485 490 495

Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 500 505 510

Val Ser Ala Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 515 520 525

Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 530 535 540

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 545 550 555 560

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 565 570 575

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 580 585 590

Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 595 600 605

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 610 615 620

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 625 630 635 640

- 168 -

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
645 650 655

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe
660 665 670

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
675 680 685

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
690 695 700

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
705 710 715 720

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
725 730 735

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro His His His His His His His
740 745 750

His

<210> 35

<211> 257

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 35

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

Val His Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
20 25 30

Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro

42

- 170 -

245

250

255

Lys

<210> 36

<211> 514

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 36

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140

- 171 -

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu
145 150 155 160

Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln
165 170 175

Ser Leu Val His Ser Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln
180 185 190

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
195 200 205

Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
210 215 220

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr
225 230 235 240

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

Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
260 265 270

Gly Gly Gly Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
275 280 285

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
290 295 300

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
305 310 315 320

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
325 330 335

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
340 345 350

- 172 -

Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 355 360 365

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 370 375 380

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 385 390 395 400

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 405 410 415

Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly
 420 425 430

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 435 440 445

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 450 455 460

Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 465 470 475 480

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 485 490 495

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
 500 505 510

Asp Lys

<210> 37

<211> 629

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

- 173 -

<400> 37

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu
 145 150 155 160

Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln
 165 170 175

Ser Leu Val His Ser Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln
 180 185 190

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg

- 174 -

195		200		205
Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg	Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp			
210	215	220		
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr				
225	230	235	240	
Tyr Cys Ser Gln Asn Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr				
	245	250	255	
Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Leu Glu				
	260	265	270	
Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys				
	275	280	285	
Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg				
	290	295	300	
Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys				
305	310	315	320	
Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe				
	325	330	335	
Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn				
	340	345	350	
Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly				
	355	360	365	
Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly				
	370	375	380	
Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His				
385	390	395	400	
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val				

- 175 -

405	410	415
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr		
420	425	430
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu		
435	440	445
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys		
450	455	460
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser		
465	470	480
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys		
485	490	495
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile		
500	505	510
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro		
515	520	525
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu		
530	535	540
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn		
545	550	560
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser		
565	570	575
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg		
580	585	590
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
595	600	605
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro His His His		

- 176 -

610

615

620

His His His His His
625

<210> 38

<211> 613

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 38

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
130 135 140

- 177 -

Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu
 145 150 155 160

Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln
 165 170 175

Ser Leu Val His Ser Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln
 180 185 190

Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg
 195 200 205

Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 210 215 220

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr
 225 230 235 240

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

Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln
 260 265 270

Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys
 275 280 285

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val
 290 295 300

Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn
 305 310 315 320

Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly
 325 330 335

Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala
 340 345 350

- 178 -

Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly
 355 360 365

Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His
 370 375 380

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
 385 390 395 400

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 405 410 415

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 420 425 430

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 435 440 445

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 450 455 460

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 465 470 475 480

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 485 490 495

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 500 505 510

Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
 515 520 525

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 530 535 540

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 545 550 555 560

- 179 -

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 565 570 575

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 580 585 590

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys
 595 600 605

Asp Asp Asp Asp Lys
 610

<210> 39
 <211> 470
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 39

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val

- 180 -

100	105	110
Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
115	120	125
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro		
130	135	140
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly		
145	150	155
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
165	170	175
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
180	185	190
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
195	200	205
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
210	215	220
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
225	230	235
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser		
245	250	255
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
260	265	270
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
275	280	285
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
290	295	300
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val		

- 181 -

[illegible]

- 182 -

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

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45

Val His Ser Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110

Ser Gln Asn Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 130 135 140

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

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 195 200 205

- 183 -

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 41

<211> 470

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 41

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

- 184 -

130	135	140
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly		
145	150	155 160
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
	165	170 175
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
	180	185 190
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
	195	200 205
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
	210	215 220
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
	225	230 235 240
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser		
	245	250 255
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
	260	265 270
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
	275	280 285
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
	290	295 300
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val		
	305	310 315 320
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
	325	330 335
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		

- 185 -

340 345 350
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
 355 360 365
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
 370 375 380
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 405 410 415
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro His His
 450 455 460
 His His His His His His
 465 470
 <210> 42
 <211> 734
 <212> PRT
 <213> Искусственная
 <220>
 <223> Искусственно синтезированная последовательность
 <400> 42
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser
 20 25 30

- 186 -

Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val
 35 40 45

Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu
 50 55 60

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

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile
 85 90 95

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

Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu
 130 135 140

Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly Ser
 145 150 155 160

Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala
 165 170 175

Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 180 185 190

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
 195 200 205

Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile Leu
 210 215 220

Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr
 225 230 235 240

- 187 -

Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala
 245 250 255

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly
 260 265 270

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln Leu Val
 275 280 285

Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser
 290 295 300

Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile
 305 310 315 320

Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro
 325 330 335

Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr
 340 345 350

Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser
 355 360 365

Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser
 370 375 380

Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 385 390 395 400

Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 405 410 415

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
 420 425 430

Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
 435 440 445

- 188 -

His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
 450 455 460

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
 465 470 475 480

Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
 485 490 495

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 500 505 510

Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 515 520 525

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 530 535 540

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 545 550 555 560

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 565 570 575

Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 580 585 590

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 595 600 605

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 610 615 620

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr
 625 630 635 640

Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 645 650 655

- 189 -

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
660 665 670

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val
675 680 685

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
690 695 700

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
705 710 715 720

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
725 730

<210> 43

<211> 462

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 43

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser

- 190 -

	85		90		95
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val	100		105		110
Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	115		120		125
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro	130		135		140
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly	145		150		155
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn	165		170		175
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln	180		185		190
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser	195		200		205
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser	210		215		220
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr	225		230		235
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser	245		250		255
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg	260		265		270
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro	275		280		285
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala					

- 191 -

290		295		300
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val				
305		310	315	320
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr				
	325	330		335
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr				
	340	345		350
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu				
	355	360		365
Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys				
	370	375		380
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser				
385	390	395		400
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp				
	405	410		415
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser				
	420	425		430
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala				
	435	440		445
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro				
450	455			460
<210> 44				
<211> 246				
<212> PRT				
<213> Искусственная				
<220>				
<223> Искусственно синтезированная последовательность				
<400> 44				

- 192 -

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

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45

Val His Ser Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110

Ser Gln Asn Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu
 115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 130 135 140

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

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
 165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
 180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
 195 200 205

- 193 -

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
 210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys His His
 225 230 235 240

His His His His His His
 245

<210> 45
 <211> 505
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 45

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

Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 35 40 45

Val His Ser Asn Arg Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110

Ser Gln Asn Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu

- 194 -

115	120	125
Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro		
130	135	140
Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu		
145	150	155
Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn		
165	170	175
Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser		
180	185	190
Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala		
195	200	205
Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly		
210	215	220
Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Gly Gly		
225	230	235
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser		
245	250	255
Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser		
260	265	270
Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu		
275	280	285
Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg		
290	295	300
Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys		
305	310	315
Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr		

- 195 -

325	330	335
Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr		
340	345	350
Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly		
355	360	365
Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val		
370	375	380
Gln Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr		
385	390	395
Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly		
405	410	415
Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr		
420	425	430
Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp		
435	440	445
Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp		
450	455	460
Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr		
465	470	475
Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser		
485	490	495
Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys		
500	505	

<210> 46

<211> 729

<212> PRT

<213> Искусственная

- 196 -

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 46

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
145 150 155 160

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
165 170 175

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

- 197 -

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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 210 215 220

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 245 250 255

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 260 265 270

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 275 280 285

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 290 295 300

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
 305 310 315 320

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

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

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 355 360 365

Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
 370 375 380

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400

- 198 -

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 405 410 415

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
 450 455 460

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser
 465 470 475 480

Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser
 485 490 495

Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu
 500 505 510

Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg
 515 520 525

Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys
 530 535 540

Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr
 545 550 555 560

Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr
 565 570 575

Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 580 585 590

Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 595 600 605

- 199 -

Gln Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 610 615 620

Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 625 630 635 640

Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr
 645 650 655

Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp
 660 665 670

Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp
 675 680 685

Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr
 690 695 700

Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 705 710 715 720

Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 725

<210> 47
 <211> 729
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 47

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

73

- 201 -

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

- 202 -

450		455		460
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser				
465		470		480
Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser				
	485		490	495
Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu				
	500		505	510
Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg				
	515		520	525
Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys				
	530		535	540
Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr				
545		550		560
Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr				
	565		570	575
Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly				
	580		585	590
Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val				
	595		600	605
Gln Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr				
	610		615	620
Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly				
625		630		640
Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr				
	645		650	655
Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp				

76

- 204 -

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 145 150 155 160

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 165 170 175

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

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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 210 215 220

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 245 250 255

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 260 265 270

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 275 280 285

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 290 295 300

- 205 -

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 305 310 315 320

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

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

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
 355 360 365

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
 370 375 380

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 405 410 415

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro His His
 450 455 460

His His His His His His
 465 470

<210> 49

<211> 600

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

- 206 -

<400> 49

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 145 150 155 160

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 165 170 175

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

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

- 207 -

195	200	205
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
210	215	220
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
225	230	235
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser		
245	250	255
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
260	265	270
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
275	280	285
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
290	295	300
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val		
305	310	315
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
325	330	335
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
340	345	350
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
355	360	365
Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys		
370	375	380
Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
385	390	395
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		

81

- 209 -

<211> 584

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 50

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 145 150 155 160

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 165 170 175

- 210 -

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

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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 210 215 220

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 245 250 255

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 260 265 270

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 275 280 285

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 290 295 300

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
 305 310 315 320

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

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

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
 355 360 365

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
 370 375 380

- 211 -

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 405 410 415

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
 450 455 460

Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser
 465 470 475 480

Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val
 485 490 495

Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu
 500 505 510

Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro
 515 520 525

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile
 530 535 540

Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp
 545 550 555 560

Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 565 570 575

His His His His His His His
 580

- 212 -

<210> 51
 <211> 605
 <212> PRT
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Искусственно синтезированная последовательность

 <400> 51

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

 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

 Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

 Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser
 65 70 75 80

 Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

 Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

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

 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 145 150 155 160

 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

- 213 -

	165		170		175
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln					
	180		185		190
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser					
	195		200		205
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser					
	210		215		220
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr					
	225		230		240
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser					
	245		250		255
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg					
	260		265		270
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro					
	275		280		285
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala					
	290		295		300
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val					
	305		310		320
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr					
	325		330		335
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr					
	340		345		350
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu					
	355		360		365
Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys					

- 214 -

370		375		380
Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser				
385		390		395
				400
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp				
	405		410	415
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser				
	420		425	430
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala				
	435		440	445
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly				
	450		455	460
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly				
465		470		475
				480
Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala				
	485		490	495
Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala				
	500		505	510
Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn				
	515		520	525
Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile				
	530		535	540
Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu				
545		550		555
				560
Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe				
	565		570	575
Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu				

- 215 -

580

585

590

Val Thr Val Ser Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 595 600 605

<210> 52

<211> 589

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 52

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

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

- 216 -

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 145 150 155 160

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 165 170 175

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

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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 210 215 220

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 245 250 255

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 260 265 270

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 275 280 285

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 290 295 300

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
 305 310 315 320

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

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

- 217 -

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
 355 360 365

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
 370 375 380

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 405 410 415

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
 450 455 460

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser
 465 470 475 480

Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser
 485 490 495

Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu
 500 505 510

Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg
 515 520 525

Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys
 530 535 540

Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr
 545 550 555 560

- 218 -

Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr
 565 570 575

Lys Leu Thr Val Leu His His His His His His His His
 580 585

<210> 53
 <211> 610
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 53

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

- 219 -

130	135	140
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly		
145	150	155 160
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
	165	170 175
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
	180	185 190
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
	195	200 205
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
	210	215 220
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
	225	230 235 240
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser		
	245	250 255
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
	260	265 270
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
	275	280 285
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
	290	295 300
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val		
	305	310 315 320
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
	325	330 335
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		

- 220 -

340	345	350
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
355	360	365
Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys		
370	375	380
Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
385	390	395
		400
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
	405	410
		415
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
	420	425
		430
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
	435	440
		445
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly		
	450	455
		460
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys		
465	470	475
		480
Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly Ser Leu Lys		
	485	490
		495
Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn		
	500	505
		510
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile		
	515	520
		525
Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys		
530	535	540
Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu		

94

- 222 -

Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val			
			100					105					110					
Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Phe	Tyr	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr			
		115					120					125						
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro			
	130					135					140							
Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly			
145					150				155					160				
Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn			
			165					170					175					
Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln			
		180					185						190					
Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser			
	195					200					205							
Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser			
210					215					220								
Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr			
225				230				235						240				
His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser			
			245					250					255					
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg			
		260					265					270						
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro			
	275					280					285							
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala			
290					295					300								

- 223 -

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
 305 310 315 320

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

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

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
 355 360 365

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
 370 375 380

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 405 410 415

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
 450 455 460

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val
 465 470 475 480

Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr
 485 490 495

Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala
 500 505 510

- 224 -

Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly
 515 520 525

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 530 535 540

Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu
 545 550 555 560

Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
 565 570 575

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu His His His His His His
 580 585 590

His His

<210> 55
 <211> 615
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 55

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser

- 225 -

65		70		75		80
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser						
	85		90		95	
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val						
	100		105		110	
Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr						
	115		120		125	
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro						
	130		135		140	
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly						
145		150		155		160
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn						
	165		170		175	
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln						
	180		185		190	
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser						
	195		200		205	
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser						
	210		215		220	
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr						
225		230		235		240
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser						
	245		250		255	
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg						
	260		265		270	
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro						

- 226 -

275	280	285
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
290	295	300
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val		
305	310	315 320
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
	325	330 335
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
	340	345 350
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
	355	360 365
Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys		
	370	375 380
Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
385	390	395 400
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
	405	410 415
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
	420	425 430
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
	435	440 445
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly		
	450	455 460
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
465	470	475 480
Gly Ser Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro		

- 227 -

485 490 495
 Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn
 500 505 510
 Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 515 520 525
 Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr
 530 535 540
 Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln
 545 550 555 560
 Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala
 565 570 575
 Met Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser
 580 585 590
 Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Asp
 595 600 605
 Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
 610 615

 <210> 56
 <211> 599
 <212> PRT
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Искусственно синтезированная последовательность

 <400> 56

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

 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

- 228 -

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 145 150 155 160

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 165 170 175

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

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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 210 215 220

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

- 229 -

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 245 250 255

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 260 265 270

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 275 280 285

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 290 295 300

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
 305 310 315 320

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

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

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
 355 360 365

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
 370 375 380

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 405 410 415

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445

- 230 -

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
 450 455 460

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 465 470 475 480

Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro
 485 490 495

Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr
 500 505 510

Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe
 515 520 525

Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala
 530 535 540

Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr
 545 550 555 560

Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr
 565 570 575

Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu His
 580 585 590

His His His His His His His
 595

<210> 57

<211> 610

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 57

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

- 231 -

1	5	10	15
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys	20	25	30
Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	35	40	45
Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu	50	55	60
Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser	65	70	75
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser	85	90	95
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val	100	105	110
Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	115	120	125
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro	130	135	140
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly	145	150	155
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn	165	170	175
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln	180	185	190
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser	195	200	205
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser			

- 232 -

210	215	220
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
225	230	235 240
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser		
	245	250 255
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
	260	265 270
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
	275	280 285
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
	290	295 300
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val		
305	310	315 320
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
	325	330 335
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
	340	345 350
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
	355	360 365
Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys		
	370	375 380
Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
385	390	395 400
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
	405	410 415
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		

- 233 -

420	425	430
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
435	440	445
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly		
450	455	460
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys		
465	470	475 480
Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly Ser Leu Lys		
485	490	495
Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn		
500	505	510
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Cys Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile		
515	520	525
Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys		
530	535	540
Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu		
545	550	555 560
Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val		
565	570	575
Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp		
580	585	590
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp		
595	600	605
Asp Lys		
610		
<210>	58	

- 234 -

<211> 594

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 58

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 145 150 155 160

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 165 170 175

- 235 -

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

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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 210 215 220

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

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 245 250 255

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 260 265 270

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 275 280 285

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 290 295 300

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
 305 310 315 320

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

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

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
 355 360 365

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
 370 375 380

- 236 -

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 405 410 415

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
 450 455 460

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val
 465 470 475 480

Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr
 485 490 495

Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala
 500 505 510

Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly
 515 520 525

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 530 535 540

Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu
 545 550 555 560

Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
 565 570 575

Phe Gly Cys Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu His His His His His His
 580 585 590

- 237 -

His His

<210> 59

<211> 704

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 59

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

- 238 -

145	150	155	160
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn	165	170	175
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln	180	185	190
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser	195	200	205
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser	210	215	220
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr	225	230	235
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser	245	250	255
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg	260	265	270
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro	275	280	285
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala	290	295	300
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val	305	310	315
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	325	330	335
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr	340	345	350
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu			

- 239 -

355	360	365
Pro Pro Ser Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys		
370	375	380
Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
385	390	395 400
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
405	410	415
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
420	425	430
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
435	440	445
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly		
450	455	460
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Lys		
465	470	475 480
Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly Ser Leu Lys		
485	490	495
Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met Asn		
500	505	510
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg Ile		
515	520	525
Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys		
530	535	540
Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu		
545	550	555 560
Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val		

- 240 -

565 570 575
 Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp
 580 585 590
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 595 600 605
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 610 615 620
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 625 630 635 640
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 645 650 655
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 660 665 670
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 675 680 685
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 690 695 700

 <210> 60
 <211> 692
 <212> PRT
 <213> Искусственная

 <220>
 <223> Искусственно синтезированная последовательность

 <400> 60
 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

 Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys
 20 25 30

- 241 -

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asp Tyr Glu Met His Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Ile Asp Pro Lys Thr Gly Asp Thr Ala Tyr Ser
 65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

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

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 145 150 155 160

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 165 170 175

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

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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 210 215 220

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

- 242 -

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
 245 250 255

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 260 265 270

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 275 280 285

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 290 295 300

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
 305 310 315 320

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

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

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu
 355 360 365

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
 370 375 380

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 385 390 395 400

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 405 410 415

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 420 425 430

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 435 440 445

- 243 -

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly
 450 455 460

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ala Val
 465 470 475 480

Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr
 485 490 495

Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala
 500 505 510

Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly
 515 520 525

Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 530 535 540

Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu
 545 550 555 560

Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val
 565 570 575

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Arg Thr Val Ala Ala Pro
 580 585 590

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 595 600 605

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 610 615 620

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 625 630 635 640

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 645 650 655

- 244 -

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 660 665 670

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 675 680 685

Asn Arg Gly Glu
 690

<210> 61
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 61

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

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

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

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

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

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

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser

- 245 -

115

<210> 62

<211> 219

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 62

Asp Val 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 Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln 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 Ser Gln Asn
 85 90 95

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

- 246 -

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> 63
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 63

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

- 247 -

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
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		

121

- 249 -

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

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 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 325 330 335

Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro
 340 345 350

- 250 -

Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr
 355 360 365

Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe
 370 375 380

Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala
 385 390 395 400

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

Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr
 420 425 430

Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
 450 455 460

Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly Ser Leu
 465 470 475 480

Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met
 485 490 495

Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg
 500 505 510

Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 515 520 525

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile Leu Tyr
 530 535 540

Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 545 550 555 560

- 251 -

Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
 565 570 575

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 580 585

<210> 65

<211> 328

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 65

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

- 252 -

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
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 Arg Tyr Thr		
	305	310 315 320
Gln Glu Ser Leu Ser Leu Ser Pro		
	325	

<210> 66

- 253 -

<211> 587

<212> PRT

<213> Искусственная

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 66

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	

- 254 -

Glu Gln Tyr Ala 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 Lys 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 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 325 330 335

Gly Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro
 340 345 350

Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr
 355 360 365

Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe
 370 375 380

- 255 -

Thr Gly Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala
385 390 395 400

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

Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr
420 425 430

Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
435 440 445

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Glu Val
450 455 460

Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly Ser Leu
465 470 475 480

Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala Met
485 490 495

Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Arg
500 505 510

Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
515 520 525

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Gln Ser Ile Leu Tyr
530 535 540

Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
545 550 555 560

Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
565 570 575

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
580 585

- 256 -

<210> 67

<211> 141

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr
 20 25 30

Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr
 35 40 45

Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala
 50 55 60

Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser
 65 70 75 80

Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp
 85 90 95

Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe
 100 105 110

Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala
 115 120 125

Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 130 135 140

<210> 68

<211> 179

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 68

Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro

- 257 -

1 5 10 15
 Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 20 25 30
 Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
 35 40 45
 Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys
 50 55 60
 Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu
 65 70 75 80
 Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys
 85 90 95
 Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp
 100 105 110
 Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg
 115 120 125
 Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser
 130 135 140
 Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala
 145 150 155 160
 Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp
 165 170 175
 Ser Arg Gly

<210> 69
 <211> 173
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

- 258 -

<400> 69

Asp Lys Gln Leu Asp Ala Asp Val Ser Pro Lys Pro Thr Ile Phe Leu
 1 5 10 15

Pro Ser Ile Ala Glu Thr Lys Leu Gln Lys Ala Gly Thr Tyr Leu Cys
 20 25 30

Leu Leu Glu Lys Phe Phe Pro Asp Val Ile Lys Ile His Trp Gln Glu
 35 40 45

Lys Lys Ser Asn Thr Ile Leu Gly Ser Gln Glu Gly Asn Thr Met Lys
 50 55 60

Thr Asn Asp Thr Tyr Met Lys Phe Ser Trp Leu Thr Val Pro Glu Lys
 65 70 75 80

Ser Leu Asp Lys Glu His Arg Cys Ile Val Arg His Glu Asn Asn Lys
 85 90 95

Asn Gly Val Asp Gln Glu Ile Ile Phe Pro Pro Ile Lys Thr Asp Val
 100 105 110

Ile Thr Met Asp Pro Lys Asp Asn Cys Ser Lys Asp Ala Asn Asp Thr
 115 120 125

Leu Leu Leu Gln Leu Thr Asn Thr Ser Ala Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu
 130 135 140

Leu Leu Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala Ile Ile Thr Cys Cys Leu
 145 150 155 160

Leu Arg Arg Thr Ala Phe Cys Cys Asn Gly Glu Lys Ser
 165 170

<210> 70

<211> 204

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

- 259 -

Lys Gln Leu Asp Ala Asp Val Ser Pro Lys Pro Thr Ile Phe Leu Pro
 1 5 10 15

Ser Ile Ala Glu Thr Lys Leu Gln Lys Ala Gly Thr Tyr Leu Cys Leu
 20 25 30

Leu Glu Lys Phe Phe Pro Asp Ile Ile Lys Ile His Trp Gln Glu Lys
 35 40 45

Lys Ser Asn Thr Ile Leu Gly Ser Gln Glu Gly Asn Thr Met Lys Thr
 50 55 60

Asn Asp Thr Tyr Met Lys Phe Ser Trp Leu Thr Val Pro Glu Glu Ser
 65 70 75 80

Leu Asp Lys Glu His Arg Cys Ile Val Arg His Glu Asn Asn Lys Asn
 85 90 95

Gly Ile Asp Gln Glu Ile Ile Phe Pro Pro Ile Lys Thr Asp Val Thr
 100 105 110

Thr Val Asp Pro Lys Asp Ser Tyr Ser Lys Asp Ala Asn Asp Val Thr
 115 120 125

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

Thr Met Asp Pro Lys Asp Asn Trp Ser Lys Asp Ala Asn Asp Thr Leu
 145 150 155 160

Leu Leu Gln Leu Thr Asn Thr Ser Ala Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu Leu
 165 170 175

Leu Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu
 180 185 190

Gly Arg Thr Ala Phe Cys Cys Asn Gly Glu Lys Ser
 195 200

- 260 -

<210> 71
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 71

Pro Ser Tyr Thr Gly Gly Tyr Ala Asp Lys Leu Ile Phe Gly Lys Gly
 1 5 10 15

Thr Arg Val Thr Val Glu Pro Arg Ser Gln Pro His Thr Lys Pro Ser
 20 25 30

Val Phe Val Met Lys Asn Gly Thr Asn Val Ala Cys Leu Val Lys Glu
 35 40 45

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

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

Ala Val Lys Leu Gly Lys Tyr Glu Asp Ser Asn Ser Val Thr Cys Ser
 85 90 95

Val Gln His Asp Asn Lys Thr Val His Ser Thr Asp Phe Glu Val Lys
 100 105 110

Thr Asp Ser Thr Asp His Val Lys Pro Lys Glu Thr Glu Asn Thr Lys
 115 120 125

Gln Pro Ser Lys Ser Cys His Lys Pro Lys Ala Ile Val His Thr Glu
 130 135 140

Lys Val Asn Met Met Ser Leu Thr Val Leu Gly Leu Arg Met Leu Phe
 145 150 155 160

Ala Lys Thr Val Ala Val Asn Phe Leu Leu Thr Ala Lys Leu Phe Phe
 165 170 175

- 261 -

Leu

<210> 72
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Искусственная

<220>
 <223> сигнальная последовательность

<400> 72

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

Val His Ser

<210> 73
 <211> 466
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 73

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

Val His Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser
 20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val
 35 40 45

Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu
 50 55 60

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

- 262 -

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile			
	85	90	95
Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp			
	100	105	110
Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu			
	115	120	125
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser			
	130	135	140
Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys			
	145	150	155
			160
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu			
	165	170	175
Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu			
	180	185	190
Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr			
	195	200	205
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val			
	210	215	220
Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro			
	225	230	235
			240
Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe			
	245	250	255
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val			
	260	265	270
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe			
	275	280	285

- 263 -

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 290 295 300

Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 305 310 315 320

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys
 465

<210> 74

<211> 251

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

- 264 -

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 74

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

Val His Ser Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
 65 70 75 80

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 85 90 95

Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr
 100 105 110

Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val
 115 120 125

Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 130 135 140

Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 145 150 155 160

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 165 170 175

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 180 185 190

- 265 -

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
195 200 205

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
210 215 220

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
225 230 235 240

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
245 250

<210> 75

<211> 484

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 75

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

Val His Ser Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Asn Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
65 70 75 80

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
85 90 95

- 266 -

Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr
 100 105 110

Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val
 115 120 125

Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 130 135 140

Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 145 150 155 160

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 165 170 175

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 180 185 190

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 195 200 205

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 210 215 220

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 225 230 235 240

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Asp Lys Thr His Thr
 245 250 255

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
 260 265 270

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 275 280 285

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 290 295 300

- 267 -

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 305 310 315 320

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 325 330 335

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 340 345 350

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 355 360 365

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 370 375 380

Ser Arg Cys Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
 385 390 395 400

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 405 410 415

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 420 425 430

Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 435 440 445

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 450 455 460

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Asp Tyr Lys Asp
 465 470 475 480

Asp Asp Asp Lys

<210> 76

<211> 233

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

- 268 -

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 76

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

Val His Ser Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser
 20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val
 35 40 45

Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu
 50 55 60

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

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile
 85 90 95

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

Tyr Ser Asn Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 115 120 125

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

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

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

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

- 269 -

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

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

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230

<210> 77

<211> 466

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 77

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

Val His Ser Gln Thr Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser
 20 25 30

Pro Gly Gly Thr Val Thr Leu Thr Cys Gly Ser Ser Thr Gly Ala Val
 35 40 45

Thr Ser Gly Asn Tyr Pro Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 50 55 60

Pro Arg Gly Leu Ile Gly Gly Thr Lys Phe Leu Ala Pro Gly Thr Pro
 65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Leu Gly Gly Lys Ala Ala Leu Thr Leu
 85 90 95

Ser Gly Val Gln Pro Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Val Leu Trp
 100 105 110

- 270 -

Tyr Ser Asn Arg Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 260 265 270

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 275 280 285

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 290 295 300

Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 305 310 315 320

- 271 -

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Asp Lys
 465

<210> 78

<211> 251

<212> FRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 78

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

- 272 -

Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Asn Lys Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
 65 70 75 80

Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser
 85 90 95

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr
 100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Ile
 115 120 125

Ser Tyr Trp Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130 135 140

Ala Ser Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 145 150 155 160

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 165 170 175

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 180 185 190

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 195 200 205

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 210 215 220

- 273 -

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 225 230 235 240

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 245 250

<210> 79

<211> 475

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 79

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

Val His Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val
 20 25 30

Arg Pro Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala
 35 40 45

Phe Thr Asn Tyr Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly
 50 55 60

Leu Glu Trp Ile Gly Asp Ile Phe Pro Gly Ser Gly Asn Ile His Tyr
 65 70 75 80

Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser
 85 90 95

Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Phe Glu Asp Ser Ala
 100 105 110

Val Tyr Phe Cys Ala Arg Leu Arg Asn Trp Asp Glu Pro Met Asp Tyr
 115 120 125

- 274 -

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
 130 135 140

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

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
 165 170 175

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
 180 185 190

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
 195 200 205

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
 210 215 220

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

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala
 245 250 255

Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 260 265 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 275 280 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 290 295 300

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser
 305 310 315 320

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 325 330 335

- 275 -

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 340 345 350

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 355 360 365

Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 370 375 380

Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 385 390 395 400

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 405 410 415

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 420 425 430

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 435 440 445

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 450 455 460

Leu Ser Pro His His His His His His His
 465 470 475

<210> 80

<211> 239

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 80

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

Val His Ser Glu Leu Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val
 20 25 30

- 276 -

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

Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys
 50 55 60

Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu
 65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr
 100 105 110

Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
 115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
 130 135 140

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

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
 165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
 195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

- 277 -

<210> 81
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Искусственно синтезированная последовательность

 <400> 81

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

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

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

 Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

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

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

 Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110

 Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala 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

- 278 -

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 Asp Glu Leu Thr Lys
 355 360 365

- 279 -

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu 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 Tyr 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
 450

<210> 82

<211> 216

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 82

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

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30

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

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80

- 280 -

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Arg Thr Val
100 105 110

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

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
130 135 140

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

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

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

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 83

<211> 443

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 83

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

- 281 -

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

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

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

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

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

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

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

- 282 -

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

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

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

- 283 -

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440

<210> 84

<211> 219

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 84

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

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 Ser Gln Asn
 85 90 95

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

- 284 -

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> 85

<211> 453

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 85

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

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

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

Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
 50 55 60

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

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

- 285 -

Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
 100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala 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 Lys 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

- 286 -

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
 450

<210> 86

<211> 216

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 86

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

- 287 -

Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
 20 25 30

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

Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
 65 70 75 80

Gln Thr Glu Asp Glu Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
 85 90 95

Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Arg Thr Val
 100 105 110

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

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

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

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

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

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
 195 200 205

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

- 288 -

<210> 87
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Искусственно синтезированная последовательность

 <400> 87

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

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

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

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

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

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

 Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

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

 Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

 Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

- 289 -

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Glu Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

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

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

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

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys
 355 360 365

- 290 -

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440

<210> 88

<211> 443

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 88

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

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

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

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

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

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

- 291 -

Thr Arg Phe Tyr Ser Tyr Thr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

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

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
 130 135 140

Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Glu Ser Ser Gly
 165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
 180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
 195 200 205

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

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 290 295 300

- 292 -

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 325 330 335

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

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys
 355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440

<210> 89

<211> 219

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 89

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

- 293 -

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

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 Ser Gln Asn
 85 90 95

Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile 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 Lys 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 Lys Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Lys 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

- 294 -

<210> 90
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <223> Искусственно синтезированная последовательность

 <400> 90

 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

 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 Ser Gln Asn
 85 90 95

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

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

 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Lys 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 Lys Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

- 295 -

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Lys 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> 91

<211> 474

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 91

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu
 35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

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

Pro Phe Thr Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln
 85 90 95

Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr
 100 105 110

- 296 -

Tyr Cys Ala Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp
 115 120 125

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

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

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 210 215 220

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

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala
 245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr
 305 310 315 320

- 297 -

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 355 360 365

Val Cys Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 370 375 380

Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 450 455 460

Ser Pro His His His His His His His His
 465 470

<210> 92

<211> 233

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Искусственно синтезированная последовательность

<400> 92

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

- 298 -

Val His Ser Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val
 20 25 30

Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
 35 40 45

Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg
 50 55 60

Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg
 65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser
 85 90 95

Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn
 100 105 110

Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr
 115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 130 135 140

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

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 165 170 175

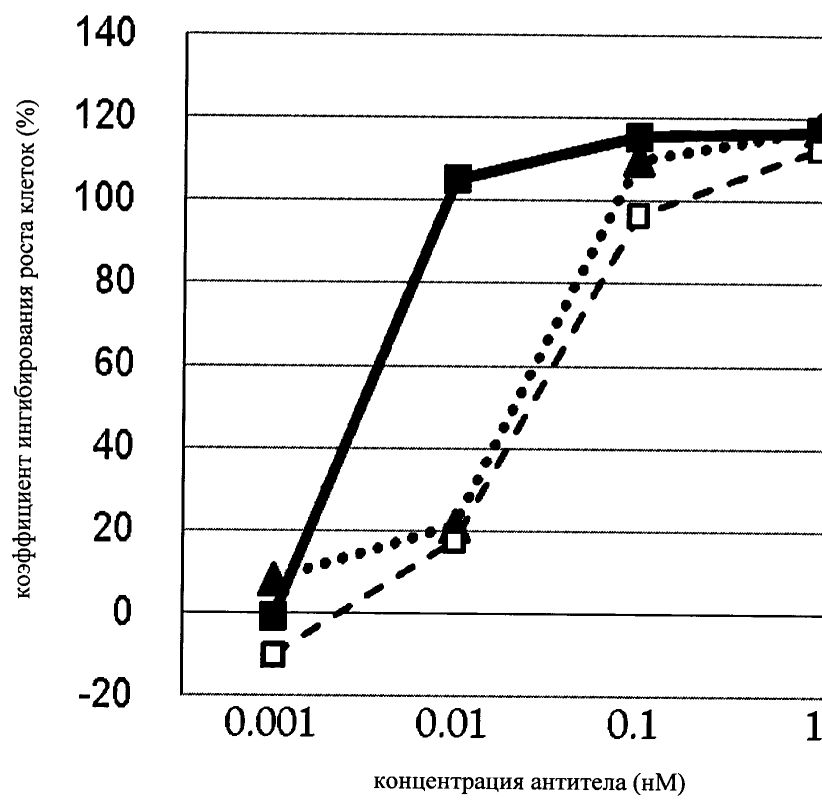
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 210 215 220

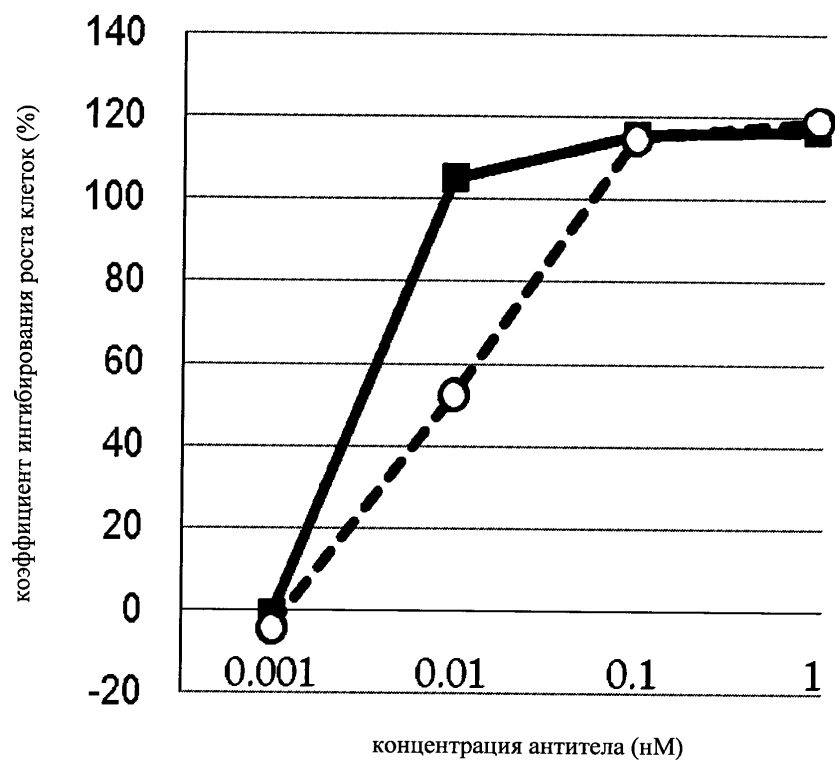
- 299 -

Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys
225						230		



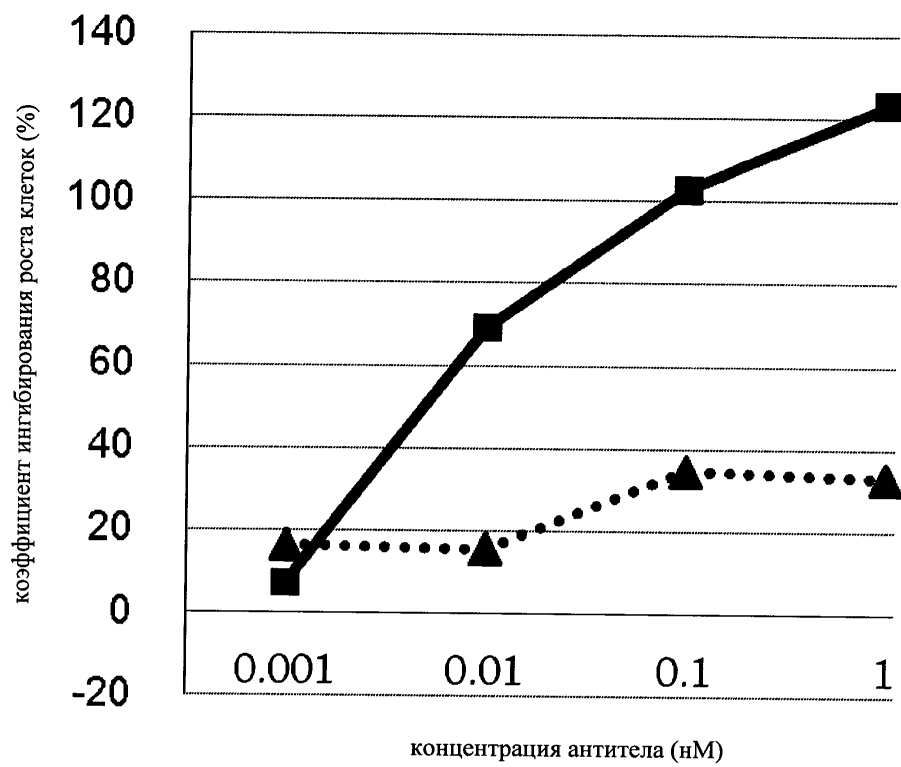
Фиг. 1

2



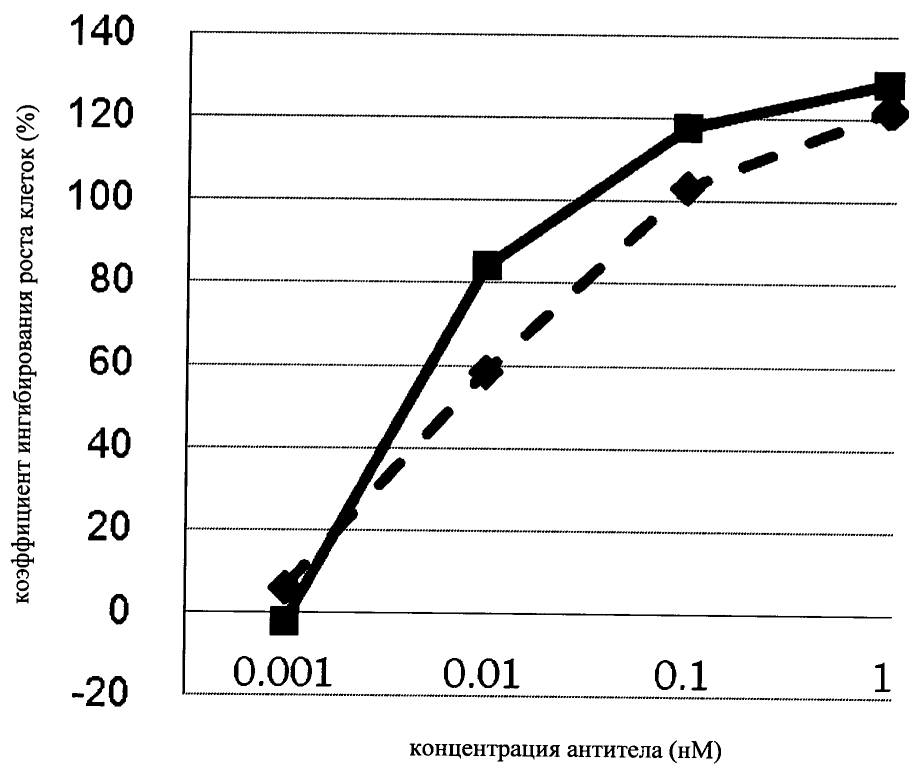
Фиг. 2

3



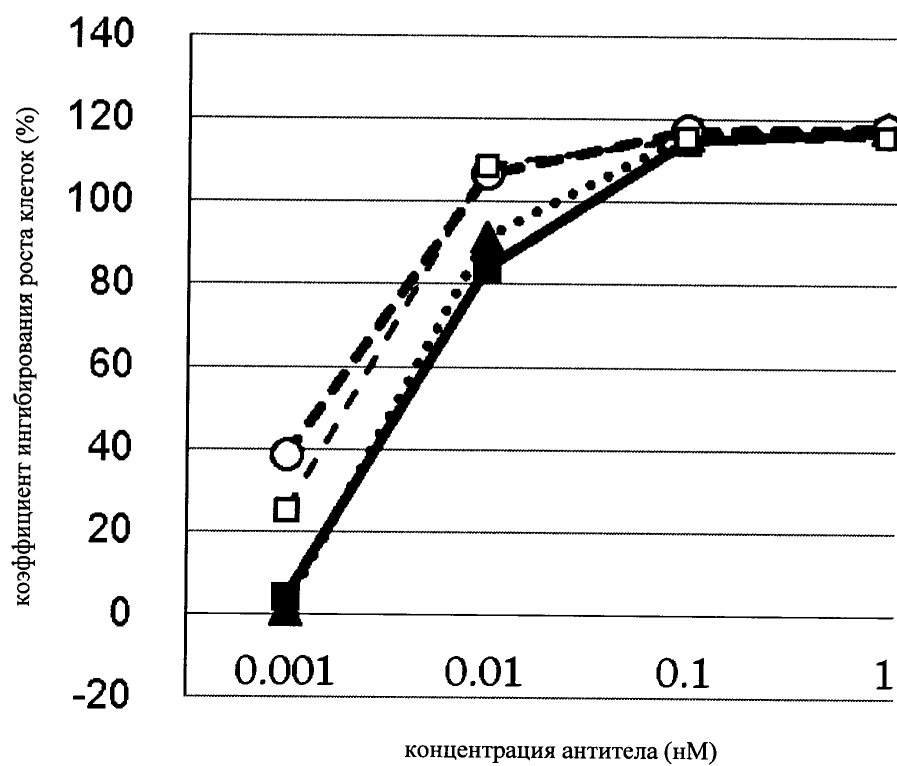
Фиг. 3

4



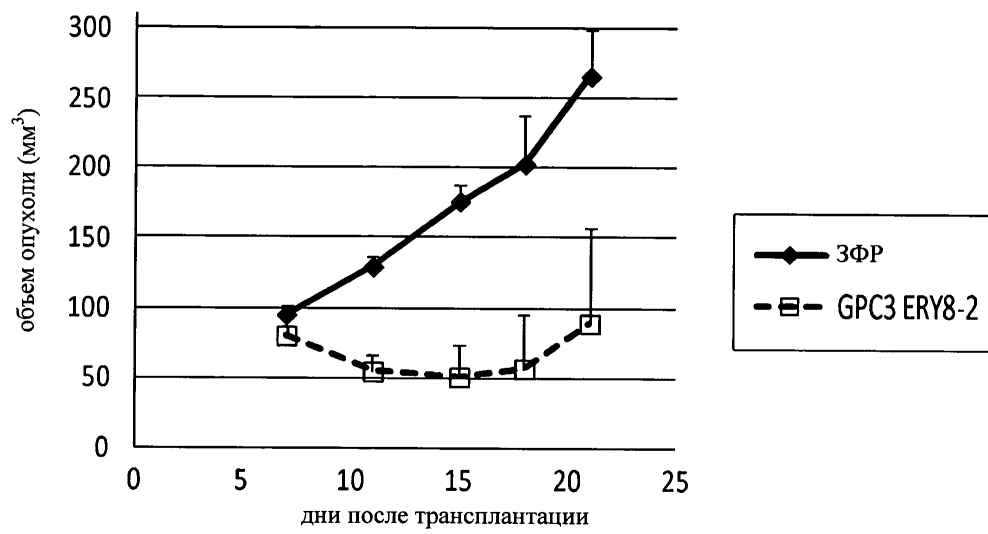
Фиг. 4

5

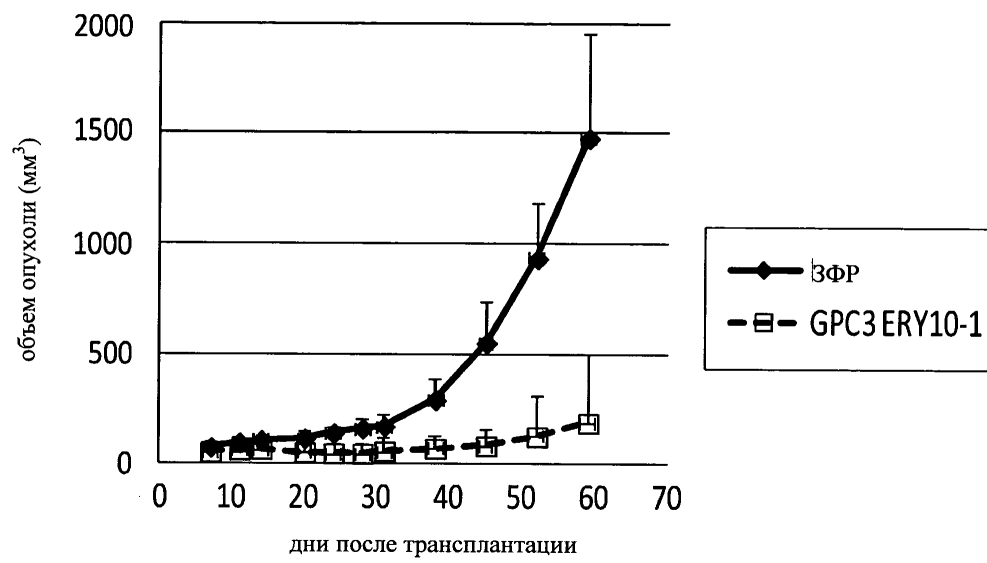


Фиг. 5

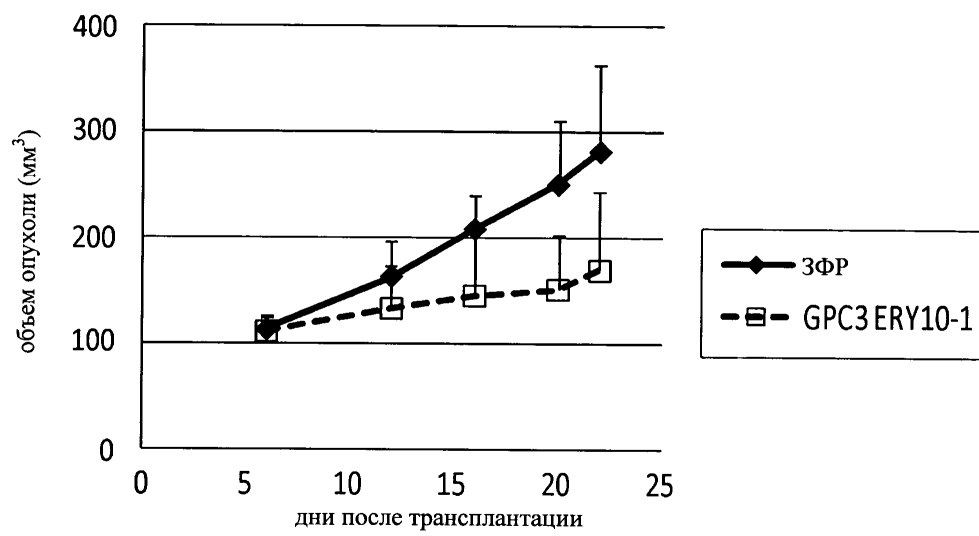
6



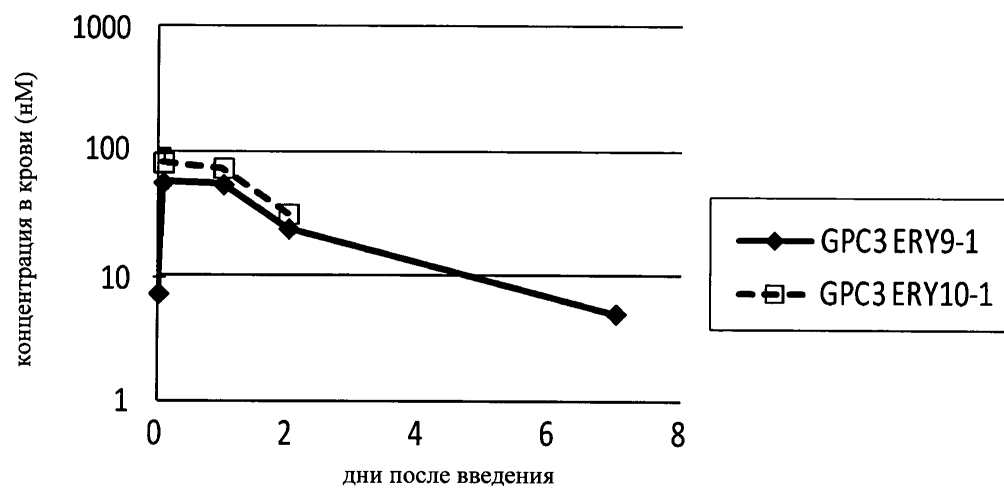
Фиг. 6



Фиг. 7

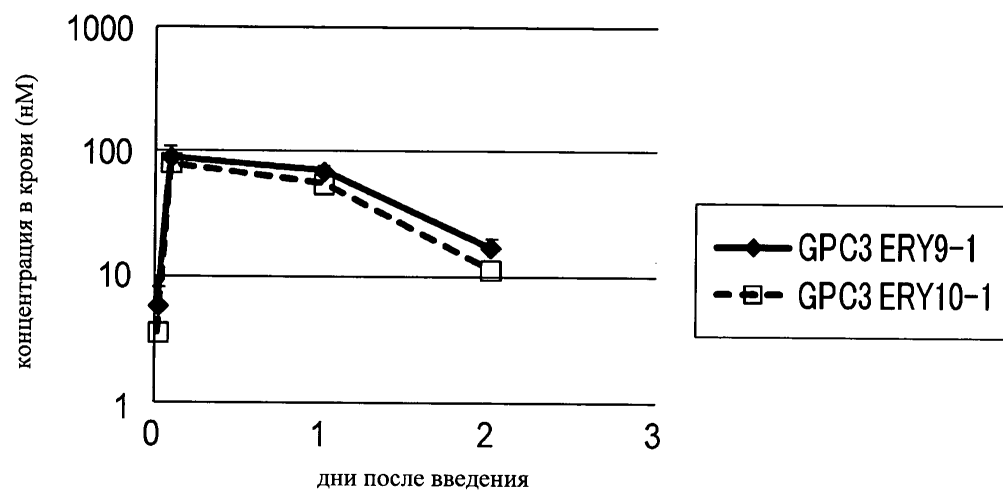


Фиг. 8



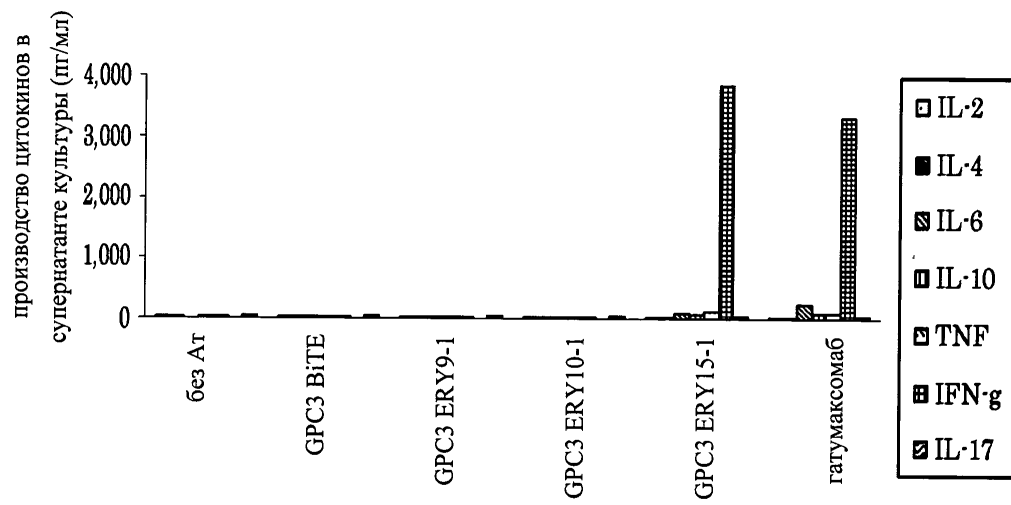
Фиг. 9

10

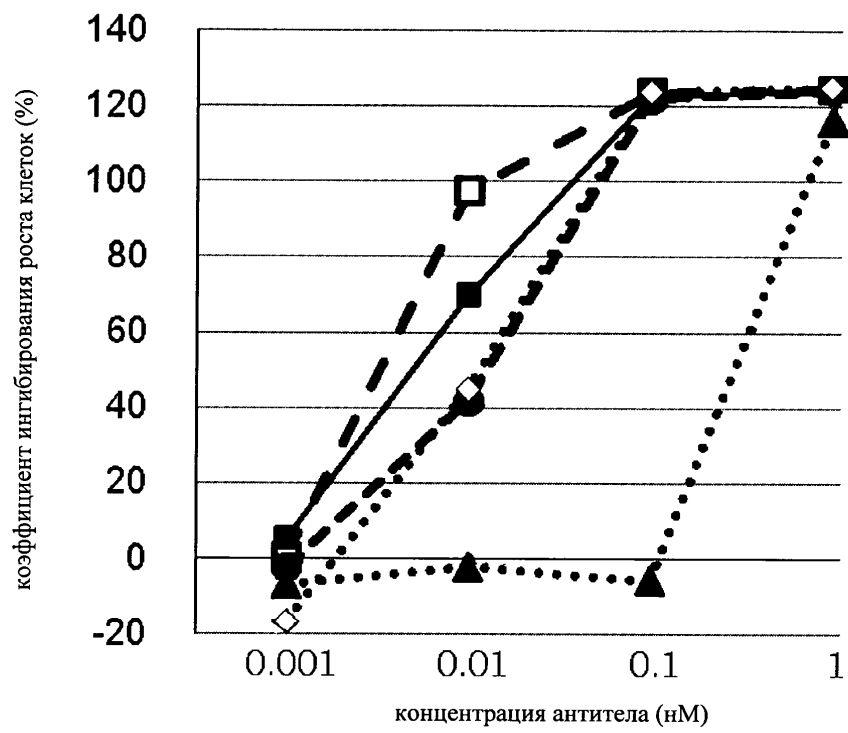


Фиг. 10

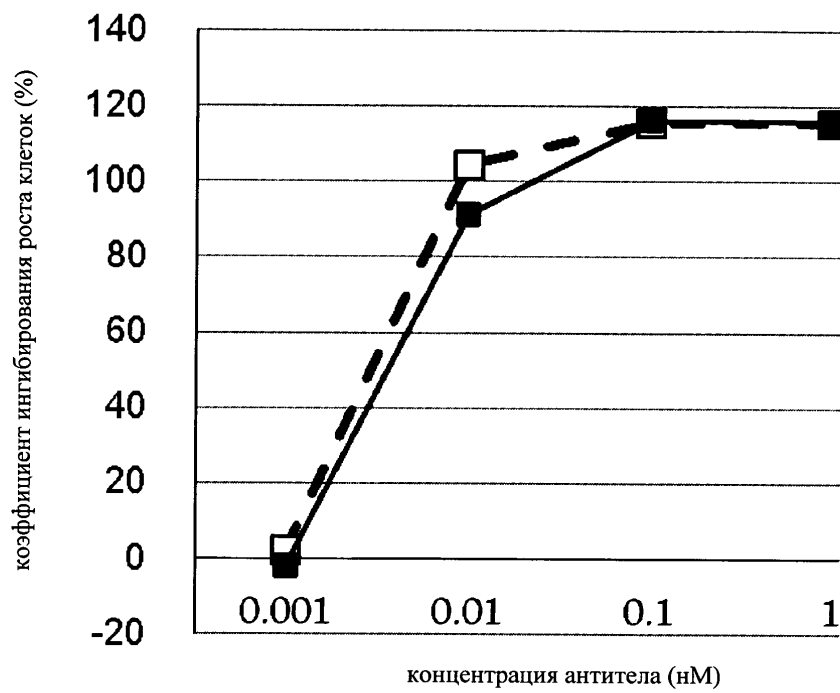
11



Фиг. 11

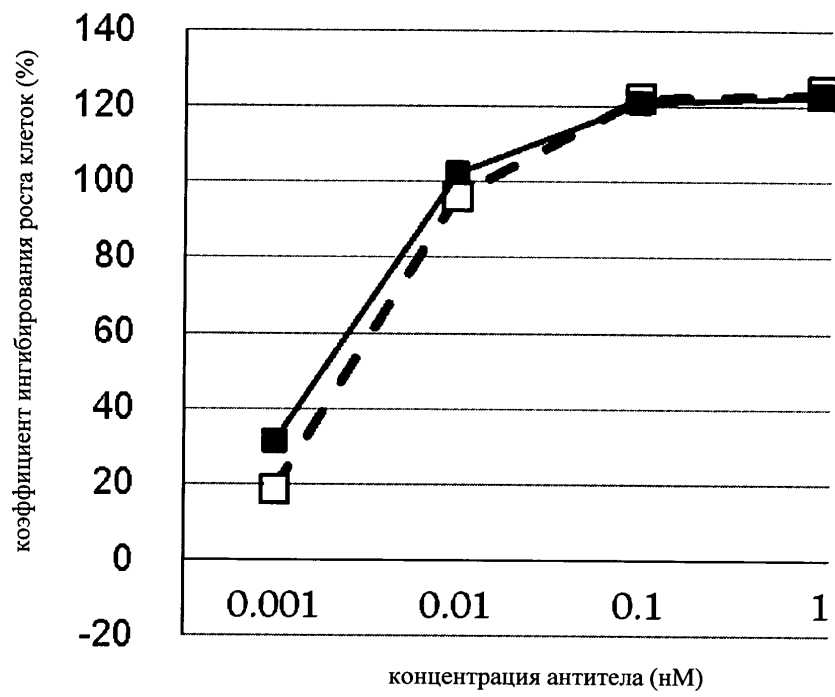


Фиг. 12

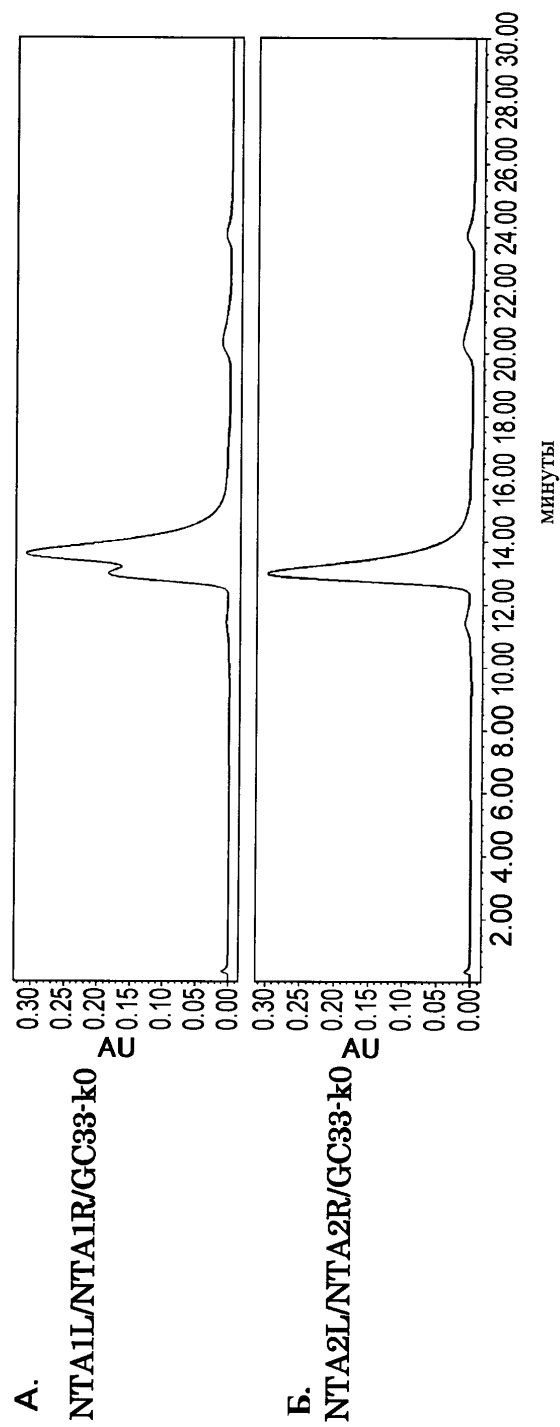


Фиг. 13

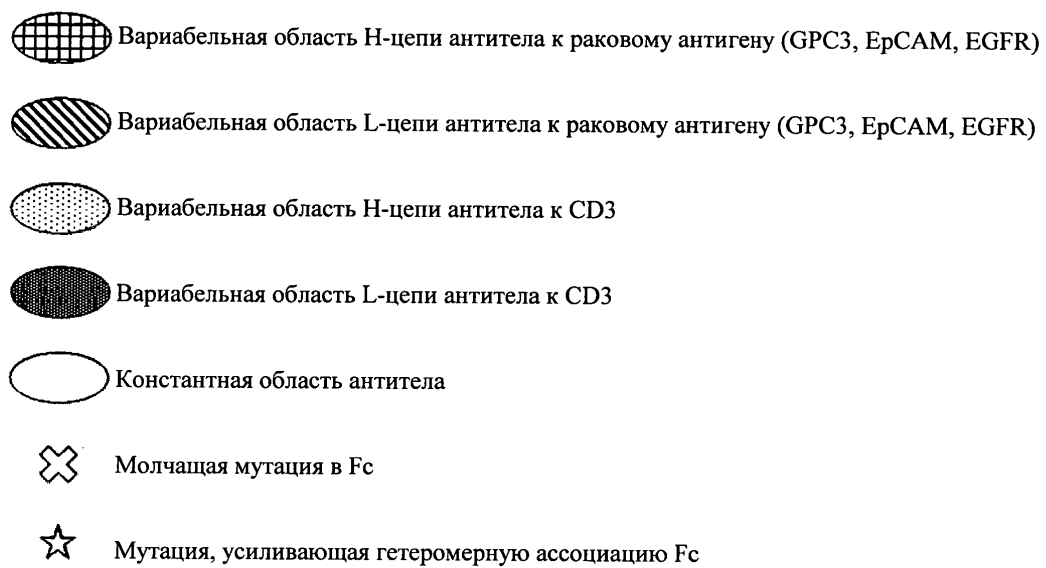
14



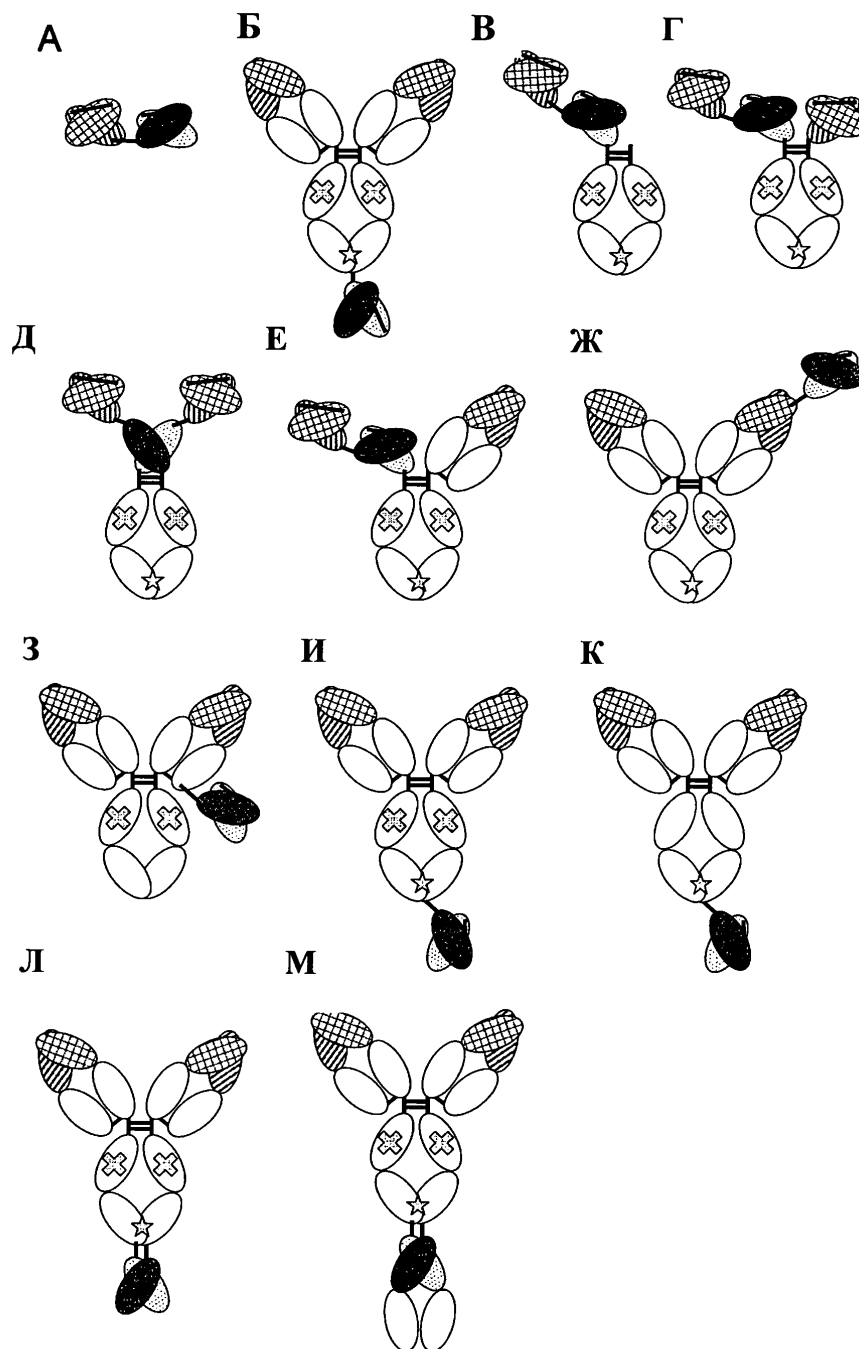
Фиг. 14



Фиг. 15

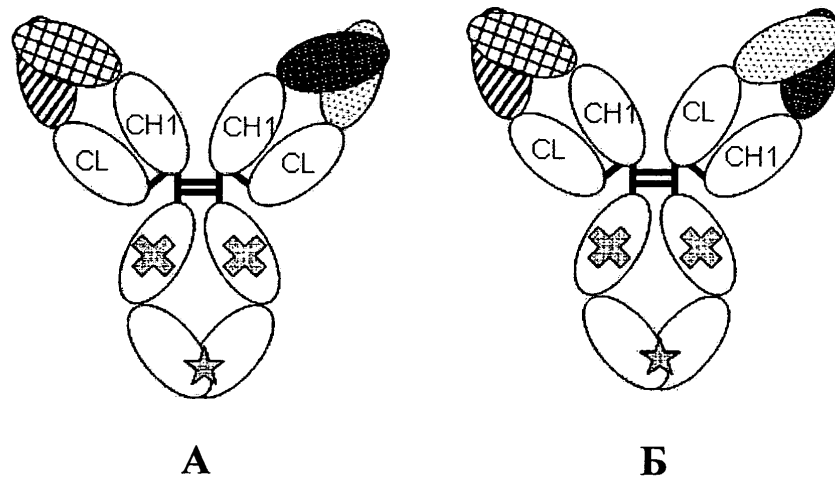


Фиг. 16



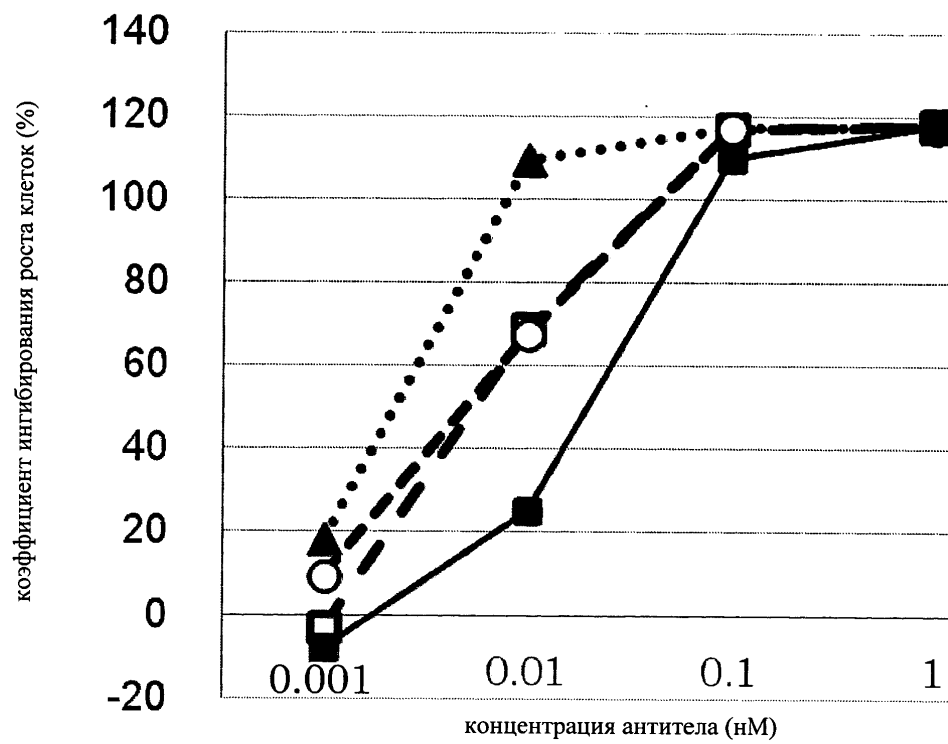
Фиг. 17

Фиг. 18

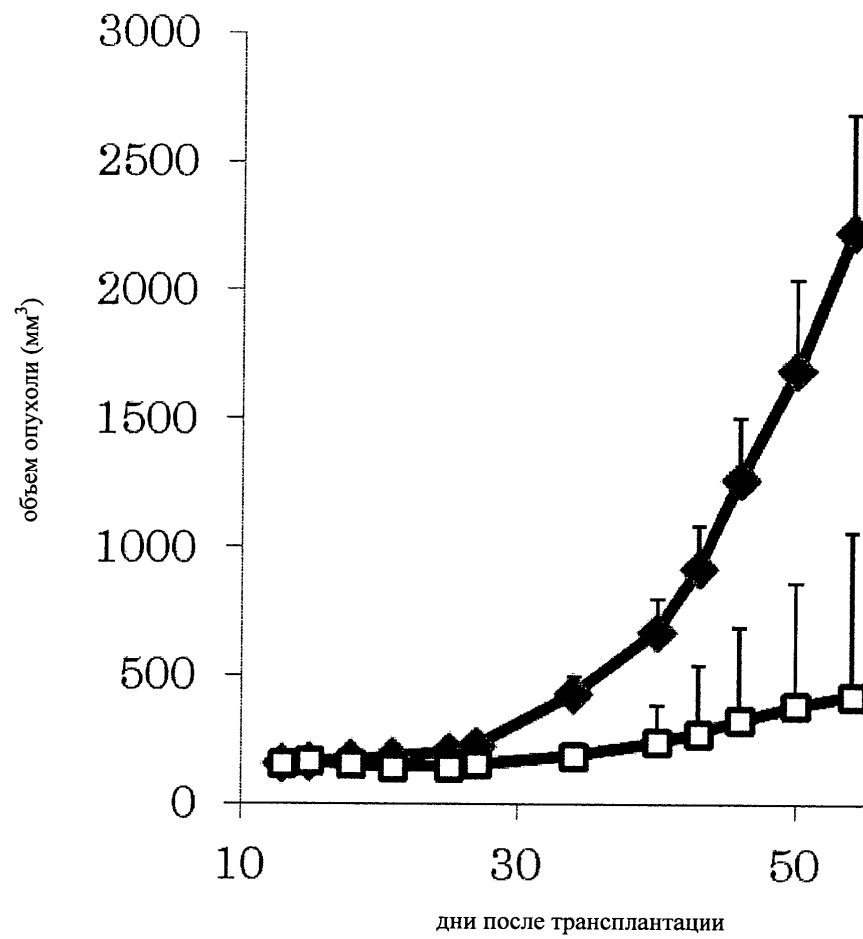


Фиг. 19

20

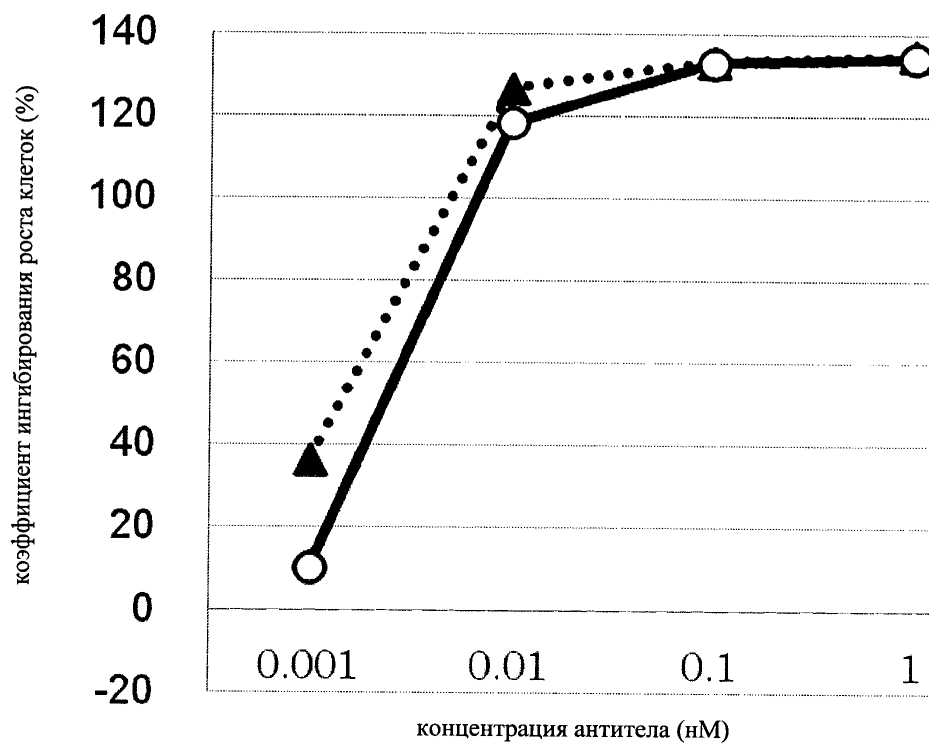


Фиг. 20

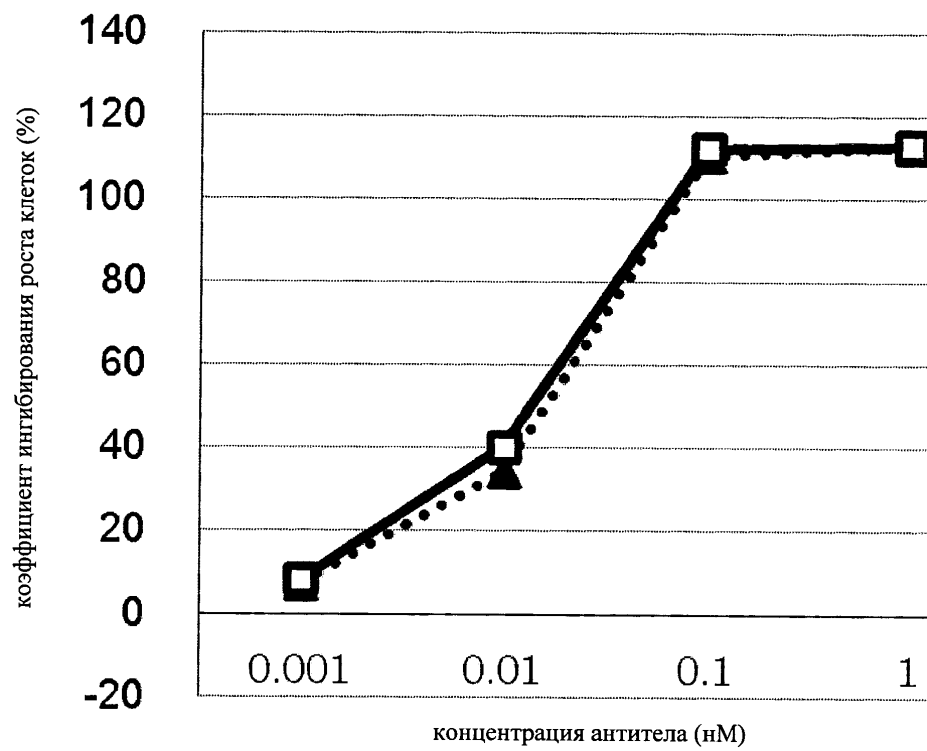


Фиг. 21

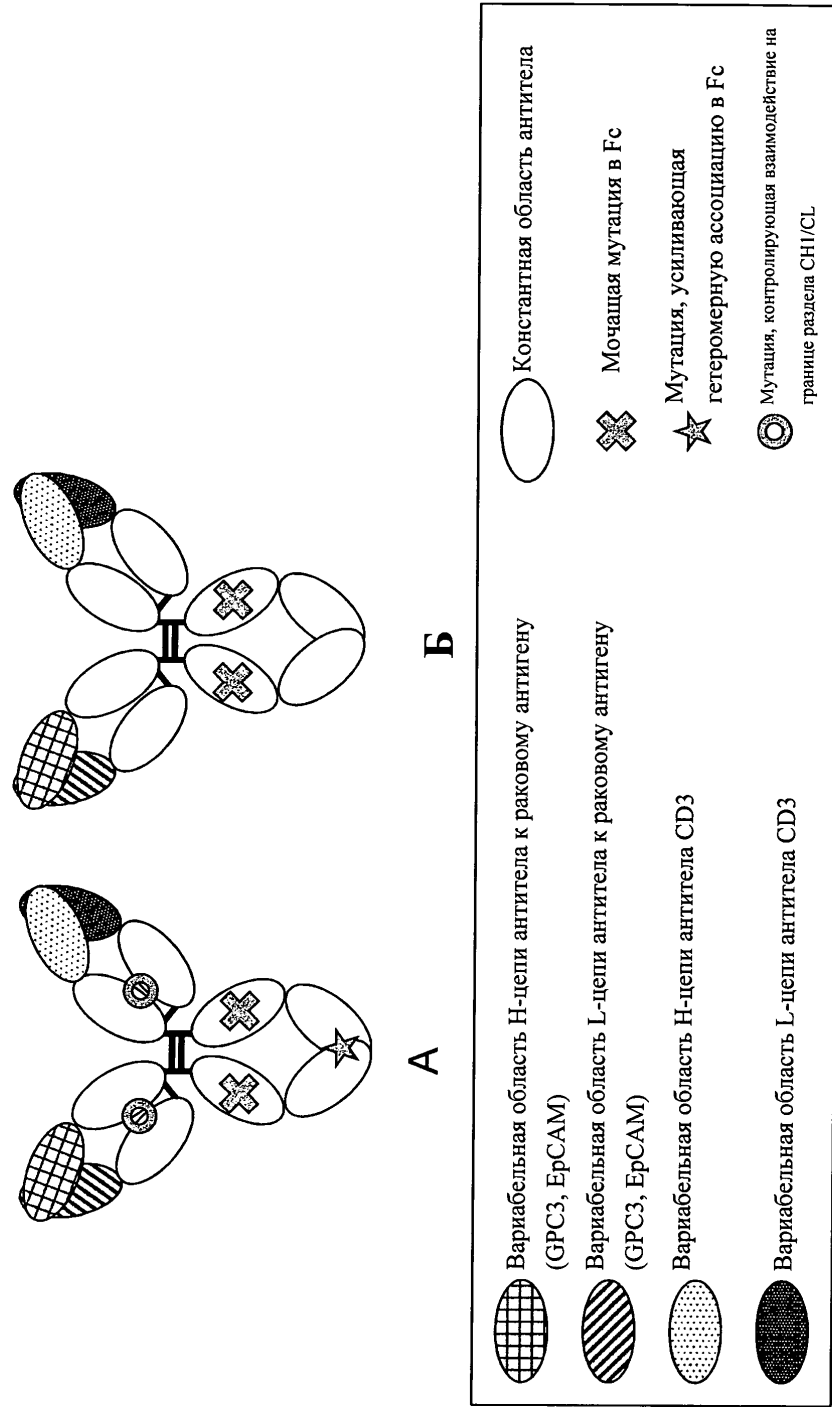
22



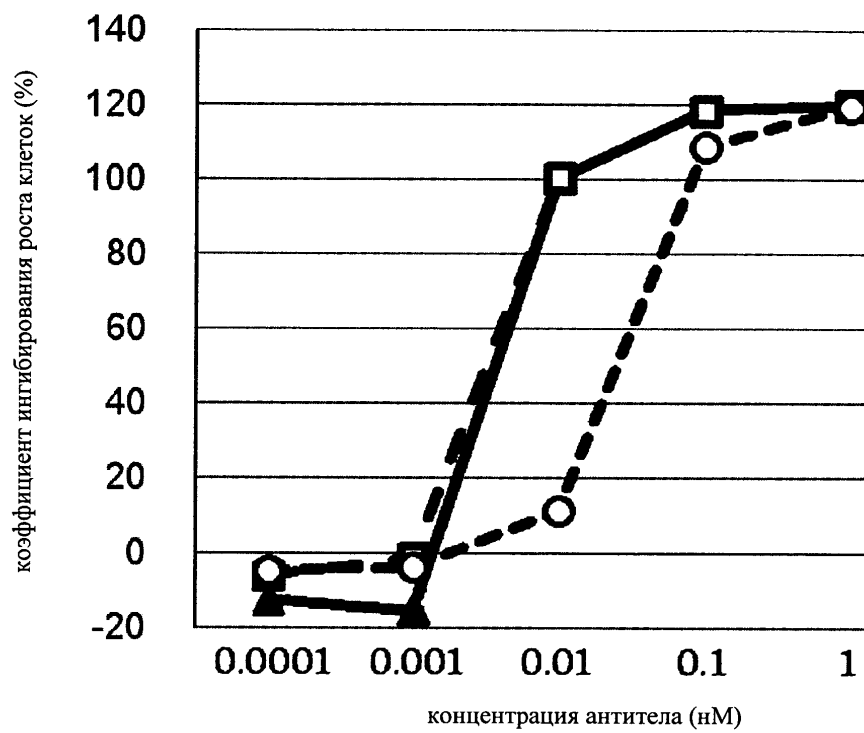
Фиг. 22



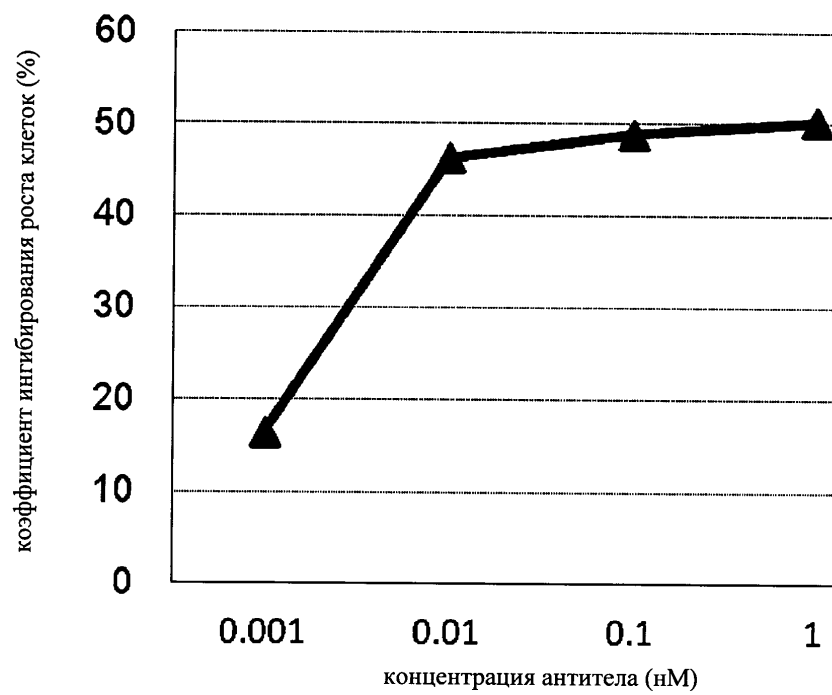
Фиг. 23



Фиг. 24



Фиг. 25



Фиг. 26