

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

*C07K 2319/21 (2006.01); B01J 20/3274 (2006.01); B01J 20/3272 (2006.01); B01J 20/286 (2006.01); C07K 14/31 (2006.01); B01D 15/3809 (2006.01); C07K 1/22 (2006.01); C07K 16/1271 (2006.01)*

(21)(22) Заявка: 2016130934, 06.06.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
06.06.2012Дата регистрации:  
13.02.2018

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
08.06.2011 US 61/494.701Номер и дата приоритета первоначальной заявки,  
из которой данная заявка выделена:  
2013154493 08.06.2011

(45) Опубликовано: 13.02.2018 Бюл. № 5

Адрес для переписки:

119019, Москва, Гоголевский б-р, 11, этаж 3,  
"Гоулинг ВЛГ (Интернэшнл) Инк.", Карпенко  
Оксана Юрьевна

(72) Автор(ы):

СПЕКТОР Шари (US),  
СМИТ Роберт (US),  
ОРЛАНДО Джо (US),  
БИАН Нанинг (US)

(73) Патентообладатель(и):

ЕМД МИЛЛИПОР КОРПОРЕЙШН (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: 20100221844 A1, 24.12.2008. US  
20100063256 A1, 11.08.2008. RU 2415865 C2,  
10.04.2011.(54) ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МАТРИЦЫ, СОДЕРЖАЩИЕ НОВЫЕ ЛИГАНДЫ НА ОСНОВЕ  
БЕЛКА A STAPHYLOCOCCUS AUREUS

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к  
хроматографическим матрицам, включающим  
лиганды на основе одного или нескольких  
доменов связывающихся с иммуноглобулиномбелков, таких как белок А (SpA) Staphylococcus  
aureus, а также способам их применения. 2 н. и 14  
з.п. ф-лы, 9 ил., 4 табл.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*C07K 17/00* (2006.01)  
*C07K 1/22* (2006.01)  
*C07K 16/12* (2006.01)  
*C07K 14/31* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*C07K 2319/21* (2006.01); *B01J 20/3274* (2006.01); *B01J 20/3272* (2006.01); *B01J 20/286* (2006.01); *C07K 14/31* (2006.01); *B01D 15/3809* (2006.01); *C07K 1/22* (2006.01); *C07K 16/1271* (2006.01)

(21)(22) Application: **2016130934, 06.06.2012**

(24) Effective date for property rights:  
**06.06.2012**

Registration date:  
**13.02.2018**

Priority:

(30) Convention priority:  
**08.06.2011 US 61/494.701**

Number and date of priority of the initial application,  
from which the given application is allocated:  
**2013154493 08.06.2011**

(45) Date of publication: **13.02.2018 Bull. № 5**

Mail address:

**119019, Moskva, Gogolevskij b-r, 11, etazh 3,  
"Gouling VLG (Interneshnl) Ink.", Karpenko  
Oksana Yurevna**

(72) Inventor(s):

**SPECTOR Shari (US),  
SMITH Robert (US),  
ORLANDO Joe (US),  
BIAN Nanying (US)**

(73) Proprietor(s):

**EMD MILLIPORE CORPORATION (US)**

(54) **CHROMATOGRAPHIC MATRICES CONTAINING NEW LIGANDS BASED ON STAPHYLOCOCCUS AUREUS PROTEIN A**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to chromatographic  
matrices, including ligands based on one or more  
domains communicating with protein immunoglobulin,

such as protein A of Staphylococcus aureus (SpA), as  
well as to ways of their application.

EFFECT: expansion of application field.

16 cl, 9 dwg, 4 tbl

## Родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США №61/494701, поданной 8 июня 2011 года, включенной в настоящий документ при помощи ссылки в ее полном объеме.

5 Область техники, к которой относится настоящее изобретение

Настоящее изобретение относится к хроматографическим матрицам, содержащим лиганды на основе одного или нескольких доменов связывающихся с иммуноглобулином белков, таких как белок A (SpA) *Staphylococcus aureus*, а также способам их применения.

Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

10 Применяемые в аффинной хроматографии лиганды, как правило, придают свойство высокой селективности к целевой молекуле, таким образом приводя к высокому выходу, высокой чистоте и быстрой и экономичной очистке целевых молекул. Реагенты на основе белка A *Staphylococcus aureus* и хроматографические матрицы нашли широкое применение в области аффинной хроматографии для захвата и очистки антител и Fc-содержащих белков, а также в способах выявления антител в аналитическом масштабе по причине их способности связывать IgG без существенного влияния на аффинность иммуноглобулина к антигену.

Соответственно, были разработаны различные содержащие лиганды на основе белка A реагенты и среды, и они коммерчески доступны, например, ProSep®-vA High Capacity, 20 ProSep® vA Ultra и ProSep® UltraPlus (MILLIPORE) и Protein A Sepharose™, MabSelect™, MabSelect Xtra™, MabSelect SuRe™ (GE HEALTHCARE), MabSelect SuRe™ LX и Poros MabCapture A™ (LIFE TECHNOLOGIES).

Для того чтобы сохранить селективность хроматографических лигандов, в том числе связанных с твердыми подложками лигандов, таких как связанный с 25 хроматографическими матрицами SpA, матрицы необходимо очищать, и, как правило, их очищают в кислых или основных условиях, например, при помощи гидроксида натрия (NaOH). Например, стандартный способ, который применяют для очистки и восстановления матрицы, представляет собой протокол очистки без разборки (CIP) с применением основания, который, как правило, предусматривает обработку связанной 30 с лигандами матрицы посредством NaOH в концентрации, которая варьирует в диапазоне от 0,05 М до 1 М, что в результате дает pH в диапазоне 12,7-14,0. Как правило, проведение с матрицей для аффинной хроматографии повторных циклов CIP со временем приводит к значительной потере связывающей способности матрицы с целевой молекулой, в результате чего при осуществлении способа необходимо большее 35 количество зачастую очень дорогих лигандов, которые связываются с матрицами. Это как не экономично, так и не желательно, поскольку приводит к тому, что способ очистки становится затратным, а также длительным.

Краткое описание настоящего изобретения

Ранее в данной области техники были описаны хроматографические матрицы на 40 основе белка A, у которых, судя по всему, наблюдают уменьшенную потерю связывающей способности по отношению к целевой молекуле после обработки основными условиями. См., например, публикацию заявки на выдачу патента США №20100221844, в которой описаны матрицы для аффинной хроматографии, включающие В или Z домены дикого типа (д.т.) SpA с многоточечным прикреплением к матрице, у 45 которых наблюдают до 95% от начальной связывающей способности даже после воздействия 0,5 М NaOH в течение 5 часов или дольше. Также, в публикации заявки на выдачу патента США №20100048876 описана хроматографическая матрица, включающая домен С дикого типа SpA, а также домен С, содержащий делецию

аминокислотных остатков 3-6, у которой, судя по всему, наблюдают до 95% от изначальной связывающей способности после воздействия 0,5 М в течение 5 часов. Эти лиганды иммобилизованы с помощью одноточечного прикрепления по цистеину к матрице. Кроме того, были описаны хроматографические матрицы, которые включают домены белка А, содержащие мутации в одном или нескольких аспарагиновых остатках белка, причем у матриц, судя по всему, наблюдают сниженную потерю связывающей способности по отношению к SpA дикого типа после воздействия основными условиями, и, судя по всему, они иммобилизованы посредством одноточечного прикрепления к матрице. См., например, патент США №6831161.

Несмотря на то, что у вышеупомянутых матриц для аффинной хроматографии, судя по всему, наблюдают сниженную потерю связывающей способности в отношении целевой молекулы после воздействия щелочными условиями, у некоторых из этих матриц, судя по всему, наблюдают большую степень фрагментации лиганда, которую, например, видно с помощью SDS-PAGE и/или эксклюзионной хроматографии (SEC), после воздействия щелочными условиями. Такая фрагментация является нежелательной, поскольку большая степень фрагментации лиганда дает меньшие размеры присутствующего лиганда, которого сложнее удалить и отделить от целевой молекулы, что, таким образом, повышает вероятность того, что такие потенциально иммуногенные фрагменты будут совместно очищаться с терапевтической целевой молекулой. Кроме того, большая степень фрагментации приводит к повышенной потере связывающей способности матрицы в отношении целевой молекулы.

Настоящее изобретение относится к лигандам для аффинной хроматографии и включающим их матрицам, причем лиганды в своей основе представляют собой один или несколько доменов белка А (SpA) *Staphylococcus aureus* с делецией от N-конца, начиная с положения 1 или положения 2 в домене. У этих лигандов и матриц наблюдают сниженную фрагментацию при применении в очистке, о чем свидетельствуют результаты методик SDS-PAGE и/или SEC, по сравнению с некоторыми описанными ранее лигандами, таким образом делая их более привлекательными и рентабельными кандидатами для применения в аффинной хроматографии.

В соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к матрицам для аффинной хроматографии, которые содержат один или несколько доменов В SpA с делецией, один или несколько доменов С SpA с делецией или один или несколько доменов Z SpA с делецией, причем один или несколько доменов прикреплены к твердой подложке.

В соответствии с одним вариантом осуществления матрица для аффинной хроматографии по настоящему изобретению содержит прикрепленный к твердой подложке лиганд, причем лиганд содержит один или несколько доменов В белка А (SpA) *Staphylococcus aureus*, причем по меньшей мере один домен В содержит делецию по меньшей мере 3 последовательных аминокислот с N-конца. В соответствии с другим вариантом осуществления матрица для аффинной хроматографии по настоящему изобретению содержит прикрепленный к твердой подложке лиганд, причем лиганд содержит один или несколько доменов С белка А (SpA) *Staphylococcus aureus*, причем по меньшей мере один домен С содержит делецию по меньшей мере 3 последовательных аминокислот с N-конца.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления матрица для аффинной хроматографии по настоящему изобретению содержит прикрепленный к твердой подложке лиганд, причем лиганд содержит один или несколько доменов Z белка А (SpA) *Staphylococcus aureus*, причем по меньшей мере один домен Z содержит делецию по меньшей мере 3 последовательных аминокислот с N-конца.



В соответствии с другими вариантами осуществления матрица для аффинной хроматографии по настоящему изобретению содержит прикрепленный к твердой подложке лиганд, причем лиганд содержит два или более доменов В, два или более доменов С, или два или более доменов Z, или любую комбинацию доменов В, С и Z, причем по меньшей мере один из доменов В, С или Z содержит делецию по меньшей мере 3 последовательных аминокислот с N-конца.

В соответствии с различными вариантами осуществления по настоящему изобретению к твердой подложке прикреплены несколько центров на каждом лиганде (т.е. многоточечное прикрепление).

В соответствии с различными вариантами осуществления по настоящему изобретению у лиганда наблюдают сниженную фрагментацию, по результатам SDS-PAGE или эксклюзионной хроматографии (SEC), по сравнению с его аналогом д.т. после воздействия на лиганд или содержащую лиганд матрицу 0,5 М NaOH в течение по меньшей мере 5 часов.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления по настоящему изобретению лиганд содержит делецию 3 аминокислот с N-конца, делецию 4 аминокислот с N-конца или делецию 5 аминокислот с N-конца, причем к твердой подложке прикреплены несколько центров на лиганде, таким образом формируя матрицу для аффинной хроматографии.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления лиганд имеет аминокислотную последовательность, изложенную в любой из SEQ ID NO: 13-42, SEQ ID NO: 55-84 и SEQ ID NO: 93-94.

В соответствии с другим вариантом осуществления лиганд по настоящему изобретению имеет следующую структуру:  $[(X)_n, (Y)_m]_{n+m}$ , где X представляет собой домен В, домен Z или домен С SpA, n представляет собой число доменов, варьирующее в диапазоне от нуля до (m-1), Y представляет собой домен В, или домен Z, или домен С SpA по меньшей мере с 3 удаленными с N-конца последовательными аминокислотами, и m представляет собой число доменов Y, варьирующее в диапазоне от одного до восьми, причем к твердой подложке (например, хроматографической матрице) прикреплены несколько центров на лиганде.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления по настоящему изобретению лиганд содержит два домена В, или два домена Z, или два домена С SpA, или один домен В и один домен С, или один домен В и один домен Z, или один домен С и один домен Z, причем по меньшей мере один домен В, или по меньшей мере один домен Z, или по меньшей мере один домен С включает делецию трех последовательных аминокислот с N-конца, или делецию четырех последовательных аминокислот с N-конца, или делецию пяти последовательных аминокислот с N-конца. Понятно, что различные домены могут быть расположены в любом порядке.

В соответствии с другим вариантом осуществления лиганд по настоящему изобретению содержит три домена В, или три домена Z, или три домена С, или любую комбинацию доменов В, С или Z в любом порядке, причем по меньшей мере один домен В, или по меньшей мере один домен Z или по меньшей мере один домен С содержит делецию трех последовательных аминокислот с N-конца, или делецию четырех последовательных аминокислот с N-конца, или делецию пяти последовательных аминокислот с N-конца.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления лиганд по настоящему изобретению содержит четыре домена В, или четыре домена Z, или четыре домена С, или любую комбинацию доменов В, Z или С в любом порядке, причем по меньшей мере

один домен В, или по меньшей мере один домен Z, или по меньшей мере один домен С содержит делецию трех последовательных аминокислот с N-конца, или делецию четырех последовательных аминокислот с N-конца, или делецию пяти последовательных аминокислот с N-конца.

5 В соответствии с еще одним вариантом осуществления лиганд по настоящему изобретению содержит пять доменов В, или пять доменов Z, или пять доменов С, или любую комбинацию доменов В, Z или С в любом порядке, причем по меньшей мере один домен В, или по меньшей мере один домен Z, или по меньшей мере один домен С содержит делецию трех последовательных аминокислот с N-конца, или делецию четырех  
10 последовательных аминокислот с N-конца, или делецию пяти последовательных аминокислот с N-конца.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления лиганд по настоящему изобретению содержит шесть доменов В, или шесть доменов Z, или шесть доменов С, или любую комбинацию доменов В, Z или С в любом порядке, причем по меньшей мере  
15 один домен В, или по меньшей мере один домен Z или по меньшей мере один домен С содержит делецию трех последовательных аминокислот с N-конца, или делецию четырех последовательных аминокислот с N-конца, или делецию пяти последовательных аминокислот с N-конца.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления лиганд по настоящему изобретению содержит семь доменов В, или семь доменов Z, или семь доменов С, или любую комбинацию доменов В, Z или С в любом порядке, причем по меньшей мере  
20 один домен В, или по меньшей мере один домен Z, или по меньшей мере один домен С содержит делецию трех последовательных аминокислот с N-конца, или делецию четырех последовательных аминокислот с N-конца, или делецию пяти последовательных аминокислот с N-конца.  
25

В соответствии со следующим вариантом осуществления лиганд по настоящему изобретению содержит восемь доменов В, или восемь доменов Z, или восемь доменов С, или любую комбинацию доменов В, Z или С в любом порядке, причем по меньшей мере один домен В, или по меньшей мере один домен Z, или по меньшей мере один  
30 домен С содержит делецию трех последовательных аминокислот с N-конца, или делецию четырех последовательных аминокислот с N-конца, или делецию пяти последовательных аминокислот с N-конца.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способам применения матриц для аффинной хроматографии. Соответственно, настоящее изобретение относится к способу  
35 аффинной очистки одной или нескольких целевых молекул (например, иммуноглобулинов или Fc-содержащих белков) из образца, причем способ включает следующие этапы: (а) получение образца, содержащего одну или несколько целевых молекул (например, иммуноглобулинов или Fc-содержащих белков); (b) контактирование  
40 образца с матрицей по настоящему изобретению в таких условиях, чтобы одна или несколько целевых молекул (например, иммуноглобулины или Fc-содержащие белки) связались с матрицей; и (с) выделение одной или нескольких связавшихся целевых молекул (например, иммуноглобулинов или Fc-содержащих белков) путем элюирования в подходящих условиях, таких как, например, подходящий pH.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления матрица для аффинной  
45 хроматографии по настоящему изобретению сохраняет по меньшей мере 95% от изначальной связывающей способности в отношении целевой молекулы через 5 часов, или через 10 часов, или через 15 часов, или через 20 часов, или через 25 часов, или через 30 часов инкубации в 0,5 М NaOH.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления матрица для аффинной хроматографии по настоящему изобретению сохраняет по меньшей мере 95% от изначальной связывающей способности через 5 часов инкубации в 0,5 М NaOH.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления матрица для аффинной хроматографии по настоящему изобретению сохраняет по меньшей мере 95% от изначальной связывающей способности в отношении целевой молекулы через 25 часов инкубации в 0,1 М NaOH; по меньшей мере 85% от изначальной связывающей способности в отношении целевой молекулы через 25 часов инкубации в 0,3 М NaOH или по меньшей мере 65% от изначальной связывающей способности в отношении целевой молекулы через 25 часов инкубации в 0,5 М NaOH.

Иммуноглобулины, которые могут быть связаны различными описываемыми в настоящем документе лигандами, включают, например, IgG, IgA и IgM или любой химерный белок, содержащий антитело и любой фрагмент антитела, который может связываться с SpA.

Также настоящее изобретение относится к молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим различные описываемые в настоящем документе лиганды, а также клеткам-хозяевам, содержащим такие молекулы нуклеиновой кислоты. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления клетка-хозяин представляет собой прокариотическую клетку. В соответствии с другими вариантами осуществления клетка-хозяин представляет собой эукариотическую клетку.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к матрицам на основе SpA для аффинной хроматографии, у которых наблюдают измененное (повышенное или пониженное) связывание с Fab-частью иммуноглобулина по сравнению с SpA-лигандами д.т., в то же время с сохранением способности связывать Fc-часть иммуноглобулина. В соответствии с одним вариантом осуществления у матрицы на основе SpA по настоящему изобретению наблюдают пониженное связывание с Fab-частью иммуноглобулина по сравнению с SpA д.т. В соответствии с конкретным вариантом осуществления хроматографическая матрица включает SpA-лиганд, который включает лизин в положении 29 вместо глицина (в случае доменов В и С SpA) или вместо аланина (в случае домена Z SpA).

#### Краткое описание чертежей

На фиг. 1 изображены выравнивания аминокислотных последовательностей для связывающих IgG доменов SpA дикого типа (д.т.), а также домена Z, представленного посредством SEQ ID NO: 1-6.

На фиг. 2 изображены схематические диаграммы плазмиды pET11a, кодирующей нуклеиновую кислоту, которая кодирует димерный лиганд с доменом Z с мутацией A29K, аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO: 85 (контроль), и плазмиды pET11a, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей димерный лиганд с доменом Z с мутацией A29K, а также второй домен, включающий делецию 4 последовательных аминокислот с N-конца, аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO: 78. Конструкции лиганда дополнительно включают последовательность His-метки на 3' конце.

На фигуре 3 показан окрашенный кумасси SDS-PAGE гель, полученный в результате анализа паттерна фрагментации свободных и иммобилизованных димерных лигандов Z и С с выдержкой в щелочи в 0,5 М NaOH в течение 25 часов и без нее. Описание различных дорожек геля SDS-PAGE представляет собой следующее. Дорожка 1: молекулярный маркер; дорожка 2: димерный лиганд с доменом Z без выдержки в щелочи (A29K без делеций, показан в SEQ ID NO: 85, который применяют в качестве

контроля, и он включает His-метку); дорожка 3: контрольный димерный лиганд с доменом Z, подвергнутый выдержке в 0,5 М NaOH в течение 25 часов; дорожка 4: контрольный димерный лиганд с доменом Z, иммобилизованный на агарозной хроматографической смоле, которая подвергнута выдержке в 0,5 М NaOH в течение 25 часов; дорожка 5: димерный лиганд с доменом Z с делецией 4 последовательных аминокислот с N-конца второго домена (A29K, причем второй домен имеет делецию, показанную в SEQ ID NO: 78, и His-метку) без воздействия щелочью; дорожка 6: димерный лиганд с доменом Z SEQ ID NO: 78 с His-меткой, подвергнутый выдержке в 0,5 М NaOH в течение 25 часов; дорожка 7: димерный лиганд с доменом Z SEQ ID NO: 78 с His-меткой, иммобилизованный на агарозной хроматографической смоле и подвергнутый выдержке в 0,5 М NaOH в течение 25 часов; дорожка 8: димерный лиганд с доменом C без делеций, используемый в качестве контроля (аминокислотная последовательность, показанная в SEQ ID NO: 92, плюс наличие His-метки) без воздействия щелочью; дорожка 9: контрольный димерный лиганд с доменом C, подвергнутый выдержке в 0,5 М NaOH в течение 25 часов; дорожка 10: димерный лиганд с доменом C, иммобилизованный на агарозной хроматографической смоле и подвергнутый выдержке в 0,5 М NaOH в течение 25 часов; дорожка 11: димерный лиганд с доменом C с делецией от N-конца у второго домена (аминокислотная последовательность, показанная в SEQ ID NO: 35, плюс наличие His-метки); дорожка 12: димерный лиганд с доменом C SEQ ID NO: 35 плюс His-метка, подвергнутый выдержке в 0,5 М NaOH в течение 25 часов; и дорожка 13: димерный лиганд C SEQ ID NO: 35 плюс His-метка, иммобилизованный на агарозной хроматографической смоле и подвергнутый выдержке в 0,5 М NaOH в течение 25 часов.

На фигуре 4 показана хроматограмма по результатам анализа SEC димерных лигандов Z и C, кратко описанных в приведенном выше описании фигуры 3. Ось x означает время удержания в минутах, причем меньшие молекулы имеют более длительное время удержания, чем время удержания для большей молекулы. Ось y представляет собой УФ-поглощение при 280 нм в мЕП. Факт уменьшенной фрагментации димерных лигандов с доменами Z и C с N-концевой делецией во втором домене после продолжительной выдержки в щелочи (т.е. 0,5 М NaOH выдержка в течение 25 часов) показан с помощью прямоугольников на хроматограмме, а наличие меньших фрагментов для димерных контролей с доменами Z и C показано с помощью стрелочек.

На фигуре 5 показан окрашенный кумасси гель SDS-PAGE, полученный в результате анализа паттерна фрагментации как свободных, так и иммобилизованных пентамерных лигандов с доменами Z с или без выдержки в щелочи в 0,5 М NaOH в течение 25 часов. Описание различных дорожек геля SDS-PAGE представляет собой следующее: дорожка 1: маркер молекулярной массы; дорожка 2: пентамерный лиганд с доменами Z с мутацией A29K и делецией 4 последовательных аминокислот с N-конца у всех кроме первого домена, аминокислотная последовательность которого изложена в SEQ ID NO: 84, без воздействия щелочью; дорожка 3: пентамерный лиганд с доменами Z SEQ ID NO: 84, подвергнутый выдержке в 0,5 М NaOH в течение 25 часов; дорожка 4: пентамерный лиганд с доменами Z SEQ ID NO: 84, иммобилизованный на агарозной хроматографической смоле и подвергнутый выдержке в 0,5 М NaOH в течение 25 часов; дорожка 5: пентамерный лиганд с доменами Z SEQ ID NO: 91, используемый в качестве контроля, который не был подвергнут выдержке в щелочи; дорожка 6: контрольный пентамерный лиганд с доменами Z, подвергнутый выдержке в 0,5 М NaOH в течение 25 часов; и дорожка 7: контрольный пентамерный лиганд с доменами Z, иммобилизованный на агарозной хроматографической смоле и подвергнутый

выдержке в 0,5 М NaOH в течение 25 часов. Далее, дорожки 8, 9 и 10 относятся к результатам, наблюдаемым при аналогичной обработке rSPA, причем дорожка 8 представляет собой rSPA, который не был подвергнут какой-либо выдержке в щелочи; дорожка 9 представляет собой rSPA, подвергнутый выдержке в 0,5 М NaOH в течение 25 часов, и иммобилизированный rSPA, подвергнутый выдержке в 0,5 М NaOH в течение 25 часов. Полосы представляют фрагментацию, которая обозначена стрелочками.

Фигура 6 представляет собой хроматограмму, полученную по результатам анализа SEC пентамерных лигандов с доменами Z, кратко описанных в приведенном выше описании фигуры 5. Ось x означает время удержания в минутах, причем меньшие молекулы имеют более длительное время удержания, чем время удержания для большей молекулы. Ось y представляет собой УФ-поглощение при 280 нм в мЕП. Факт уменьшенной фрагментации в случае пентамерных лигандов с доменами Z с N-концевой делецией во всех, за исключением первого домена, после продолжительной выдержки в щелочи показан с помощью прямоугольников на хроматограмме, а наличие меньших фрагментов, наблюдаемых с контрольным пентамерным Z доменом, показано с помощью стрелки, указывающей на фрагменты. Кроме того, наблюдаемый для rSPA высокий уровень фрагментации также можно наблюдать с помощью SEC.

Фигура 7 представляет собой хроматограмму, полученную по результатам анализа SEC иммобилизованных пентамерных лигандов с доменами Z, кратко описанных в приведенном выше описании фигуры 5. Ось x означает время удержания в минутах, причем меньшие молекулы имеют более длительное время удержания, чем время удержания для большей молекулы. Ось y представляет собой УФ-поглощение при 280 нм в мЕП. Факт уменьшенной фрагментации в случае иммобилизованного пентамерного лиганда с доменами Z с N-концевой делецией во всех, за исключением второго домена, после продолжительной выдержки в щелочи, показан с помощью прямоугольника на хроматограмме, а наличие меньших фрагментов, наблюдаемых с контрольным пентамерным Z доменом, показано с помощью стрелки, указывающей на фрагменты. Кроме того, наблюдаемый для иммобилизованного rSPA высокий уровень фрагментации также можно наблюдать с помощью SEC.

Фигура 8 представляет собой хроматограмму, полученную по результатам анализа SEC свободных димерных лигандов с доменами Z после продолжительной выдержки в щелочи, причем лиганды включают N-концевую делецию первой одной (SEQ ID NO: 87), первых двух (SEQ ID NO: 88), первых трех (SEQ ID NO: 69) или первых четырех (SEQ ID NO: 78) у второго домена димерных лигандов. Ось x означает время удержания в минутах, причем меньшие молекулы имеют более длительное время удержания, чем время удержания для большей молекулы. Ось y представляет собой УФ-поглощение при 280 нм в мЕП. Факт уменьшенной фрагментации в случае димерных лигандов с первыми тремя или первыми четырьмя аминокислотами, удаленными с N-конца второго домена, после продолжительной выдержки в щелочи обозначен прямоугольниками. Наличие фрагментации, наблюдаемое после продолжительной выдержки в щелочи димерных лигандов без аминокислотных делеций (SEQ ID NO: 85), или с удаленной первой аминокислотой, или удаленными первыми двумя аминокислотами с N-конца второго домена показано с помощью стрелок, указывающих на наличие фрагментов на хроматограмме.

На фигуре 9 приведено сравнение сохраненных связывающих способностей иммобилизованных пентамерных лигандов с доменом C после повторного воздействия щелочью, причем один пентамерный лиганд включает N-концевую делецию 4 аминокислот в каждом домене, мутацию G29K в каждом домене, а также аланин, самую

первую аминокислоту в пентамере (аминокислотная последовательность, показанная в SEQ ID NO: 93); и другого пентамерного лиганда, являющегося его эквивалентом д.т. с мутацией G29K (аминокислотная последовательность которого показана в SEQ ID NO: 95). Ось x представляет собой общее время воздействия на хроматографические матрицы 0,7 М NaOH за 16 циклов по 30 минут каждый. Ось y представляет собой процент сохраненной связывающей способности.

Подробное раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к матрицам для аффинной хроматографии, которые включают лиганды на основе одного или нескольких доменов SpA, причем у лигандов, либо самих по себе, либо иммобилизованных на матрице, наблюдают уменьшенную фрагментацию при применении в способах очистки относительно соответствующих доменов д.т. SpA.

Ранее описанные иллюстративные хроматографические лиганды на основе SpA включают, например, описанные в публикации заявки на выдачу патента США №20100221844, в которой описаны хроматографические матрицы, которые включают домены В и Z SpA дикого типа, причем к хроматографической матрице прикреплено несколько центров на лиганде (т.е. многоточечное прикрепление); описанные в публикации заявки на выдачу патента США №20100048876, в которой описаны хроматографические лиганды на основе домена С SpA д.т., которые могут связывать Fab-части некоторых антител и являются связанными с нерастворимым носителем на отдельном центре с помощью концевой связывающей группы; и описанные в патенте США №6831161, в котором рассмотрены основанные на SpA основные хроматографические лиганды, причем были модифицированы один или несколько остатков аминокислоты аспарагин.

Как обсуждалось ранее, несмотря на то, что у этих лигандов наблюдают сниженную потерю связывающей способности после воздействия основными условиями, некоторые из этих лигандов характеризуются фрагментацией при применении в способе очистки, например, лиганды, описываемые в публикации заявки на выдачу патента США №20100221844, что очень нежелательно. Описываемые в настоящем документе лиганды, с другой стороны, являются намного более привлекательными кандидатами на очистку белка по сравнению с ранее описанными лигандами в том, что у них наблюдают уменьшенную фрагментацию после воздействия основными условиями в ходе осуществления протоколов регенерации и очистки без разборки (CIP), которые обычно используют в способах очистки белков.

Для того чтобы настоящее раскрытие можно было легче понять, сначала приведены определения некоторых терминов. Дополнительные определения изложены в подробном раскрытии.

#### I. Определения

Применяемый в настоящем документе термин "SpA," "белок А" или "белок А Staphylococcus aureus" относится к многодоменному белку массой 42 кДа, выделенному из бактерии Staphylococcus aureus. SpA связан со стенкой бактериальной клетки посредством его карбокси-концевым связывающимся с клеточной стенкой участком, называемым доменом X. На amino-концевом участке он содержит пять связывающихся с иммуноглобулином доменов, называемых E, D, A, B и C (Sjodhal, Eur J Biochem. Sep 78(2):471-90 (1977); Uhlen et al., J Biol Chem. Feb 259(3): 1695-702 (1984). Каждый из этих доменов содержит примерно 58 аминокислотных остатков, и они характеризуются 65-90% идентичности аминокислотной последовательности.

Каждый из доменов E, D, A, B и C у SpA обладает различными Ig-связывающими

центрами. Один центр предназначен для Fcγ (константный участок IgG класса Ig), а другой предназначен для Fab части определенных молекул Ig (часть Ig, которая ответственна за распознавание антигена). Сообщалось, что каждый из этих доменов содержит Fab-связывающий центр. Отличная от Ig-связывающая часть SpA расположена на C-конце, и ее обозначают участок X или X-домен.

Домен Z SpA представляет собой сконструированный аналог доменов B SpA и содержит валин вместо аланина в положении 1 и аланин вместо глицинового остатка в положении 29 (Nilsson, et al., Protein engineering, Vol. 1, No. 2, 107-113, 1987.).

Клонирование кодирующего SpA гена описано в патенте США №5151350, полное содержание которого включено в настоящий документ при помощи ссылки в полном объеме.

Настоящее изобретение относится к матрицам для аффинной хроматографии, которые включают лиганды на основе SpA, причем у лигандов (как свободных, так и иммобилизованных лигандов) наблюдают уменьшенную фрагментацию, что видно по результатам SDS-PAGE и SEC, после регенерации и осуществления протоколов CIP, которые обычно используют в способе очистки белков.

В соответствии с некоторыми аспектами по настоящему изобретению аффинный лиганд содержит один или несколько доменов B, или один или несколько доменов Z, или один или несколько доменов C, или любые их комбинации, причем по меньшей мере один домен B, или по меньшей мере один домен Z, или по меньшей мере один домен C содержит делецию 3 последовательных аминокислот с N-конца, или 4 последовательных аминокислот с N-конца, или 5 последовательных аминокислот с N-конца, начиная с положения 1 или положения 2.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления по настоящему изобретению к хроматографической матрице прикреплены несколько центров аффинного лиганда (т.е. многоточечное прикрепление). В соответствии с конкретным вариантом осуществления настоящее изобретение относится к матрице для аффинной хроматографии, содержащей один или несколько прикрепленных к хроматографической матрице доменов B SpA, причем к матрице прикреплено несколько центров лиганда, и причем по меньшей мере один домен B имеет делецию 3 последовательных аминокислот с N-конца, или 4 последовательных аминокислот с N-конца, или 5 последовательных аминокислот с N-конца, начиная с положения 1 или с положения 2 последовательности домена B д.т.

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к матрице для аффинной хроматографии, содержащей один или несколько прикрепленных к хроматографической матрице доменов Z SpA, причем к матрице прикреплено несколько центров лиганда, и причем по меньшей мере один домен Z имеет делецию 3 последовательных аминокислот с N-конца, или 4 последовательных аминокислот с N-конца, или 5 последовательных аминокислот с N-конца, начиная с положения 1 или положения 2 последовательности домена Z д.т.

В соответствии с еще одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к матрице для аффинной хроматографии, содержащей один или несколько прикрепленных к хроматографической матрице доменов C SpA, причем к матрице прикреплено несколько центров лиганда, и причем по меньшей мере один домен C имеет делецию 3 последовательных аминокислот с N-конца, или 4 последовательных аминокислот с N-конца, или 5 последовательных аминокислот с N-конца, начиная с положения 1 или положения 2 последовательности домена C д.т.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления настоящее изобретение

относится к стабильному в основных условиях лиганду для аффинной хроматографии, который включает пять доменов С SpA, причем каждый домен характеризуется мутацией G29K, а также 4 аминокислотами, удаленными с N-конца, начиная с положения 1, и пентамерной формой, характеризующейся дополнительным аланином в качестве первой аминокислоты, способствующей однородному посттрансляционному процессингу белка.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описываемые в настоящем документе SpA-лиганды дополнительно включают замененный остаток аминокислоты глицин в положении 29 остатком аминокислоты лизин (в случае доменов В и С) или замененный остаток аминокислоты аланин в положении 29 остатком аминокислоты лизин (в случае домена Z).

Применяемый в настоящем документе термин "исходная молекула", или "эквивалент дикого типа (д.т.)", или "белок д.т.", или "домен д.т." предназначен для отсылки к соответствующему белку (SpA) или домену белка (например, доменам В, Z или С SpA) в его фактически нативной форме, которая, в целом, в настоящем документе использована в качестве контроля. Используемый в настоящем документе эквивалент-контроль д.т., который соответствует домену SpA в его фактически нативной форме, может иметь отличие по одной аминокислоте от соответствующего домена SpA для изменения связывания с Fab; тем не менее, в остальном является идентичным последовательности соответствующего домена д.т. У лигандов по настоящему изобретению наблюдают уменьшенную фрагментацию (в случае как свободных, так и иммобилизованных форм) по отношению к их эквивалентам д.т. (т.е. полностью д.т. или включающим мутацию, изменяющую связывание с Fab), о чем свидетельствуют эксперименты, рассматриваемые в настоящем документе в разделе Примеры. В соответствии с различными вариантами осуществления эквивалент д.т. лиганда на основании домена В или домена С по настоящему изобретению представляет собой домен В д.т. SpA или домен С д.т. SpA, аминокислотные последовательности которых изложены в SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, соответственно. В соответствии с определенными вариантами осуществления эквивалент д.т. лиганда на основании домена Z представляет собой аминокислотную последовательность домена Z, изложенную в SEQ ID NO: 6. В соответствии с определенными вариантами осуществления эквивалентом д.т. домена В, С или Z является практически идентичная последовательность упомянутого выше домена В, С или Z, за исключением мутации в положении 29 для изменения Fab-связывания домена. Соответственно, в соответствии с определенными вариантами осуществления эквивалент д.т. лиганда на основании домена В включает аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 45 (G29K), эквивалент д.т. лиганда на основании домена С включает аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 46 (G29K), и эквивалент д.т. лиганда на основании домена Z включает аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 48 (A29K). Кроме того, в случае, если лиганд по настоящему изобретению включает несколько доменов, то соответствующий эквивалент д.т. будет включать такое же количество доменов, однако может включать мутацию для изменения связывания Fab. Соответственно, в соответствии с определенными вариантами осуществления эквивалент д.т. пентамерного лиганда с доменами С по настоящему изобретению включает аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 95 или в SEQ ID NO: 96.

Термин "идентичность последовательностей" означает, что две нуклеотидные или аминокислотные последовательности при оптимальном выравнивании, как, например,



при помощи программ GAP или BESTFIT с применением параметра штрафов за открытие гэпа по умолчанию, имеют по меньшей мере 70% идентичности последовательностей, или по меньшей мере 80% идентичности последовательностей, или по меньшей мере 85% идентичности последовательностей, или по меньшей мере 90% идентичности последовательностей, или по меньшей мере 95% идентичности последовательностей или более. Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность выступает в качестве эталонной последовательности (например, исходная последовательность), относительно которой сравнивают тестируемые последовательности. При применении алгоритма сравнения последовательностей тестовые и эталонные последовательности вводят в компьютер, затем, в случае необходимости, задают координаты и задают параметры программы с алгоритмом для работы с последовательностями. С помощью алгоритма сравнения последовательностей затем рассчитывают процент идентичности последовательности (ей) для тестируемой последовательности(ей) относительно эталонной последовательности, исходя из заданных параметров программы.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть проведено, например, при помощи алгоритма локальной гомологии Смита-Ватермана, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), алгоритма выравнивания по принципу гомологичности Нидлмана-Вунша, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), при помощи способа поиска по сходству Пирсона и Липмана, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), при помощи компьютеризированных реализаций таких алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA из пакета программного обеспечения Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Мэдисон, Висконсин) или при помощи визуального осмотра (см., в целом, работу Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology). Одним примером алгоритма, который подходит для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, является алгоритм BLAST, который описан в работе Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403 (1990). Программное обеспечение для осуществления анализов BLAST является общедоступным благодаря Национальному Центру Биотехнологической Информации (общедоступным благодаря интернет-серверу Национальных институтов здравоохранения NCBI). Обычно, для осуществления сравнения параметры программы могут быть использованы по умолчанию, хотя также могут быть использованы заданные пользователем параметры. Для аминокислотных последовательностей в программе BLASTP в качестве параметров по умолчанию используют параметр длина слова (W), равный 3, параметр ожидаемая величина (E), равный 10, и матрицу замен BLOSUM62 (см. работу Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)).

Взаимозаменяемо применяемые в настоящем документе термины "домен E", "домен E SpA" и "домен E белка A Staphylococcus aureus" относятся к полипептиду, аминокислотная последовательность которого изложена в SEQ ID NO: 1 или которая кодируется, например, нуклеотидной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 7. "Домен E" является полипептидом из 51 аминокислоты, который сворачивается в трехспиральную упакованную структуру. Он способен связываться с Fc с помощью остатков на поверхности спиралей 1 и 2 или с Fab с помощью остатков на поверхности спиралей 2 и 3.

Взаимозаменяемо применяемые в настоящем документе термины "домен D", "домен D SpA" и "домен D белка A Staphylococcus aureus" относятся к полипептиду, аминокислотная последовательность которого изложена в SEQ ID NO: 5 или кодируется, например, нуклеиновой последовательности, изложенной в SEQ ID NO: 11. "Домен D"

является полипептидом из 61 аминокислоты, который сворачивается в трехспиральную упакованную структуру. Он способен связываться с Fc с помощью остатков на поверхности спиралей 1 и 2 или с Fab с помощью остатков на поверхности спиралей 2 и 3.

5 Взаимозаменяемо применяемые в настоящем документе термины "домен A", "домен A SpA" и "домен A белка A *Staphylococcus aureus*" относятся к полипептиду, аминокислотная последовательность которого изложена в SEQ ID NO: 2 или которая кодируется, например, нуклеотидной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 8. "Домен A" является полипептидом из 58 аминокислот, который сворачивается в  
10 трехспиральную упакованную структуру. Он способен связываться с Fc с помощью остатков на поверхности спиралей 1 и 2 или с Fab с помощью остатков на поверхности спиралей 2 и 3.

Взаимозаменяемо применяемые в настоящем документе термины "домен B", "домен B SpA" и "домен B белка A *Staphylococcus aureus*" относятся к полипептиду,  
15 аминокислотная последовательность которого изложена в SEQ ID NO: 3 или которая кодируется, например, нуклеотидной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 9. "Домен B" является полипептидом из 58 аминокислот, который сворачивается в трехспиральную упакованную структуру. Он способен связываться с Fc с помощью остатков на поверхности спиралей 1 и 2 или с Fab с помощью остатков на поверхности  
20 спиралей 2 и 3.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления лиганд на основе домена В по настоящему изобретению включает делецию трех аминокислот с N-конца, например, с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 13. В соответствии с другими вариантами осуществления лиганд на основе домена В по настоящему  
25 изобретению включает делецию четырех аминокислот с N-конца, например, с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 28. В соответствии с другим вариантом осуществления лиганд на основе домена В по настоящему изобретению включает делецию пяти аминокислот с N-конца (последовательность не показана).

30 Взаимозаменяемо применяемые в настоящем документе термины "домен C", "домен C SpA" и "домен C белка A *Staphylococcus aureus*" относятся к полипептиду, аминокислотная последовательность которого изложена в SEQ ID NO: 4 или которая кодируется, например, нуклеотидной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 10. "Домен C" является полипептидом из 58 аминокислот, который сворачивается в  
35 трехспиральную упакованную структуру. Он способен связываться с Fc с помощью остатков на поверхности спиралей 1 и 2 или с Fab с помощью остатков на поверхности спиралей 2 и 3.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления лиганд на основе домена С по настоящему изобретению включает делецию трех аминокислот с N-конца,  
40 например, с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 14. В соответствии с другими вариантами осуществления лиганд на основе домена С по настоящему изобретению включает делецию четырех аминокислот с N-конца, например, с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 29. В соответствии с другим вариантом осуществления лиганд на основе домена С по настоящему  
45 изобретению включает делецию пяти аминокислот с N-конца (последовательность не показана).

Взаимозаменяемо применяемые в настоящем документе термины "домен Z", "домен Z SpA" и "домен Z белка A" относятся к трехспиральному полипептиду из 58

аминокислот, который является вариантом домена В белка А. Аминокислотная последовательность домена Z изложена в SEQ ID NO: 6, а последовательность нуклеиновой кислоты изложена в SEQ ID NO: 12. Иллюстративный домен Z описан в работе Nilsson et al., Protein Engr., 1:107-113 (1987), содержание которой включено в

5 настоящий документ с помощью ссылки.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления лиганд на основе домена Z по настоящему изобретению включает делецию трех аминокислот с N-конца, например, с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 15. В соответствии с другими вариантами осуществления лиганд на основе домена Z по настоящему

10 изобретению включает делецию четырех аминокислот с N-конца, например, с аминокислотной последовательностью, изложенной в SEQ ID NO: 30. В соответствии с другим вариантом осуществления лиганд на основе домена Z по настоящему изобретению включает делецию пяти аминокислот с N-конца (последовательность не показана).

15 В соответствии с некоторыми вариантами осуществления к твердой подложке прикреплено несколько центров описываемых в настоящем документе лигандов (т.е. многоточечное прикрепление), и причем у лигандов наблюдают уменьшенную фрагментацию (в случае как свободных, так и прикрепленных лигандов) при применении в способах очистки, о чем свидетельствуют результаты SDS-PAGE или SEC.

20 Применяемый в настоящем документе термин "уменьшенная фрагментация," относится к уменьшению количества и/или интенсивности фрагментов лиганда, как видно на SDS-PAGE-геле или при помощи SEC, по отношению к эквиваленту д.т. лиганда после воздействия на свободные молекулы лигандов или иммобилизованные на твердой подложке молекулы лигандов основными условиями при осуществлении

25 способа очистки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления лиганд иммобилизован на твердой подложке посредством многоточечного прикрепления. Фрагментацию обычно выявляют по наличию низкомолекулярных полос относительно интактной молекулы на SDS-PAGE-геле или в виде четких пиков с различным временем удержания на SEC-хроматограмме.

30 У SpA-лигандов по настоящему изобретению наблюдают уменьшенную фрагментацию, которая может быть выявлена следующим образом. Например, свободный лиганд может быть непосредственно подвергнут воздействию 0,1 М NaOH, 0,3 М NaOH или 0,5 М NaOH в течение 25 часов с последующим доведением pH до 7,0, а затем может быть проанализирован при помощи SDS-PAGE или SEC с применением

35 стандартных протоколов. Альтернативно, иммобилизованный на хроматографической матрице лиганд может быть подвергнут действию 0,1 М NaOH, 0,3 М NaOH или 0,5 М NaOH в течение 25 часов. Щелочной супернатант затем отделяют от матрицы (например, смолы) и нейтрализуют до pH 7. Этот супернатант затем может быть проанализирован при помощи SDS-PAGE или при помощи SEC с применением стандартных протоколов.

40 В случае SDS-PAGE, относительную оптическую интенсивность фрагментов можно наблюдать визуально и сравнить с подходящим контролем (например, доменом д.т. SpA или доменом SpA, содержащим мутацию в положении 29, как описано в настоящем документе). В случае SEC, относительную пиковую интенсивность можно наблюдать

45 визуально и сравнить с подходящим контролем (например, доменом д.т. SpA или доменом SpA, содержащим мутацию в положении 29, как описано в настоящем документе).

Типичный способ очистки с применением матрицы для аффинной хроматографии предусматривает регенерацию матрицы после каждого цикла применения с

использованием кислотного или основного раствора, причем последний является предпочтительным. В дополнение к этому, типичные способы также предусматривают СІР-этапы, в которых задействовано применение кислотного или основного раствора для дезинфекции матрицы, причем щелочной раствор является предпочтительным.

- 5 Соответственно, матрица для аффинной хроматографии предполагает обработку в течение нескольких циклов регенерации и СІР-этапов на протяжении ее срока службы, таким образом давая в результате значительное уменьшение связывающей способности в отношении целевой молекулы с течением времени.

- 10 Хроматографические матрицы, включающие лиганды по настоящему изобретению, являются стабильными в основных условиях в дополнение к тому, что у них наблюдают уменьшенную фрагментацию при применении в способах очистки, поскольку у них видна уменьшенная потеря связывающей способности в отношении целевой молекулы с течением времени после продолжительного воздействия основными условиями в ходе этапов регенерации и СІР-этапов.

- 15 Применяемый в настоящем документе термин "стабильный в основных условиях", "стабильность в основных условиях", "стабильный в щелочных условиях", "стабильность в щелочных условиях" обычно относится к способности аффинного лиганда по настоящему изобретению, либо отдельно, либо в иммобилизованном на хроматографической матрице состоянии, выдерживать повторную регенерацию и СІР-циклы с применением промывания основанием без потери его начальной связывающей способности. Обычно, принято считать, что вклад самой по себе матрицы, на которой  
20 иммобилизован лиганд по настоящему изобретению, составляет менее 5% от изменения стабильности после выдержки в 0,5 М NaOH в течение до 30 часов. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления, аффинные лиганды по  
25 настоящему изобретению способны выдерживать традиционную очистку основанием в течение длительного периода времени, что делает лиганды перспективными кандидатами, особенно для рентабельной широкомасштабной очистки иммуноглобулинов и Fc-содержащих белков, многие из которых являются терапевтическими молекулами.

- 30 В соответствии с некоторыми вариантами осуществления стабильность в основных условиях относится к способности лиганда по настоящему изобретению или матрицы, включающей лиганд по настоящему изобретению, сохранять по меньшей мере 65%, или по меньшей мере 70%, или по меньшей мере 75%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 85%, или по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% от  
35 изначальной связывающей способности после 5 часов, или после 10 часов, или после 15 часов, или после 20 часов, или после 25 часов, или после 30 часов инкубирования в 0,05 М NaOH, 0,1 М NaOH, 0,3 М NaOH или 0,5 М NaOH. В соответствии с другим вариантом осуществления стабильность в основных условиях относится к понижению изначальной связывающей способности лиганда менее чем на 70% или менее чем на  
40 60%, или менее чем на 50%, или менее чем на 40%, или менее чем на 30% даже после обработки 0,05 М NaOH, 0,1 М NaOH, 0,3 М NaOH или 0,5 М NaOH в течение 5 часов, или 7,5 часов, или 10 часов, или 15 часов, или 20 часов, или 25 часов, или 30 часов. В соответствии с конкретным вариантом осуществления хроматографическая матрица, включающая лиганд по настоящему изобретению, сохраняет до 95% от ее изначальной  
45 связывающей способности после воздействия 0,5 М NaOH в течение 5 часов. В соответствии с другим вариантом осуществления хроматографическая матрица, включающая лиганд по настоящему изобретению, сохраняет до 95% от ее изначальной связывающей способности после воздействия 0,1 М NaOH в течение 25 часов. В

соответствии с еще одним вариантом осуществления хроматографическая матрица, включающая лиганд по настоящему изобретению, сохраняет до 85% от ее изначальной связывающей способности после воздействия 0,3 М NaOH в течение 25 часов. В соответствии с дополнительным вариантом осуществления хроматографическая матрица, включающая лиганд по настоящему изобретению, сохраняет до 65% от ее изначальной связывающей способности после воздействия 0,5 М NaOH в течение 25 часов.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления у основанных на SpA хроматографических матриц по настоящему изобретению наблюдают увеличенную или улучшенную стабильность в основных условиях по сравнению с матрицами, включающими домены SpA дикого типа. Однако, в соответствии с другими вариантами осуществления, основанные на SpA хроматографические матрицы по настоящему изобретению не являются более стабильными в основных условиях, чем матрицы, включающие эквиваленты дикого типа лигандов. Одним таким примером является лиганд на основе пентамерного домена С SpA, который не является более стабильным в основных условиях, чем его пентамерный эквивалент на основе домена С дикого типа. Понятно, что в некоторых случаях, как домены SpA дикого типа, так и варианты доменов SpA могут содержать мутацию G29K для уменьшения связывания Fab; однако, такая мутация сама по себе не влияет на стабильность в основных условиях (данные не указаны).

Стабильность в щелочных условиях может быть с легкостью измерена рядовым специалистом в данной области техники при помощи постановки обычного эксперимента и/или такого, который описан в настоящем документе.

Применяемый в настоящем документе термин "изначальная связывающая способность" относится к количеству целевых молекул (например, иммуноглобулина или Fc-содержащего белка), которое может быть захвачено единицей объема матрицы для аффинной хроматографии (т.е. включающей аффинный лиганд матрицы) до воздействия на матрицу основными условиями.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления по настоящему изобретению у матриц для аффинной хроматографии, включающих описываемые в настоящем документе лиганды (т.е. содержащих один или несколько доменов В, Z или С SpA, включающих описываемые в настоящем документе N-концевые делеции) наблюдают менее 5%, или менее 6%, или менее 7%, или менее 8%, или менее 9%, или менее 10%, или менее 12%, или менее 15%, или менее 17%, или менее 20%, или менее 25%, или менее 30% потери от изначальной связывающей способности целевой молекулы по отношению к матрице для аффинной хроматографии, содержащей описываемый в настоящем документе соответствующий эквивалент домена SpA д.т., после продолжительного воздействия щелочными условиями. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления матрицы для аффинной хроматографии по настоящему изобретению сохраняют по меньшей мере 95%, или по меньшей мере 90%, или по меньшей мере 85%, или по меньшей мере 80%, или по меньшей мере 75%, или по меньшей мере 70% от изначальной связывающей способности целевой молекулы по отношению к матрице для аффинной хроматографии, содержащей соответствующий эквивалент домена SpA д.т., после продолжительного воздействия щелочными условиями. Тем не менее, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления у хроматографических матриц по настоящему изобретению наблюдают сходную связывающую способность с матрицами, содержащими эквивалент лиганда д.т., после продолжительного воздействия щелочными условиями. Одна такая иллюстративная хроматографическая матрица

включает лиганд, который включает 5 или более доменов С SpA, причем у каждого домена удалены 4 аминокислоты с N-конца, причем лиганд не является более стабильным в основных условиях, чем его эквивалент с доменом С дикого типа. Как форма с делецией, так и эквивалент дикого типа могут содержать мутацию G29K. Кроме того, в соответствии с описываемыми в настоящем документе различными вариантами осуществления SpA-лиганды могут дополнительно включать отдельную аминокислоту, такую как аланин, валин или глицин, на N-конце только первого домена в мультимере, причем дополнительная аминокислота способствует однородному посттрансляционному процессингу.

Связывающая способность лиганда для аффинной хроматографии в отношении целевой молекулы может быть легко измерена при помощи способов, известных из уровня техники и описываемых в настоящем документе, например, описываемых в публикации заявки на выдачу патента США №20100221844, включенной в настоящий документ при помощи ссылки в полном ее объеме.

Описываемый в настоящем документе термин "хроматография" относится к методике динамического разделения, с помощью которой отделяют представляющую интерес целевую молекулу (например, иммуноглобулин или Fc-содержащий белок) от других молекул в смеси, и которая предусматривает ее выделение. Как правило, в хроматографическом способе подвижная фаза (жидкая или газообразная) переносит образец, содержащий представляющую интерес целевую молекулу, сквозь или через среду стационарной фазы (в норме твердую). Различия в части или аффинности по отношению к стационарной фазе разделяют различные молекулы, в то время как подвижная фаза выносит различные молекулы за различные промежутки времени.

Применяемый в настоящем документе термин "аффинная хроматография" относится к виду хроматографии, предусматривающему выделение целевой молекулы при помощи ее взаимодействия с молекулой (например, хроматографическим лигандом, стабильным в основных условиях), которая специфично взаимодействует с целевой молекулой. В соответствии с одним вариантом осуществления аффинная хроматография предусматривает добавление образца, содержащего целевую молекулу (например, иммуноглобулин или Fc-содержащий белок), к твердой подложке, которая несет на себе описываемый в настоящем документе лиганд на основе SpA.

Применяемый в настоящем документе термин "аффинная хроматография на основе белка А" относится к отделению или выделению веществ при помощи лигандов на основании белка А или SpA, таких как те, которые описаны в настоящем документе, причем лиганд на основании SpA или белка А является иммобилизованным, например, на твердой подложке. Примеры известной из уровня техники среды/смолы для аффинной хроматографии на основе белка А включают среду/смола с белком А, иммобилизованным на стеклянной основе с контролируемым размером пор, например, среда/смола PROSEP A™ и PROSEP vA™ (MILLIPORE); среду/смола с белком А, иммобилизованным на полистироловой твердой фазе, например, среда/смола POROS 50A™ и Poros MabCapture A™ (APPLIED BIOSYSTEMS, INC.); и среду/смола с белком А, иммобилизованным на агарозной твердой подложке, например, среда или смола rPROTEIN A SEPHAROSE FAST FLOW™ или MABSELECT™ (GE HEALTHCARE).

В дополнение к вышеупомянутым матрицам, белок А также может быть иммобилизован на гидрофильном сшитом полимере. См., например, публикацию заявки на выдачу патента США №20080210615, включенную в настоящий документ при помощи ссылки в полном ее объеме, в которой описаны примеры гидрофильных сшитых полимеров. Не привязываясь к какой-либо теории, полагают, что охватываемые

настоящим изобретением лиганды могут быть иммобилизованы на гидрофильных шитых полимерах, таких как описанных в публикации заявки на выдачу патента США №20080210615.

Взаимозаменяемо применяемый в настоящем документе термин "аффинная матрица" или "матрица для аффинной хроматографии" относится к хроматографической подложке, на которой прикреплен лиганд для аффинной хроматографии (например, SpA или его домен). Лиганд может связываться с представляющей интерес молекулой посредством аффинного взаимодействия (например, иммуноглобулин или Fc-содержащий белок), который необходимо очистить или удалить из смеси. Известные из уровня техники иллюстративные матрицы для аффинной хроматографии на основе белка А для применения в аффинной хроматографии на основе белка А включают белок А, иммобилизованный на стеклянной основе с контролируемым размером пор, например, смолы PROSEP A™ и PROSEP vA™, High Capacity, Ultra и PROSEP Ultra Plus (MILLIPORE); белок А, иммобилизованный на полистироловой твердой фазе, например, смола POROS 50A™ и POROS MabCapture A™ (APPLIED BIOSYSTEMS); или белок А, иммобилизованный на агарозной твердой фазе, например, смола rPROTEIN A SEPHAROSE FAST FLOW™ или MABSELECT™ (GE HEALTHCARE).

Термины "иммуноглобулин", "Ig" или "антитело" (применяемые в настоящем документе взаимозаменяемо) относятся к белку с основной структурой из четырех полипептидных цепей, состоящей из двух тяжелых и двух легких цепей, причем указанные цепи стабилизируются, например, при помощи дисульфидных связей между цепями, и который характеризуется способностью специфично связывать антиген. Термины "одноцепочечный иммуноглобулин" или "одноцепочечное антитело" (применяемые в настоящем документе взаимозаменяемо) относятся к белку со структурой из двух полипептидных цепей, состоящей из тяжелой и легкой цепи, причем указанные цепи стабилизируются, например, при помощи пептидных линкеров между цепями, и который характеризуется способностью специфично связывать антиген. Термин "домен" относится к глобулярному участку полипептида тяжелой или легкой цепи, содержащему пептидные петли (например, содержащему 3-4 пептидные петли), стабилизированные, например, при помощи β-складки и/или внутрицепочечной дисульфидной связи. Домены в настоящем документе далее названы "константными" или "вариабельными", исходя из относительного отсутствия вариации последовательности в доменах различных членов класса в случае "константного" домена или значительной вариации в доменах различных членов класса в случае "вариабельного" домена. "Домены" антитела или полипептида в данной области техники часто взаимозаменяемо называют "участками" антитела или полипептида. "Константные" домены легких цепей антитела взаимозаменяемо называют "константными участками легкой цепи", "константными доменами легкой цепи", участками "CL" или доменами "CL". "Константные" домены тяжелых цепей антитела взаимозаменяемо называют "константными участками тяжелой цепи", "константными доменами тяжелой цепи", участками "CH" или доменами "CH". "Вариабельные" домены легких цепей антитела взаимозаменяемо называют "вариабельными участками легкой цепи", "вариабельными доменами легкой цепи", участками "VL" или доменами "VL". "Вариабельные" домены тяжелых цепей антитела взаимозаменяемо называют "вариабельными участками тяжелой цепи", "вариабельными доменами тяжелой цепи", участками "VH" или доменами "VH".

Иммуноглобулины или антитела могут быть моноклональными или поликлональными и могут существовать в мономерной или полимерной форме, например, антитела IgM, которые существуют в пентамерной форме, и/или антитела

IgA, которые существуют в мономерной, димерной или мультимерной форме. Термин "фрагмент" относится к части или сегменту антитела или цепи антитела, содержащей меньше аминокислотных остатков, чем интактное или полное антитело или цепь антитела. Фрагменты могут быть получены посредством химической или ферментативной обработки интактного или полного антитела или цепи антитела. Фрагменты также могут быть получены рекомбинантными способами. Иллюстративные фрагменты включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fc и/или Fv.

Термин "антиген-связывающий фрагмент" относится к полипептидной части иммуноглобулина или антитела, которая связывает антиген или конкурирует с интактным антителом (т.е. с интактным антителом, от которого они были получены) за связывание антигена (т.е. специфичное связывание). Связывающие фрагменты могут быть получены при помощи методик рекомбинантной ДНК или при помощи химического или ферментативного расщепления интактных иммуноглобулинов. Связывающие фрагменты включают Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, отдельные цепи и одноцепочечные антитела.

Также настоящее изобретение относится к химерным белкам, включающим антитело или его фрагмент в качестве части химерного белка.

Взаимозаменяемо применяемые в настоящем документе термины "полинуклеотид" и "молекула нуклеиновой кислоты" относятся к полимерным формам нуклеотидов любой длины, либо рибонуклеотидов, либо дезоксирибонуклеотидов. Такие термины включают одно-, двух- или трехцепочечную ДНК, геномную ДНК, кДНК, РНК, гибрид ДНК-РНК или полимер, включающий пуриновые и пиримидиновые основания или другие природные, химически или биохимически модифицированные, неприродные или производные нуклеотидные основания. Костяк полинуклеотида может включать сахара или фосфатные группы (которые обычно могут встречаться в РНК или ДНК) или модифицированные или замещенные сахар или фосфатные группы. В дополнение к этому, двухцепочечный полинуклеотид может быть получен из одноцепочечного полинуклеотидного продукта химического синтеза либо путем синтеза комплементарной цепи и гибридизации цепей в соответствующих условиях, либо путем синтеза комплементарной цепи de novo с применением ДНК-полимеразы с соответствующим праймером. Молекула нуклеиновой кислоты может принимать множество различных форм, например, гена или генного фрагмента, одного или нескольких экзонов, одного или нескольких интронов, мДНК, кДНК, рекомбинантных полинуклеотидов, разветвленных полинуклеотидов, плазмид, векторов, выделенной ДНК с любой последовательностью, выделенной РНК с любой последовательностью, зондов нуклеиновой кислоты и праймеров. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и аналоги нуклеотидов, урацил, другие сахара и группы связывания, такие как фторррибоза и тиаат, и нуклеотидные ветви. Применяемый в настоящем документе термин "ДНК" или "нуклеотидная последовательность" включает не только основания А, Т, С и G, но также включает любые их аналоги или модифицированные формы таких оснований, такие как метилированные нуклеотиды, внутринуклеотидные модификации, такие как незаряженные связи и тиааты, применение аналогов сахаров и модифицированные и/или альтернативные каркасные структуры, такие как полиамиды. В соответствии с конкретным вариантом осуществления молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность, кодирующую описываемый в настоящем документе вариант SpA.

Термин "Fc-связывание" "связывается с Fc-частью" или "связывание с Fc-часть"



относится к способности описываемого в настоящем документе аффинного лиганда связывать константную часть (Fc) антитела. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления лиганд по настоящему изобретению связывает Fc-часть антитела (например, IgG1, IgG2 или IgG4 человека) с аффинностью, составляющей по меньшей мере  $10^{-7}$  М, или по меньшей мере  $10^{-8}$  М, или по меньшей мере  $10^{-9}$  М.

Применяемый в настоящем документе термин "Fab-связывание" или "связывание с Fab-частью" относится к способности описываемого в настоящем документе аффинного лиганда связывать Fab-участок антитела или молекулы иммуноглобулина. Термин "уменьшенное связывание с Fab-частью" относится к любому понижению связывания Fab-части (или F(ab)<sub>2</sub>) молекулы иммуноглобулина лигандом на основании SpA по настоящему изобретению относительно контроля (например, домена SpA д.т.), причем лиганд дополнительно включает мутацию по одной или нескольким аминокислотам. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления лиганд по настоящему изобретению и его эквивалент д.т. (применяемый в качестве контроля) включает глициновый остаток в положении 29, замененный аминокислотой, отличной от аланина или триптофана. В соответствии с конкретным вариантом осуществления лиганд по настоящему изобретению включает лизиновый остаток в положении 29. В соответствии с конкретным вариантом осуществления связывание с Fab-частью молекулы иммуноглобулина описываемым в настоящем изобретении лигандом нельзя выявить при помощи традиционных в данной области техники методик и описываемых в настоящем документе методик. Связывание с молекулой иммуноглобулина может быть выявлено при помощи хорошо известных методик, включая те, которые описаны в настоящем документе, и включая без ограничения, например, аффинную хроматографию и анализ с помощью поверхностного плазмонного резонанса. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления связывающий иммуноглобулин белок по настоящему изобретению связывает молекулу иммуноглобулина с аффинностью, составляющей по меньшей мере  $10^{-10}$  М.

Применяемый в настоящем документе термин "N-конец" относится к амино-концу аминокислотной последовательности домена SpA, начиная с положения 1 или с положения 2 аминокислотной последовательности каждого из изображенных на фигуре 1 доменов. Тем не менее, очевидно, что первой аминокислоте в последовательности может предшествовать остаток аминокислоты метионин или другая аминокислота для облегчения однородного посттрансляционного процессинга белка, такая как, например, аланин, глицин или валин. Описываемые в настоящем документе SpA-лиганды включают делецию по меньшей мере 3, или по меньшей мере 4, или по меньшей мере 5 последовательных аминокислот с N-конца (начиная с положения 1 или с положения 2 показанных на фигуре 1 аминокислотных последовательностей доменов B, C или Z) домена SpA. Другими словами, такие лиганды включают делецию последовательных аминокислот 1-3, или последовательных аминокислоты 1-4, или последовательных аминокислот 1-5 и т.д. доменов B, Z или C SpA, или такие лиганды включают делецию последовательных аминокислот 2-4, или последовательных аминокислот 2-5, или последовательных аминокислот 2-6 и т.д. доменов B, Z или C SpA (аминокислотные последовательности доменов B, C и Z д.т. изображены на фигуре 1, которые модифицированы с включением делеций с N-конца). В соответствии с конкретным вариантом осуществления лиганд по настоящему изобретению включает 5 доменов C, причем каждый домен включает делецию 4 последовательных аминокислот с N-конца, начиная с положения 1.

Аминокислотная последовательность домена В SpA, содержащая делецию 3 последовательных аминокислот с N-конца, отображена в SEQ ID NO: 13, а последовательность, содержащая делецию 4 последовательных аминокислот с N-конца, отображена в SEQ ID NO: 28. Кроме того, аминокислотная последовательность домена С SpA, содержащая делецию 3 последовательных аминокислот с N-конца, отображена в SEQ ID NO: 14; а последовательность, содержащая делецию 4 последовательных аминокислот с N-конца, отображена в SEQ ID NO: 29. Дополнительно, аминокислотная последовательность домена Z, содержащая делецию 3 последовательных аминокислот с N-конца, отображена в SEQ ID NO: 15; и последовательность, содержащая делецию 4 последовательных аминокислот с N-конца, отображена в SEQ ID NO: 30.

В целом, в случае мультимерных форм описываемых в настоящем документе лигандов на основании SpA аминокислотные последовательности мономерных форм лигандов по необходимости просто повторены. Тем не менее, следует отметить, что в случае некоторых мультимерных форм лигандов по настоящему изобретению не всем доменам необходимо иметь делецию с N-конца. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления лиганды не содержат делецию на N-конце первого домена у мультимерной формы лиганда, однако последующие домены в лиганде содержат делецию по меньшей мере 3 последовательных аминокислот с N-конца, или по меньшей мере 4 последовательных аминокислот с N-конца, или по меньшей мере 5 последовательных аминокислот с N-конца.

Лиганды на основании SpA по настоящему изобретению характеризуются исключительными и неожиданными свойствами, т.е. уменьшенной фрагментацией при применении в способах очистки, о чем свидетельствуют приведенные в настоящем документе примеры. Примечательно, что сведения из уровня техники, судя по всему, не дают обоснований для получения и применения таких лигандов. Например, в публикации заявки на выдачу патента США №20100048876 обсуждают лиганд, который включает делецию аминокислотных остатков 3-6 домена С SpA; однако, исходя из идей этой публикации (см., например, фигуру 2 из публикации заявки на выдачу патента США №20100048876), похоже, что описываемый в ней мутант с делецией имеет плохие эксплуатационные качества в том, что касается сохранения связывающей способности в отношении домена С д.т. SpA в ходе продолжительного воздействия щелочью. Соответственно, исходя из идей этого источника, было бы менее желательно применение мутанта с делецией домена С SpA при все большей потере им связывающей способности с течением времени по сравнению с его эквивалентом дикого типа.

Ради удобства, различные последовательности, на которые даны ссылки в настоящей заявке, обобщены в приведенной ниже таблице 1.

**Таблица I**

Краткое описание последовательности	SEQ ID NO:
AA – аминокислота; NA – нуклеиновая кислота; Δ – наличие делеции	
AA домена E д.т.	1
AA домена A д.т.	2

**Краткое описание последовательности****SEQ ID NO:**

AA – аминокислота; NA – нуклеиновая кислота; Δ – наличие делеции

	AA домена В д.т.	3
5	AA домена С д.т.	4
	AA домена D д.т.	5
	AA домена Z	6
10	NA домена Е д.т.	7
	NA домена А д.т.	8
	NA домена В д.т.	9
	NA домена С д.т.	10
15	NA домена D д.т.	11
	NA домена Z	12
	мономер домена В с Δ 3 AA	13
	мономер домена С с Δ 3 AA	14
20	мономер домена Z с Δ 3 AA	15
	димер домена В с Δ 3 AA, оба домена с делецией	16
	димер домена С с Δ 3 AA, оба домена с делецией	17
	димер домена Z с Δ 3 AA, оба домена с делецией	18
25	димер домена В с Δ 3 AA, только второй домен имеет делецию	19
	димер домена С с Δ 3 AA, только второй домен имеет делецию	20
	димер домена Z с Δ 3 AA, только второй домен имеет делецию	21
30	пентамер домена В с Δ 3 AA, все домены имеют делецию	22
	пентамер домена С с Δ 3 AA, все домены имеют делецию	23
	пентамер домена Z с Δ 3 AA, все домены имеют делецию	24
	пентамер домена В с Δ 3 AA, у первого домена нет делеции	25
35	пентамер домена С с Δ 3 AA, у первого домена нет делеции	26
	пентамер домена Z с Δ 3 AA, у первого домена нет делеции	27
	мономер домена В с Δ 4 AA	28
	мономер домена С с Δ 4 AA	29
40	мономер домена Z с Δ 4 AA	30
	димер домена В с Δ 4 AA, оба домена с делецией	31
	димер домена С с Δ 4 AA, оба домена с делецией	32
45	димер домена Z с Δ 4 AA, оба домена с делецией	33

**Краткое описание последовательности****SEQ ID NO:**

AA – аминокислота; NA – нуклеиновая кислота; Δ – наличие делеции

	димер домена В с Δ 4 AA, только второй домен имеет делецию	34
5	димер домена С с Δ 4 AA, только второй домен имеет делецию	35
	димер домена Z с Δ 4 AA, только второй домен имеет делецию	36
	пентамер домена В с Δ 4 AA, все домены имеют делецию	37
10	пентамер домена С с Δ 4 AA, все домены имеют делецию	38
	пентамер домена Z с Δ 4 AA, все домены имеют делецию	39
	пентамер домена В с Δ 4 AA, у первого домена нет делеции	40
	пентамер домена С с Δ 4 AA, у первого домена нет делеции	41
15	пентамер домена Z с Δ 4 AA, у первого домена нет делеции	42
	домен Е д.т. с AA, с мутацией не в Fab-участке (G29K)	43
	домен А д.т. с AA, с мутацией не в Fab-участке (G29K)	44
	домен В д.т. с AA, с мутацией не в Fab-участке (G29K)	45
20	домен С д.т. с AA, с мутацией не в Fab-участке (G29K)	46
	домен D д.т. с AA, с мутацией не в Fab-участке (G29K)	47
	домен Z с AA, с мутацией не в Fab-участке (A29K)	48
	домен Е д.т. с NA, с мутацией не в Fab-участке (G29K)	49
25	домен А д.т. с NA, с мутацией не в Fab-участке (G29K)	50
	домен В д.т. с NA, с мутацией не в Fab-участке (G29K)	51
	домен С д.т. с NA, с мутацией не в Fab-участке (G29K)	52
30	домен D д.т. с NA, с мутацией не в Fab-участке (G29K)	53
	домен Z с NA, с мутацией не в Fab-участке (A29K)	54
	мономер домена В с Δ 3 AA, с мутацией не в Fab-участке (G29K)	55
	мономер домена С с Δ 3 AA, с мутацией не в Fab-участке (G29K)	56
35	мономер домена Z с Δ 3 AA, с мутацией не в Fab-участке (A29K)	57
	димер домена В с Δ 3 AA, оба домена с делецией, с мутацией не в Fab-участке (G29K)	58
40	димер домена С с Δ 3 AA, оба домена с делецией, с мутацией не в Fab-участке (G29K)	59
	димер домена Z с Δ 3 AA, оба домена с делецией, с мутацией не в Fab-участке (A29K)	60

45

**Краткое описание последовательности****SEQ ID NO:**

АА – аминокислота; NA – нуклеиновая кислота; Δ – наличие делеции

димер домена В с Δ 3 АА, только второй домен имеет делецию, с 61  
мутацией не в Fab-участке (G29K)

димер домена С с Δ 3 АА, только второй домен имеет делецию, с 62  
мутацией не в Fab-участке (G29K)

димер домена Z с Δ 3 АА, только второй домен имеет делецию, с 63  
мутацией не в Fab-участке (A29K)

пентамер домена В с Δ 3 АА, оба домена имеют делецию с мутацией не в 64  
Fab-участке (G29K)

пентамер домена С с Δ 3 АА, оба домена имеют делецию с мутацией не в 65  
Fab-участке (G29K)

пентамер домена Z с Δ 3 АА, оба домена имеют делецию с мутацией не в 66  
Fab-участке (A29K)

пентамер домена В с Δ 3 АА, у первого домена нет делеции, с мутацией 67  
не в Fab-участке (G29K)

пентамер домена С с Δ 3 АА, у первого домена нет делеции, с мутацией 68  
не в Fab-участке (G29K)

пентамер домена Z с Δ 3 АА, у первого домена нет делеции, с мутацией 69  
не в Fab-участке (A29K)

мономер домена В с Δ 4 АА, с мутацией не в Fab-участке (G29K) 70

мономер домена С с Δ 4 АА, с мутацией не в Fab-участке (G29K) 71

мономер домена Z с Δ 4 АА, с мутацией не в Fab-участке (A29K) 72

димер домена В с Δ 4 АА, оба домена с делецией, с мутацией не в Fab- 73  
участке (G29K)

димер домена С с Δ 4 АА, оба домена с делецией, с мутацией не в Fab- 74  
участке (G29K)

димер домена Z с Δ 4 АА, оба домена с делецией, с мутацией не в Fab- 75  
участке (A29K)

димер домена В с Δ 4 АА, только второй домен имеет делецию, с 76  
мутацией не в Fab-участке (G29K)

димер домена С с Δ 4 АА, только второй домен имеет делецию, с 77  
мутацией не в Fab-участке (G29K)

**Краткое описание последовательности****SEQ ID NO:**

AA – аминокислота; NA – нуклеиновая кислота; Δ – наличие делеции

димер домена Z с Δ 4 AA, только второй домен имеет делецию, с 78  
 мутацией не в Fab-участке (A29K)

пентамер домена B с Δ 4 AA, оба домена имеют делецию с мутацией не в 79  
 Fab-участке (G29K)

пентамер домена C с Δ 4 AA, оба домена имеют делецию с мутацией не в 80  
 Fab-участке (G29K)

пентамер домена Z с Δ 4 AA, оба домена имеют делецию с мутацией не в 81  
 Fab-участке (A29K)

пентамер домена B с Δ 4 AA, у первого домена нет делеции, с мутацией 82  
 не в Fab-участке (G29K)

пентамер домена C с Δ 4 AA, у первого домена нет делеции, с мутацией 83  
 не в Fab-участке (G29K)

пентамер домена Z с Δ 4 AA, у первого домена нет делеции, с мутацией 84  
 не в Fab-участке (A29K)

димер домена Z с мутацией не в Fab-участке (A29K) 85

NA с His-меткой 86

димер домена Z с Δ 1 AA, у первого домена нет делеции, с мутацией не в 87  
 Fab-участке (A29K)

димер домена Z с Δ 2 AA, у первого домена нет делеции, с мутацией не в 88  
 Fab-участке (A29K)

димер домена A с Δ 4 AA, первый домен имеет делецию на N-конце 89

димер домена D с Δ 4 AA, первый домен имеет делецию на N-конце 90

пентамер домена Z с мутацией не в Fab-участке (A29K) 91

димер домена C, AA 92

пентамер домена C с Δ 4 AA, причем у первого домена есть аланин на N- 93  
 конце, мутация не в Fab-участке (G29K)

пентамер домена C с Δ 4 AA с первым доменом с аланином на N-конце 94

пентамер домена C, мутация не в Fab-участке (G29K), AA 95

пентамер домена C дикого типа, AA 96

II. Синтез молекул на основе SpA для применения в качестве хроматографических лигандов

Охватываемые настоящим изобретением лиганды на основе SpA для аффинной хроматографии могут быть получены при помощи любых подходящих способов, известных из уровня техники.

Например, на начальном этапе стандартные методики генной инженерии, например, описываемые в практикуме под названием Molecular Cloning by Sambrook, Fritsch and

Maniatis, могут быть использованы для создания нуклеиновых кислот, которые экспрессируют описываемые в настоящем документе молекулы SpA-лиганда.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая один или несколько доменов SpA с делецией на N-конце, может быть клонирована в подходящий вектор для экспрессии в подходящей клетке-хозяине. Подходящие векторы экспрессии хорошо известны в данной области техники и обычно включают необходимые элементы для транскрипции и трансляции последовательности, кодирующей вариант SpA.

Описываемые в настоящем документе молекулы SpA также могут быть химически синтезированы из аминокислотных предшественников для фрагментов при помощи хорошо известных в данной области техники способов, включая способы твердофазного синтеза пептидов, такие как подходы с применением Boc (трет-бутилоксикарбонил) или Fmoc (9-флуоренилметилоксикарбонил) (см., например, патенты США №. №6060596; 4879378; 5198531; 5240680).

Экспрессия описываемых в настоящем документе молекул может быть осуществлена в ряде типов клеток, таких как, например, эукариотические клетки-хозяева, такие как дрожжевые клетки, клетки насекомых и клетки млекопитающих, и прокариотические клетки-хозяева, например, бактерии, такие как *E. coli*.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления молекулы SpA могут быть экспрессированы на поверхности бактериофага так, чтобы каждый фаг содержал последовательность ДНК, которая кодирует отдельную молекулу SpA, зафиксированную на поверхности фага. Аффинность молекулы SpA в отношении иммуноглобулина может быть легко проанализирована с применением стандартных в данной области техники методик и описываемых в настоящем документе, например, стандартная модель ELISA и Biacore™ 2000 (BIACORE AB, Уппсала, Швеция). Желательно, чтобы аффинность связывания молекулы SpA по настоящему изобретению к иммуноглобулину была по меньшей мере сравнима с аффинностью связывания исходной молекулы, причем у молекулы наблюдали уменьшенную фрагментацию при применении, как описано в настоящем документе.

### III. Применяемые для получения хроматографических матриц подложки

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления охватываемые настоящим изобретением SpA-лиганды иммобилизируют на подложке, например, твердой подложке или растворимой подложке, с получением матрицы для аффинной хроматографии, подходящей для отделения биомолекул, таких как, например, иммуноглобулины и Fc-содержащие белки.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления лиганд по настоящему изобретению иммобилизируют на твердой подложке. Не привязываясь к какой-либо теории, полагают, что любая подходящая твердая подложка может быть использована для прикрепления лиганда по настоящему изобретению. Например, матрицы с твердыми подложками включают без ограничения стекло, кварц, диоксид циркония, диоксид титана, агарозу, полиметакрилат, полиакрилат, полиакриламид, простой поливиниловый эфир, поливиниловый спирт и полистирол с контролируемым размером пор и их производные (например, их сплавы). Твердая подложка также может представлять собой пористый материал или материал без пор.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления твердая подложка является пористым материалом. Применяемый в качестве твердой подложки пористый материал может включать в своем составе гидрофильное соединение, олеофобное соединение, олеофильное соединение или любую их комбинацию. Пористый материал может

включать в своем составе полимер или сополимер. Примеры подходящих пористых материалов включают без ограничения полиэфирсульфон, полиамид, например нейлон; полисахариды, такие как, например, агароза и целлюлоза; полиакрилат, полиметакрилат, полиакриламид, полиметакриламид, политетрафторэтилен, полисульфон, сложный полиэфир, поливинилиденфторид, полипропилен, полиэтилен, поливиниловый спирт, простой поливиниловый эфир, поликарбонат, полимер фторуглерода, например сополимер тетрафторэтилена и простого перфтор(алкилвинилового эфира), стекло, кварц, цирконий, титан, керамику, металл и их сплавы.

Пористый материал может включать в своем составе органическую или неорганическую молекулу или комбинацию из органических и неорганических молекул и может включать в своем составе одну или несколько функциональных групп, например гидроксильную группу, эпоксидную группу, тиоловую группу, аминогруппу, карбонильную группу или группу карбоновой кислоты, подходящую для прохождения реакции, например формирования ковалентных связей для последующей химической модификации с целью ковалентного связывания с белком. В соответствии с другим вариантом осуществления пористый материал может не обладать функциональной группой, но может быть покрыт слоем материала, который несет функциональные группы, такие как гидроксильная группа, тиоловая группа, аминокислотная группа, карбонильная группа или группа карбоновой кислоты.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления применяют традиционную матрицу для аффинного отделения, например, органической природы и основанную на полимерах, которые выставляют гидрофильную поверхность к применяемой водной среде т.е. выставляют гидроксиды (--OH), карбоксиды (--COOH), карбонил (--CHO или RCO-R'), карбоксамида (--CONH<sub>2</sub>, возможно в N-замещенной форме), аминоксиды (--NH<sub>2</sub>, возможно в замещенной форме), олиго- или полиэтиленокси группы на своих наружных и, если имеет место, также на внутренних поверхностях. В соответствии с одним вариантом осуществления полимеры, например, могут иметь в своей основе полисахариды, такие как, декстран, крахмал, целлюлоза, пуллулан, агароза и т.д., которые преимущественно были сшиты, например, с бисэпоксидами, эпигалогидринами, бромистым аллилом, аллилглицидиловым эфиром, 1,2,3-тригалогензамещенными низшими углеводородами с получением подходящей пористости и жесткости. В соответствии с другим вариантом осуществления твердая подложка включает пористые агарозные гранулы. Различные применяемые в настоящем изобретении подложки могут быть легко получены согласно известным в данной области техники стандартным способам, таким как, например, обратное суспензионное гелеобразование, описанное, например, в работе Hjerten, Biochim Biophys Acta 79(2), 393-398 (1964). Альтернативно, основными матрицами могут быть коммерчески доступные продукты, такие как Sepharose™ FastFlow (GE HEALTHCARE, Уппсала, Швеция). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, особенно предпочтительными для крупномасштабного разделения, подложку адаптируют для повышения ее жесткости и, следовательно, делают матрицу более подходящей для высоких скоростей потоков.

Альтернативно, твердая подложка может иметь в своей основе синтетические полимеры, такие как поливиниловый спирт, простой поливиниловый эфир, полигидроксиалкилакрилаты, полигидроксиалкилметакрилаты, полиакриламиды, полиметакриламиды и т.д. В случае гидрофобных полимеров, таких как матрицы на основе дивинил- и моновинилзамещенных бензолов, поверхность матрицы часто гидрофилизуют с тем, чтобы выставить обозначенные выше гидрофильные группы к окружающей водной жидкости. Такие полимеры могут быть легко получены в



соответствии со стандартными способами, см., например, работу Arshady, Chimica e L'Industria 70(9), 70-75 (1988). Альтернативно, может быть использован коммерчески доступный продукт, такой как Source™ (GE HEALTHCARE, Уппсала, Швеция) и Poros (APPLIED BIOSYSTEMS, Фостер-сити, Калифорния).

5 В соответствии с еще одними вариантами осуществления твердая подложка включает подложку неорганической природы, например из кварца, циркония, оксида титана и их сплавов. Поверхность неорганических матриц часто модифицируют с включением подходящих реакционно-способных групп для последующей реакции с SpA и его вариантами. Примеры включают CM Zirconia (CIPHERGEN-BIOSEPTA (CERGYPONTOISE, Франция) и CPG® (MILLIPORE).

10 В соответствии с некоторыми вариантами осуществления твердая подложка, например, может иметь в своей основе цирконий, титан или кварц в форме стекла с контролируемым размером пор, которое может быть модифицировано так, чтобы оно либо содержало реакционно-способные группы, и/либо переносило выдерживание в щелочи, для связывания с лигандами.

Иллюстративные форматы твердых подложек включают без ограничения гранулу (сферическую или неправильную), полое волокно, твердое волокно, плитку, гель, мембрану, кассету, колонку, чип, предметное стекло, пластинку или блок.

20 Что касается формата матрицы, то в соответствии с одним вариантом осуществления она находится в форме пористого блока, который может быть получен с помощью неорганического материала, такого как, например, кварц, или органического материала, такого как, например, полиметакрилат, полиакрилат, полиакриламид, полиметакриламид, политетрафторэтилен, полисульфон, сложный полиэфир, поливинилиденфторид, полипропилен, полиэтилен, поливиниловый спирт, простой поливиниловый эфир и поликарбонат. В случае блока, он может быть сформирован посредством полимеризации или при помощи нанесения покрытия на основание.

30 В соответствии с альтернативным вариантом осуществления матрица находится в гранулированной форме или в форме частиц, которая может быть пористой или не пористой. Частицы могут быть сферическими или не сферическими, а также магнитными или не магнитными. Матрицы в гранулированной форме или в форме частиц могут быть использованы в виде упакованного слоя или в суспендированной форме. Суспендированные формы включают такие, которые известны как вспученные слои и чистые суспензии, в которых частицы или гранулы могут свободно перемещаться. В случае блоков, упакованного слоя и вспученных слоев после процедуры отделения обычно следует традиционная хроматография с концентрационным градиентом. В случае чистой суспензии будет использован парциальный режим. Также можно применять твердую подложку в таких формах, как поверхность, чип, капилляр или фильтр.

40 Матрица также может быть представлена в форме мембраны в картридже. Мембрана может иметь формат плоского гладкого листа, спирали или полого волокна.

В соответствии с другим вариантом осуществления лиганд по настоящему изобретению прикрепляют к растворимой подложке, например, растворимому полимеру или водорастворимому полимеру. Иллюстративные растворимые подложки включают без ограничения биополимер, такой как, например, белок или нуклеиновая кислота. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления в качестве растворимого полимера может быть использован биотин, например, описываемый в публикации заявки на выдачу патента США №20080108053. Например, биотин может быть связан с лигандом, например лигандом на основании SpA по настоящему изобретению, который

после связывания с лигандом может быть использован для выделения представляющего интерес белка, например, антитела или его фрагмента, например, присутствующего в необработанной смеси, и представляющий интерес белок может быть выделен или отделен посредством осаждения полимерного комплекса биотин-лиганд-белок либо обратимым, либо необратимым способом. Полимером также может быть синтетически растворимый полимер, такой как, например, включая без ограничения полимер, содержащий отрицательно заряженные группы (карбоксильные или сульфоновые), положительно заряженные группы (группы четвертичного амина, третичного амина, вторичного или первичного), гидрофобные группы (фенильные или бутильные группы), гидрофильные группы (гидроксильные группы или аминоксильные группы) или комбинации перечисленных выше. Иллюстративные синтетические растворимые полимеры можно найти в публикации международной заявке РСТ № WO2008091740 и патентной публикации США № US20080255027, общие идеи каждой из которых включены в настоящий документ при помощи ссылки. Такие полимеры при специфических физических изменениях одного или нескольких условий, таких как рН, электропроводность или температура, могут быть использованы для очистки представляющего интерес белка посредством осаждения обратимым или необратимым способом. Синтетические растворимые полимеры могут быть использованы отдельно или могут быть связаны с лигандом по настоящему изобретению и использованы для захвата/очистки представляющего интерес белка, такого как, например, антитело или его фрагмент, посредством осаждения обратимым или необратимым способом.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления лиганды прикреплены к мембране в формате многолуночного планшета. В соответствии с еще одними вариантами осуществления лиганды включены в капилляр или микроструйное устройство.

#### IV. Способы прикрепления лиганда к подложке

Для прикрепления описываемого в настоящем документе лиганда к подложке, например, твердой подложке, может быть использована любая подходящая методика, в том числе хорошо известные из уровня техники и описываемые в настоящем документе. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления лиганд может быть прикреплен к подложке посредством традиционных методик связывания с использованием, например, присутствующих в лиганде амино- и/или карбоксигрупп. Например, бисэпоксиды, эпихлоргидрин, CNBr, N-гидроксисукцинимид (NHS) и т.д., являются хорошо известными связывающими реагентами. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления между подложкой и лигандом вводят спейсер, который повышает доступность лиганда и способствует химическому связыванию лиганда с подложкой.

Настоящее изобретение относится к различным вариантам осуществления, в соответствии с которыми несколько центров на лиганде прикреплены к твердой подложке так (т.е. посредством многоточечного прикрепления), чтобы в результате получить матрицу для аффинной хроматографии, у которой наблюдают уменьшенную фрагментацию лиганда при продолжительном воздействии щелочью (как в случае свободного лиганда, так и в случае прикрепленного лиганда).

Прикрепление хроматографического лиганда на основе SpA к твердой подложке может быть осуществлено посредством множества различных известных способов, большинство из которых хорошо известны из уровня техники, а также описываемых в настоящем документе способов. См., например, работу Hermanson et al., Immobilized Affinity Ligand Techniques, Academic Press, pp. 51-136 (1992).

Например, белковые лиганды могут быть связаны с твердой подложкой посредством активных групп либо на поверхности твердой подложки, либо на белковом лиганде, таких как, например, гидроксильная, тиоловая, эпоксидная, amino-, карбонильная, эпоксидная или карбоксильная группа. Прикрепление может быть осуществлено с помощью известных химических приемов, в том числе без ограничения применение бромистого цианогена (CNBr), сложного N-гидроксилсукцинимидного эфира, эпокси (бисоксирановая) активация и восстановительное аминирование.

Например, тиол-зависимое связывание белка было описано в литературе. См., например, работу Ljungquist, et al. Eur. J. Biochem. Vol 186, pp. 558-561 (1989). Эту методику ранее применяли для связывания SpA с твердой подложкой. Поскольку SpA дикого типа не содержит тиоловые группы, то прикрепление осуществляют с помощью рекомбинантной вставки содержащего тиоловую группу цистеина на С-конце SpA. См., например, патент США №6399750. С помощью такого механизма получены несколько коммерческих продуктов, таких как MabSelect™, MabSelect™ Xtra и MabSelect™ SuRe, MabSelect™ SuRe LX. Было показано, что концевой цистеин реагирует только с эпоксидной группой на твердой поверхности, что в результате дает одноточечное прикрепление SpA к твердой подложке. См., например, работу Process Scale Bioseparations for the Biopharmaceutical Industry, CRC Press, 2006, page 473.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления по настоящему изобретению несколько центров на хроматографических лигандах на основе SpA прикреплено к твердой подложке посредством неизбирательного, многоточечного прикрепления. В целом, SpA содержит избыточные свободные аминокислоты от множественных лизинов в каждом домене. Прикрепление домена SpA к твердой подложке посредством многоточечного прикрепления, например, хроматографической смоле с эпоксидной или альдегидной группой, может быть осуществлено путем введения в реакцию аминокислоты лизина на SpA посредством, соответственно, открытия эпоксидного цикла или восстановительного аминирования. В соответствии с определенными вариантами осуществления многоточечное прикрепление может быть осуществлено путем реакции одной или нескольких природных аминокислот на SpA, у которых есть свободные гидроксильные группы, таких как, например, серин и тирозин, с содержащей эпоксидную группу подложкой посредством реакции с открытием цикла. Альтернативно, многоточечное прикрепление может быть осуществлено, например, путем реакции природных аминокислот на SpA, у которых есть свободные карбоксильные группы, таких как, например, аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота, с содержащей аминокислоты подложкой посредством, например, N,N'-карбонилдимидазола. Многоточечное прикрепление лиганда к подложке может быть осуществлено путем комбинирования всех вышеприведенных механизмов.

Хроматографические лиганды на основе SpA также могут быть прикреплены к твердой подложке посредством механизма ассоциации. Например, ассоциативная группа может взаимодействовать с представляющим интерес лигандом нековалентно посредством ионного, гидрофобного сочетания или комбинации сочетаний, таким образом прикрепляя представляющий интерес лиганд на твердую поверхность. Это способствует высокоэффективному связыванию лиганда с твердой матрицей, например, как описано в патентах США №№7833723 и 7846682, включенных в настоящий документ при помощи ссылки, с получением, таким образом, плотности лигандов выше, чем связывание без ассоциативных групп. Подходящие для применения согласно настоящему изобретению ассоциативные группы включают заряженные частицы, такие как ионные частицы, и незаряженные частицы, такие как гидрофобные частицы. Ассоциативная

группа может модифицировать твердую подложку, например, путем ковалентного связывания непосредственно с твердой подложкой. Подходящие примеры ионных частиц могут включать четвертичные амины, третичные амины, вторичные амины, первичные амины, сульфоновую группу, карбоксильную кислоту или любую их комбинацию. Подходящие примеры гидрофобных частиц могут включать фенильную группу, бутильную группу, пропильную группу или любую их комбинацию. Также предусмотрено, что могут быть использованы частицы смешанного типа. Ассоциативная группа также может взаимодействовать с белковым лигандом. Таким образом, взаимодействие между ассоциативной группой и белковым лигандом может состоять из сочетания взаимодействий, например ионных и гидрофобных частиц.

Ассоциативная группа может ковалентно связываться с твердой подложкой путем прохождения реакции функциональной группы на твердой подложке с функциональной группой на ассоциативной группе. Подходящие функциональные группы включают без ограничения амины, гидроксильную, сульфгидрильную, карбоксильную группы, иминогруппу, альдегидную, кетонную, алкеновую, алкиновую группы, азогруппу, нитрильную, эпоксидную группы, цианогены и группы активированных карбоновых кислот. Например, гранулы агарозы содержат гидроксильные группы, которые могут вступать в реакцию с эпоксидной функциональной группой положительно зараженной ассоциативной группы, такой как глицидилтриметиламмония хлорид. Специалист в данной области поймет, что с твердой подложкой можно связать множество ассоциативных групп при условии, что применяют по меньшей мере одну бифункциональную ассоциативную группу. Таким образом, ассоциативные группы могут быть связаны с твердой подложкой последовательно или они могут быть по отдельности связаны непосредственно с твердой подложкой.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к ассоциативным группам и/или белковым лигандам, которые могут быть связаны с твердой подложкой посредством промежуточного линкера. Линкер может содержать по меньшей мере одну функциональную группу, связанную со связывающим фрагментом. Связывающий фрагмент может охватывать любую молекулу, способную связываться с функциональной группой. Например, связывающий фрагмент может включать любую из алкильной, алкенильной или алкинильной группы. Связывающий фрагмент может содержать углеродную цепь, варьирующую от 1 до 30 атомов углерода. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер может состоять из более 30 атомов углерода. Связывающий фрагмент может содержать по меньшей мере один гетероатом, такой как азот, кислород и сера. Связывающий фрагмент может состоять из разветвленной цепи, неразветвленной цепи или циклической цепи. Связывающий фрагмент может быть замещен двумя или более функциональными группами.

Выбор подходящих буферных условий для связывания белкового лиганда с твердой подложкой находится в пределах компетенции специалиста в данной области техники. Подходящие буферы включают, например, ацетат натрия, фосфат натрия, фосфат калия, карбонат натрия, бикарбонат натрия, карбонат калия, бикарбонат калия, хлорид натрия, хлорид калия, сульфат натрия и т.д. или любую комбинацию из вышеперечисленного, с концентрацией, варьирующей от 10 мМ до 5 М. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления солевая концентрация варьирует от 0,1 М до 1,5 М.

Дополнительные подходящие буферы включают любой содержащий отличный от аминного буфер, такой как карбонатный, бикарбонатный, сульфатный, фосфатный и

ацетатный буферы или комбинация из вышеперечисленного. При применении связанных с ассоциативными группами химических приемов солевая концентрация буфера будет зависеть от применяемой ассоциативной группы. Например, солевая концентрация может находиться в диапазоне 5 нМ-100 мМ. При применении заряженных частиц солевая концентрация может составлять по меньшей мере 5 нМ, но менее 0,1 М, по меньшей мере 5 нМ но менее 0,01 М, по меньшей мере 5 нМ, но менее 0,001 М. В соответствии с определенными вариантами осуществления солевая концентрация может составлять 0,01 М. При применении гидрофобной частицы обычно желательна высокая солевая концентрация. Таким образом, солевая концентрация может быть больше 0,001 М, больше 0,01 М или больше 0,1 М.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления при применении связанных с ассоциативными группами химических приемов реакцию проводят при температуре, варьирующей от 0°C до 99°C. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ проведения реакции осуществляют на практике при температуре менее 60°C, менее 40°C, менее 20°C или менее 10°C. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ по настоящему изобретению осуществляют на практике при температуре приблизительно 4°C. В соответствии с другими вариантами осуществления способ по настоящему изобретению осуществляют на практике при температуре 20°C.

#### V. Анализ уменьшенной фрагментации лигандов

Настоящее изобретение относится к матрицам для аффинной хроматографии, которые включают SpA-лиганды на основе одного или нескольких доменов В, Z или С, причем один или несколько доменов включают делецию 3, или 4, или 5 последовательных аминокислот с N-конца, начиная с положения 1 или с положения 2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления к хроматографической матрице прикреплено несколько центров на лиганде на основе SpA.

Настоящее изобретение основано на неожиданном и поразительном открытии, что описываемые в настоящем документе лиганды, как в свободной форме так и при иммобилизации на твердой подложке (например, хроматографической матрице), характеризуются уменьшенной фрагментацией после продолжительного воздействия щелочными условиями при применении в ходе осуществления способов очистки. Как обсуждалось выше, такая фрагментация является нежелательной, поскольку она приводит к появлению потенциально иммуногенных фрагментов доменов SpA, которые несут на своем конце потенциально терапевтический целевой белок. Кроме того, фрагментация делает способ очистки более затратным вследствие необходимости использовать больше лиганда в ходе осуществления способа.

Фрагментация аффинных лигандов может быть легко выявлена с помощью известных из уровня техники способов и описываемых в настоящем документе способов. Такие способы включают без ограничения SDS-PAGE и SEC.

Для анализа молекулярной массы белков обычно применяют электрофорез в полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия (SDS)(PAGE). SDS является детергентом, который диссоциирует и раскручивает белки. SDS связывается с полипептидами с образованием комплексов с фактически постоянными соотношениями заряда к массе. Электрофоретическую скорость перемещения через гель, следовательно, определяют только по размеру комплексов. Молекулярные массы определяют с помощью одновременно прогоняемых маркерных белков с известной молекулярной массой. Гель обычно красят, и может быть визуализировано наличие биомолекул с различной молекулярной массой.

Эксклюзионная хроматография (SEC) представляет собой способ, который

предусматривает разделение молекул в растворе по их размеру. Его обычно применяют к большим или макромолекулярным комплексам, таким как белки и промышленные полимеры. Выявление различных молекулярных частиц, как правило, осуществляют с помощью излучения в УФ-видимой части спектра или по рассеиванию света. В случае излучения в УФ-видимой части спектра, выбирают длину волны, которая специфична для выявления определенных частиц. Наблюдаемые на хроматограмме порядки, в которых элюируются определенные молекулярные частицы, а также интенсивность соответствующих пиков дает информацию о типе, а также об относительной величине частиц.

Как продемонстрировано с помощью приведенных в настоящем документе примеров, у SpA-лигандов по настоящему изобретению наблюдают уменьшенную фрагментацию по сравнению с их эквивалентами д.т. после воздействия щелочными условиями. В иллюстративном эксперименте для демонстрации уменьшенной фрагментации, как описываемый в настоящем документе SpA-лиганд с N-концевой делецией, так и его эквивалент д.т. подвергали воздействию 0,5 М NaOH в течение 25 часов. Затем раствор нейтрализовали с помощью кислоты до pH 7. Нейтрализованные растворы вводили в SEC или загружали на SDS-PAGE-гель для анализа и сравнения.

В другом иллюстративном эксперименте для демонстрации уменьшенной фрагментации как матрицу для аффинной хроматографии, включающую прикрепленный к твердой подложке (иммобилизированный посредством многоточечного прикрепления) описываемый в настоящем документе лиганд с N-концевой делецией, так и матрицу для аффинной хроматографии, включающую прикрепленный к твердой подложке (иммобилизированный посредством многоточечного прикрепления) его эквивалент д.т., подвергали воздействию 0,5 М NaOH в течение 25 час. Щелочной раствор и матрицу (например, в форме смолы) разделяли и немедленно нейтрализовали кислотой до pH 7. Нейтрализованные растворы вводили в SEC или загружали на SDS-PAGE-гель для анализа и сравнения.

#### VI. Анализ стабильности лигандов в основных условиях

Помимо того, что у описываемых в настоящем документе лигандов наблюдают уменьшенную фрагментацию при применении в способах очистки, они также стабильны в основных условиях. После получения хроматографических матриц, включающих описываемые в настоящем документе лиганды на основе SpA, с помощью стандартных в данной области методик и описываемых в настоящем документе методик может быть проанализирована стабильность содержащих лиганды матриц в основных условиях.

Например, стабильность в основных условиях иммобилизованного на матрицу лиганда может быть оценена с помощью простой обработки NaOH с концентрацией приблизительно 0,5 М, например, как описано в настоящем документе, а также в публикации заявки на выдачу патента США №20100221844, полное содержание которой включено в настоящий документ с помощью ссылки в полном объеме.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления у стабильных в основных условиях молекул SpA, а также включающих их матриц, наблюдают "повышенную" или "улучшенную" стабильность в основных условиях, что означает, что молекулы и включающие их матрицы являются стабильными в основных условиях в течение продолжительного периода времени по сравнению с их эквивалентами д.т. Ранее сообщалось, что хроматографические матрицы, включающие SpA-лиганды на основе домена В, С или Z д.т. SpA или имеющие мутацию одного или нескольких аспарагиновых остатков, характеризуются улучшенной стабильностью в основных условиях, в которых pH составляет свыше приблизительно 10, как, например, до приблизительно 13 или 14.

Тем не менее, у некоторых из этих лигандов, судя по всему, наблюдают фрагментацию при применении, особенно после повторных циклов CIP, что видно по наличию фрагментов на SDS-PAGE-геле или по результатам SEC.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления лиганды по настоящему изобретению, а также включающие их матрицы стабильны в основных условиях не более, чем их эквиваленты д.т.; тем не менее, у них наблюдают уменьшенную фрагментацию. Один такой описываемый в настоящем документе лиганд представляет собой пентамерную форму лиганда с доменом С, включающим N-концевую делецию в каждом из доменов и включающий мутацию G29K в каждом из доменов. Такой лиганд может дополнительно включать аланин в качестве самой первой аминокислоты в пентамере для облегчения однородного посттрансляционного процессинга.

Настоящее изобретение основано на неожиданном и поразительном открытии, что новые SpA-лиганды (как в свободной форме, так и при иммобилизации в хроматографической матрице), у которых наблюдают уменьшенную фрагментацию при применении в ходе осуществления способов очистки по сравнению с некоторыми ранее описанными лигандами, помимо этого сохраняют по меньшей мере 95% от изначальной связывающей способности после продолжительного воздействия щелочными условиями (например, 0,1 М NaOH в течение 25 часов или дольше). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления на твердой подложке прикреплено несколько центров на лиганде, и эти лиганды имеют в своей основе домены В, С и/или Z SpA, причем лиганды характеризуются делецией 3, 4 или 5 последовательных аминокислот с N-конца, начиная с положения 1 или с положения 2.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления через 100 циклов, причем каждый цикл включает 15-минутную обработку посредством 0,5 М NaOH, процент сохранивших связывающую способность описываемых в настоящем документе SpA-лигандов (например, лигандов, содержащих один или несколько доменов В, С или Z и любую их комбинацию, причем по меньшей мере один из доменов В, С или Z включает делецию по меньшей мере 3 последовательных аминокислот с N-конца), по меньшей мере в 1,25 раз больше, 1,5 раз больше, 2,0 раза больше, 2,5 раз больше или 3 раза больше, чем связывающая способность эквивалента д.т.

В соответствии с одним вариантом осуществления стабильность в основных условиях иммобилизованного лиганда, которую оценивают по сохранению связывающей с IgG способности с течением времени, измеряют приведенным далее способом. Связывающую способность, обозначаемую Qd 50%, измеряют путем получения объема IgG, загруженного до концентрации на основе поглощения УФ<sub>280 нм</sub>, составляющей 50% от изначальной концентрации IgG. Сначала измеряют изначальную Qd 50% хроматографической матрицы (например, упакованной в колонку смолы). Затем хроматографическую матрицу (например, описываемую выше смолу) подвергают приблизительно 10 циклам 15-минутного воздействия 0,5 М NaOH со скоростью 0,8 мл/мин. Еще раз измеряют Qd 50%. Этот способ повторяют до тех пор, пока хроматографическая матрица не будет подвергнута суммарно приблизительно 100 циклам 0,5 М NaOH. Измеряют Qd 50% еще один последний раз и результаты от матрицы для аффинной хроматографии, включающей описываемые в настоящем документе лиганды (например, хроматографическая смола с иммобилизованными лигандами), сравнивают с результатами соответствующих доменов д.т. типа SpA.

В другом анализе, стабильность в основных или щелочных условиях у матрицы измеряют при помощи статической выдержки матрицы. При помощи выдержки отмеренного количества матрицы для аффинной хроматографии (например, в формате

смола) в 0,1 М NaOH, 0,3 М NaOH или 0,5 М NaOH в течение 25 часов с легким помешиванием и измерением связывающей с IgG способности до и после выдержки в NaOH может быть определена стабильность в основных условиях по сохранению связывающей способности матрицы в отношении IgG.

## 5 VII. Способы очистки целевой молекулы с помощью хроматографической матрицы по настоящему изобретению

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к способу очистки целевой молекулы из смеси с применением описываемых в настоящем документе матриц для аффинной хроматографии. Целевой молекулой  
10 может быть любая молекула, которая распознается предлагаемым в настоящем документе аффинным лигандом, причем лиганд связан с твердой подложкой (т.е. хроматографической матрицей). Примеры целевых молекул включают иммуноглобулины и Fc-содержащие белки. Иммуноглобулинами могут быть поликлональные антитела или моноклональное антитело или их функциональный фрагмент. Функциональные  
15 фрагменты включают любые фрагменты иммуноглобулина, содержащие варибельный участок, который специфично связывается со своим антигеном, в то же время сохраняя свою способность специфично связываться с белковым лигандом, связанным с твердой подложкой.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления способ выделения  
20 представляющей интерес целевой молекулы с применением описываемой в настоящем документе матрицы для аффинной хроматографии предусматривает следующие этапы: (а) осуществление контакта твердой подложки, включающей иммобилизованный хроматографический лиганд на основе SpA с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 13-42, SEQ ID NO: 55-84 и SEQ ID NO:  
25 93-95, с содержащей целевую молекулу смесью в таких условиях, при которых целевая молекула специфично связывается с лигандом; и (b) изменение условий так, чтобы целевая молекула больше не была связана с лигандом, таким образом выделяя целевую молекулу.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления этап изменения  
30 предусматривает изменение pH так, чтобы целевая молекула больше не была связана с лигандом. В соответствии с конкретным вариантом осуществления pH изменяют таким образом, чтобы он был более кислым, чем pH-условия на этапе (а). Например, в соответствии с одним вариантом осуществления этап (а) может быть осуществлен при нейтральном pH или pH, варьирующем от приблизительно 6 до приблизительно 8,  
35 а этап (b) может быть осуществлен при кислом pH, например, pH, варьирующем от приблизительно 1 до приблизительно 5.

В соответствии с другим вариантом осуществления этап (b) предусматривает изменение солевой концентрации используемого буфера так, чтобы целевая молекула больше не была связана с лигандом. Например, в соответствии с одним вариантом  
40 осуществления высокая солевая концентрация, например, >0,1 М, может быть использована на этапе (а), а более низкая солевая концентрация, например, <0,1 М, может быть использована на этапе (b). И наоборот, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления низкая солевая концентрация, например, <0,1 М, может быть использована на этапе (а), а высокая солевая концентрация может быть  
45 использована на этапе (b). В соответствии с еще одними вариантами осуществления как pH, так и солевая концентрация буфера могут быть изменены между этапом (а) и этапом (b).

Специалист в данной области техники сможет легко определить условия, подходящие



для связывания целевой молекулы с лигандом, и, таким образом, изменить условия с тем, чтобы нарушить связывание молекулы с лигандом.

В целом, подразумевается, что описываемые в настоящем документе лиганды можно применять в любом способе очистки или серии способов очистки, как правило, предусматривающих применение нативного SpA и рекомбинантного SpA. Другими словами, в целом, желательна замена нативного SpA (например, выделенного из *S. aureus*) и рекомбинантного SpA (например, рекомбинантно экспрессированного SpA д.т.) в существующих в настоящее время в данной области способах описываемыми в настоящем документе лигандами с тем, чтобы уменьшить общие затраты, а также ослабить риск совместной очистки потенциально иммуногенных фрагментов SpA с потенциальной терапевтической молекулой.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к способу очистки антител с помощью аффинной хроматографии, причем способ предусматривает следующие этапы: осуществление контакта загрузочного материала способа с матрицей для аффинной хроматографии по настоящему изобретению для связывания одного или нескольких антител в загрузочном материале; необязательный этап промывки; добавление подходящего элюирующего буфера для высвобождения связанных антител из матрицы; и выделение одного или нескольких антител из элюата. Описываемые в настоящем документе матрицы для аффинной хроматографии также можно применять для выделения антител из культуральных жидкостей, супернатантов, а также ферментативных бульонов. В случае ферментативных бульонов, применение матриц для аффинной хроматографии делает возможным отделение антител от белков клеток-хозяев (НСР), ДНК, вирусов, эндотоксинов, питательных веществ, одного или нескольких компонентов клеточной культуральной среды, например, пеногасителей и антибиотиков, и связанных с продуктом примесей, таких как неправильно свернутые частицы и агрегаты.

В соответствии с конкретным вариантом осуществления загрузочный материал подвергают механической фильтрации перед осуществлением его контакта с описываемой в настоящем документе матрицей для аффинной хроматографии, и, следовательно, подвижная фаза представляет собой осветленный культуральный бульон клеток. Подходящие для адсорбции условия хорошо известны специалистам в данной области техники.

В соответствии с другим вариантом осуществления настоящее изобретение относится к многоэтапному способу очистки антител, причем способ предусматривает этап захвата с помощью описываемой в настоящем документе матрицы для аффинной хроматографии, за которым следуют один или несколько последующих этапов промежуточной очистки и/или доочистки антител. В соответствии с конкретным вариантом осуществления за этапом захвата следует гидрофобное взаимодействие, и/или ионообменная хроматография, и/или распределительная хроматография со слабыми ионообменниками в режиме одновременного связывания и элюирования или в проточном режиме. На альтернативном этапе за этапом захвата следует анионо- или катионообменная хроматография с мультимодальной матрицей и/или распределительная хроматография со слабыми ионообменниками в режиме одновременного связывания и элюирования или в проточном режиме.

В соответствии с другим вариантом осуществления любой выщелоченный лиганд на основе SpA из матрицы для аффинной хроматографии может быть удален при помощи последующих этапов очистки до приемлемых уровней, например до уровней, считающихся приемлемыми для лиганда на основе нативного белка А.

В целом, подразумевают, что описываемые в настоящем документе лиганды можно применять в любом способе, который обычно предусматривает использование лигандов на основе белка А.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано приведенными далее примерами, которые не следует истолковывать как ограничивающие. Содержание всех упоминаемых в настоящей заявке справочных материалов, патентов и опубликованных заявок на выдачу патента, а также фигуры включены в настоящий документ при помощи ссылки.

#### Примеры

Пример 1: Получение SpA-лигандов с одним или несколькими доменами с N-концевой делецией 4 последовательных аминокислот

От DNA 2.0 (Менло-Парк, Калифорния) получали синтетические гены, кодирующие следующие белки: димерный белок SpA, содержащий два домена Z, причем каждый домен содержит мутацию в положении 29 (A29K), снижающую или устраняющую связывание с Fab (аминокислотная последовательность, показанная в SEQ ID NO: 85); и димерный белок SpA, содержащий два домена Z, причем каждый домен содержит мутацию A29K и второй домен Z содержит делецию с удалением 4 последовательных аминокислот с N-конца (аминокислотная последовательность, показанная в SEQ ID NO: 78).

5'-конец каждого синтетического гена содержит кодон для инициации с метионина, а 3'-конец содержит шесть гистидиновых кодонов (SEQ ID NO: 86) для последующей очистки с применением NiNTA-колонки. 5'- и 3'-концы каждого гена, соответственно, содержат сайты рестрикции NdeI и BamHI. Эти синтетические гены, а также используемый вектор экспрессии, т.е. pET11a (EMD), расщепляли при помощи NdeI и BamHI (NEW ENGLAND BIOLABS, Ипсвич, Массачусетс), фрагменты ДНК разделяли на 0,7% агарозном TAE-геле и соответствующие фрагменты ДНК вырезали и очищали с применением набора для экстракции из геля QIAGEN (Валенсия, Калифорния). Очищенные вставки лигировали в основу pET11a или любого другого подходящего вектора экспрессии с применением ДНК-лигазы T4 (NEW ENGLAND BIOLABS, Ипсвич, Массачусетс).

Полученный в результате лигирования продукт реакции трансформировали в DH5 $\alpha$ -компетентную E. coli (INVITROGEN, Карлсбад, Калифорния) согласно инструкциям производителя, и высевали на чашки с LB Technova, содержащие 100 мкг/мл ампициллина, и выращивали в течение ночи при 37°C. С целью получения очищенной ДНК отдельные колонии принимали за отдельную выращенную за ночь культуру в LB, содержащем 100 мкг/мл ампициллина. ДНК очищали с применением наборов для выделения плазмидной ДНК Spin Mini-prep Kit от QIAGEN (Валенсия, Калифорния). Идентификацию рекомбинантных плазмид подтверждали путем анализа фрагментов рестрикции с применением NdeI и BamHI (NEW ENGLAND BIOLABS, Ипсвич, Массачусетс). Плазмидные карты для плазмид, содержащих оба вставленных гена димерных конструкций с доменом Z, показаны на фигуре 2.

Кроме того, получали конструкции, экспрессирующие пентамерную форму SpA-лиганда, содержащего 5 доменов Z, причем каждый домен содержит мутацию A29K (SEQ ID NO: 91); а также пентамерную форму SpA-лиганда, содержащего 5 доменов Z, причем каждый домен содержит мутацию A29K, а также все домены кроме первого содержат делецию 4 последовательных аминокислот с N-конца (SEQ ID NO: 84).

Дополнительно также получали димерные конструкции лигандов SpA, содержащих домены С. Получали димерную конструкцию, экспрессирующую лиганд с доменом С,

аминокислотная последовательность которого изложена в SEQ ID NO: 92; а также получали димерную конструкцию, экспрессирующую лиганд с 2 доменами С, причем только второй домен С содержал делецию 4 последовательных аминокислот с N-конца, аминокислотная последовательность которого изложена в SEQ ID NO: 35. Эти димерные

лиганды с доменом С не имели мутацию в положении 29.

Пример 2: Экспрессия и очистка лигандов на основе SpA

Как обсуждалось выше, для экспрессии различных описываемых в настоящем документе SpA-лигандов может быть использована любая подходящая бактериальная система экспрессии. Например, белок может быть экспрессирован в штамме *Escherichia coli*, таком как штамм BL21(DE3) (PROMEGA, Мэдисон, Висконсин), с помощью вектора pET, такого как pET11a (EMD).

Отдельную колонию отбирали из чашки и выращивали в течение ночи при 37°C в LB-среде, содержащей 100 мкг/мл ампициллина. Выращенную за ночь культуру разбавляли в 100-раз в свежей LB-среде, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, и выращивали до такой клеточной плотности, чтобы оптическая плотность при длине волны 600 нм составляла ~0,8. После добавления 1 мМ изопропил-бета-D-тиогалактопиранозиды клетки выращивали в течение дополнительных двух часов. Экспрессию подтверждали с помощью SDS-PAGE-анализа и вестерн-блоттинга.

Клетки собирали путем центрифугирования (4000 об/мин, 4°C, 5 минут) и ресуспендировали в 3 мл фосфатно-солевого буферного раствора, содержащего 20 мМ имидазола. Клетки лизировали при помощи обработки ультразвуком, а клеточный дебрис осаждали центрифугированием (4000 об/мин, 4°C, 30 минут). SpA-лиганды очищали с применением NiNTA-смолы (QIAGEN) путем нанесения 25-30 мл клеточного лизата на 3-мл колонку. Колонки дважды промывали посредством 30 мл фосфатно-солевого буферного раствора, содержащего 20 мМ имидазол, и элюировали SpA в 3 мл фракциях фосфатно-солевого буферного раствора, содержащего 200 мМ имидазола. SpA диализировали в течение ночи в воду Milli-Q® с сопротивлением 18 мегаом (MILLIPORE, Биллерика, Массачусетс) с последующим внесением 10 мМ NaHCO<sub>3</sub>.

Концентрацию белка подтверждали с помощью УФ-спектрометра, исходя из теоретического коэффициента поглощения (Pace et. al., Protein Science 4:2411 (1995)).

Пример 3: Прикрепление лигандов на основе SpA к твердой подложке

После получения и экспрессии различных описываемых в примерах 1 и 2 лигандов их иммобилизовали посредством многоточечного прикрепления к твердой подложке.

В иллюстративном эксперименте агарозную смолу (сефароза 4B) (GE HEALTHCARE) сшивали с помощью эпихлоргидрина в соответствии с описываемым ранее способом (Porath and Fornstedt, J. Chromatography, 51:479 (1979)). Затем агарозную смолу вводили в реакцию с положительно заряженными ассоциативными группами, например, катионами, в соответствии со следующим способом: к 10 мл смолы добавляли 5 мл 75 масс. % глицидилтриметиламмония хлорида (GTMAC), 5 мл воды Milli-Q® (MILLIPORE, Биллерика, Массачусетс) и 0,258 г 50 масс. % гидроксида натрия. Реакционный сосуд перемешивали вращательным движением в гибридизаторе Techne HB-1D (BIBBY SCIENTIFIC, Берлингтон, Нью-Джерси) в течение ночи при комнатной температуре. Смолу затем фильтровали и промывали тремя 10-мл объемами воды Milli-Q® (MILLIPORE, Биллерика, Массачусетс).

Смолу (10 мл, осадок на фильтре) добавляли в емкость, содержащую 3 мл 4,6 М NaOH. Смесь суспендировали, а затем добавляли 4 мл диглицидилового эфира бутандиола (BUDGE). Эту смесь перемешивали вращательным движением при 35°C в течение приблизительно 2 часов. Смолу затем промывали 5×10 мл воды Milli-Q®

(MILLIPORE, Биллерика, Массачусетс) и уравнивали посредством 2×10 мл 10 мМ NaHCO<sub>3</sub>.

Сразу после описанного выше этапа активации при помощи BUDGE к 5 мл гранулированного осадка на фильтре добавляли 10 мл раствора 10 мМ NaHCO<sub>3</sub>, содержащего 2,5 и 2,3 мг/мл концентрацию димерного лиганда с доменами Z, содержащего мутацию A29K (SEQ ID NO: 85), или димерного лиганда с доменами Z, содержащего N-концевую делецию во втором домене Z (SEQ ID NO: 78). Смесь закрывали пробкой в стеклянной колбе и колбу перемешивали вращательным движением при 37°C в течение приблизительно 2 часов. Через два часа смолу промывали 3 раза посредством 10 мл воды Milli-Q®. Гранулированный осадок на фильтре (10 мл) добавляли в емкость, содержащую 10 мл раствора, состоящего из 1 мл тиоглицерина и 9 мл буферного раствора с 0,2 М NaHCO<sub>3</sub> и 0,5 М NaCl. Смесь суспендировали и перемешивали вращательным движением в течение ночи при комнатной температуре. Смолу затем промывали 3 раза посредством 10 мл следующих буферов: 0,1 М трис-буфер с 0,15 М NaCl (pH 8) и 50 мМ уксусной кислоты (pH 4,5). После этого осуществляли промывку смолы посредством 10 мл воды Milli-Q® и 10 мл 20% водного раствора этанола (объем/объем). Конечную смолу хранили в 20% водном спиртовом растворе (объем/объем) до последующего применения. Способ связывания димерных лигандов с доменом C с твердой подложкой аналогичен способу, описываемому в настоящем документе для димерных лигандов с доменом Z.

Способ связывания описанных выше лигандов с 5 доменами (SEQ ID NO: 91 и 84) с агарозной смолой аналогичен приведенному выше способу за исключением того, что на этапе связывания использовали 15 мг/мл лиганда. Пентамерные лиганды с доменами Z не содержали His-6 метку.

Пример 4: SDS-PAGE-анализ супернатантов, собранных после выдержки в щелочи свободных или иммобилизованных лигандов

SDS-PAGE-может быть использован для выявления фрагментации описываемых в настоящем документе свободных и иммобилизованных лигандов после продолжительного воздействия щелочью. Протокол SDS-PAGE описан ниже.

SpA в воде Milli-Q®, нейтрализованный раствор подвергнутого выдержке в щелочи лиганда и нейтрализованные растворы после выдержки смолы (каждый содержит ~0,5 мг/мл белка) разбавляли в соотношении 1:1 посредством буфера Лэммли (BIORAD, Геркулес, Калифорния). Образцы инкубировали при 70°C в течение 5 минут для того, чтобы убедиться, что белки были полностью денатурированы. 10 мкл каждого образца загружали в гель AnyKD (BIORAD, Геркулес, Калифорния) или гель 15% трис-HCl Ready (BIORAD, Геркулес, Калифорния). Гель-электрофорез проводили в IX трис-глицин-SDS подвижном буфере (THERMOFISHER, Уолтем, Массачусетс) при напряжении 200 вольт в течение 30 минут. SDS-гель затем окрашивали в красящем реагенте Gelcode Blue (THERMOFISHER, Уолтем, Массачусетс) в течение 1 часа и удаляли краситель в воде Milli-Q® в течение ночи.

Пример 5: SEC-анализ супернатантов, собранных после выдержки в щелочи свободных или иммобилизованных лигандов

Помимо описанного выше SDS-PAGE-анализа, SEC (эксклюзионная хроматография) также можно применять для анализа фрагментации свободных и иммобилизованных лигандов после продолжительной выдержки в щелочи. SEC-эксперимент описан ниже.

SEC проводили на HPLC-системе Agilent 1100 (AGILENT, Санта-Клара, Калифорния). SpA-контроль в воде Milli-Q®, нейтрализованный раствор подвергнутого выдержке в

щелочи лиганда (~0,5 мг/мл) и нейтрализованные растворы после выдержки смолы центрифугировали при 13500 об/мин в течение 10 минут перед SEC-HPLC-анализом. Образцы вводили в 20 мкл на колонку для SEC (SEPAX Zenix 7,8 мм X 300 мм, SEP AX TECHNOLOGIES, INC. Ньюарк, Делавэр). Натрий-фосфатный буфер (200 mM, pH 7,0) использовали в качестве подвижной фазы со скоростью потока 1 мл/мин. Программное обеспечение ChemStation от Agilent использовали для сбора и анализа данных по SEC как при 230 нм, так и при 280 нм.

#### Пример 6: Выдержка лигандов в щелочи

После описываемой в примере 2 экспрессии лигандов лиганды подвергали воздействию основных условий.

К 1 мл каждого из описываемых выше лигандов (в концентрации 1 мг/мл) добавляли 1 мл 1 M NaOH до конечной концентрации 0,5 M NaOH и 0,5 мг/мл лиганда. Образец аккуратно перемешивали вращательными движениями в течение 25 часов. Затем этот раствор нейтрализовали до pH ~7 с помощью 32 мкл ледяной уксусной кислоты.

Анализ фрагментации димерных лигандов с доменом Z и доменом C с применением SDS-PAGE после выдержки в щелочи или без нее показан на фигуре 3. Как видно из фигуры 3, у димерного лиганда с доменом Z (A29K без делеций, показанный в SEQ ID NO: 85, которую использовали в качестве контроля) наблюдали значительную фрагментацию после выдержки в щелочи в 0,5 M NaOH в течение 25 часов, что видно по наличию размытости, а также наличию меньших фрагментов вокруг 7 кДа (см. дорожку 3). Напротив, димерный лиганд с доменом Z с мутацией A29K, а также делецией 4 последовательных аминокислот во втором домене (аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 78), судя по всему, в основном оставался интактным после выдержки в щелочи в 0,5 M NaOH в течение 25 часов (см. дорожку 6).

Аналогично, у димерного лиганда с доменом C без делеций (SEQ ID NO: 92, используемая в качестве контроля) наблюдали наличие размытости, а также меньшие фрагменты вокруг 7 кДа на SDS-PAGE после выдержки в щелочи в 0,5 M NaOH в течение 25 часов (см. дорожку 9) по сравнению с димерной конструкцией с доменом C, который содержит делецию 4 последовательных аминокислот с N-конца второго домена, аминокислотная последовательность которого изложена в SEQ ID NO: 35 (см. дорожку 12).

Каждый димерный лиганд с доменами Z и C дополнительно содержал His-6-метку. Лиганды, которые не были подвергнуты выдержке в щелочи, показаны на дорожке 2 (димерный контроль с доменом Z), дорожке 5 (димерный лиганд с доменами Z с N-концевой делецией), дорожке 8 (димерный лиганд с доменом C) и дорожке 9 (димерный лиганд с доменом C с N-концевой делецией).

Уменьшенная фрагментация димерных лигандов с доменами Z и C с N-концевой делецией после продолжительной выдержки в щелочи дополнительно подтверждали посредством SEC. Результаты иллюстративного SEC-эксперимента показаны на фигуре 4 в форме SEC-хроматограммы. Как видно на фигуре 4, у контролей для лиганда с доменом Z (с SEQ ID NO: 85), а также лиганда с доменом C (с SEQ ID NO: 92) наблюдали значительную фрагментацию, указанную стрелочками на хроматограмме на фигуре 4. Напротив, у димерных лигандов с доменами Z и C с N-концевыми делениями во втором домене (аминокислотная последовательность лиганда с доменами Z изложена в SEQ ID NO: 78, а аминокислотная последовательность лиганда с доменом C изложена в SEQ ID NO: 35) наблюдали уменьшенную фрагментацию, которая указана прямоугольниками на хроматограмме на фигуре 4.

Кроме того, пентамерные формы описанных выше лигандов с доменами Z (т.е.

пентамерный лиганд с доменами Z с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 91, который представляет собой контроль, и пентамерный лиганд с доменами Z с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 84, который представляет собой пентамерный лиганд с N-концевой делецией 4 последовательных аминокислот во всех (за исключением первого домена) также анализировали в отношении фрагментации с помощью SDS-PAGE после выдержки в щелочи в 0,5 М NaOH в течение 25 часов.

Как подтверждено данными по SDS-PAGE-гелю, которые видно на фигуре 5, у пентамерной формы лиганда с доменами Z с делецией 4 последовательных аминокислот с N-конца во всех (за исключением первого домена) (аминокислотная последовательность которого изложена в SEQ ID NO: 84) наблюдали намного меньшую фрагментацию после выдержки лиганда в 0,5 М NaOH в течение 25 часов (см. дорожку 3) по сравнению с контрольным пентамерным лигандом с доменами Z, аминокислотная последовательность которого изложена в SEQ ID NO: 91 (см. дорожку 6). Как обсуждалось ранее, обе формы пентамерных лигандов имеют мутацию A29K. Лиганды, которые не были подвергнуты выдержке, судя по всему, являются интактными (дорожки 2 и 5).

Дорожки 8-10 иллюстрируют фрагментацию, наблюдаемую с рекомбинантным лигандом SpA (rSPA), который обычно применяют в способах очистки. Судя по всему, у rSPA-лигандов наблюдали еще намного большую степень фрагментации после выдержки в щелочи в 0,5 М NaOH в течение 25 часов по сравнению с контролем с доменом Z, о чем свидетельствовало почти полное исчезновение белка на SDS-PAGE (см. дорожку 9). Не подвергнутый воздействию щелочных условий rSPA-лиганд представлен дорожкой 8.

Результаты, судя по всему, позволяют предположить, что описываемые в настоящем документе лиганды на основе домена Z с N-концевой делецией являются намного лучшими кандидатами, чем обычно используемые SpA-лиганды, такие как, например, rSPA.

Уменьшение фрагментации после выдержки в щелочи в 0,5 М NaOH в течение 25 часов, наблюдаемое с пентамерным лигандом с доменами Z с N-концевой делецией, дополнительно подтверждали с помощью SEC, результаты одного такого иллюстративного эксперимента показаны на фигуре 6.

Как продемонстрировано с помощью хроматограммы на фигуре 6, у пентамерной формы контроля с доменом Z (SEQ ID NO: 91) без аминокислотной делеций наблюдали четко выделяющиеся пики с низкой молекулярной массой, что указывает на присутствие меньших фрагментов. И наоборот, у пентамерной формы домена Z с N-концевой делецией (SEQ ID NO: 84) наблюдали значительно меньше четких пиков с низкой интенсивностью, что указывает на намного меньшую степень фрагментации по сравнению с контролем.

У обычно применяемого лиганда SPA, rSPA, наблюдали наибольшую фрагментацию или расщепление при полном отсутствии в остатке интактной молекулы. Примечательно, что SEC-хроматограмма согласуется с результатами SDS-PAGE-анализа на фигуре 5, что дополнительно свидетельствует о том, что лиганд rSPA разрушился настолько, что после продолжительного воздействия щелочными условиями (т.е. выдержки в 0,5 М NaOH в течение 25 часов) существенные сегменты нельзя было наблюдать на SEC-хроматограмме.

Пример 7: Выдержка в щелочи иммобилизованных на смоле лигандов

Описываемые в вышеприведенных примерах различные лиганды оценивали в отношении фрагментации после воздействия щелочью после их прикрепления к твердой

подложке (например, агарозной хроматографической смоле).

Для каждой представляющей интерес смолы 1 мл смолы в 5 мл одноразовой хроматографической колонке (EVERGREEN SCIENTIFIC, Лос-Анджелес, Калифорния) измеряли с применением воды Milli-Q®. Смолу быстро кондиционировали в колонке с помощью 2 CV (2 мл) 0,5 М NaOH, ресуспендировали и вакуумизировали. После еще одного повторного кондиционирования с применением NaOH вакуумизированный отфильтрованный осадок смолы переносили в 4 мл тестовые пробирки (THERMOFISHER, Уолтем, Массачусетс). 2 мл 0,5 М NaOH добавляли в колонку (дно закрывали колпачком) и сразу же переносили в тестовую пробирку с соответствующей смолой. Помещали закрытые пробкой тестовые пробирки на ротатор и помешивали вращательным движением тестовые пробирки в течение 25 часов. По окончании выдержки в щелочи содержимое тестовых пробирок выливали в одноразовую колонку и собирали фильтрат. Фильтрат в 1,5 мл нейтрализовали с помощью 50 мкл ледяной уксусной кислоты, и он был готов для дальнейшего анализа с помощью SEC и SDS-PAGE.

Результаты SDS-PAGE-анализа иммобилизированных димерных лигандов с доменами Z и C после продолжительной выдержки в щелочи (например, выдержка в 0,5 М NaOH в течение 25 часов) показаны на фигуре 3. В целом, ожидали, что если лиганд является стабильным в щелочи после его иммобилизации на хроматографической матрице (например, агарозной смоле), то у него не будут наблюдать какую-либо значимую фрагментацию.

Как видно на SDS-PAGE-геле фигуры 3, как у иммобилизированных контрольных димерных лигандов с доменами Z и C (аминокислотные последовательности, изложенные в SEQ ID NO: 85 и 92, соответственно, и представленные дорожками 4 и 10 на SDS-PAGE-геле, соответственно), так и у иммобилизированных димерных лигандов с доменами Z и C, содержащих N-концевую делецию во втором домене (аминокислотные последовательности, изложенные в SEQ ID NO: 78 и 35, соответственно, и представленные дорожками 7 и 13, соответственно), судя по всему, не наблюдали какой-либо выявляемой фрагментации после выдержки в 0,5 М NaOH в течение 25 часов, что позволяло предположить, что они оба являются стабильными в щелочи.

Результаты SDS-PAGE-анализа иммобилизированных пентамерных лигандов с доменами Z после продолжительной выдержки в щелочи (например, выдержка в 0,5 М NaOH в течение 25 часов) показаны на фигуре 5. Как видно на SDS-PAGE-геле фигуры 5, у пентамерного лиганда с доменами Z, содержащего N-концевую делецию во всех за исключением первого домена (SEQ ID NO: 84, и представленного дорожкой 4 на SDS-PAGE-геле), наблюдали намного меньшую фрагментацию по сравнению с контрольным пентамерным доменом Z д.т. типа (SEQ ID NO: 91 и дорожка 7). Этот результат позволяет предположить, что иммобилизированный пентамерный лиганд с доменами Z с N-концевыми делениями является более стабильным в щелочи по сравнению с иммобилизированным пентамерным лигандом с доменом Z, который не имеет таких делеций.

Кроме того, фрагментацию обычно применяемого лиганда (т.е. rSPA) также исследовали с помощью SDS-PAGE после его иммобилизации на агарозной хроматографической смоле и продолжительной выдержки смолы с лигандом в 0,5 М NaOH в течение 25 часов. Как видно на дорожке 10 SDS-PAGE-геля на фигуре 5, у иммобилизованного rSPA наблюдали значимую фрагментацию после выдержки в 0,5 М NaOH в течение 25 часов, что позволяет сделать вывод, что он не очень стабилен в щелочи по сравнению с пентамерными лигандами с доменами Z (дорожки 4 и 7).

Исходя из результатов на SDS-PAGE-геле на фигуре 5, можно заключить, что иммобилизованный пентамерный лиганд с доменами Z с N-концевыми делециями характеризуется меньшей фрагментацией после продолжительного воздействия щелочью и, следовательно, является наиболее стабильным в щелочи по сравнению с

5 иммобилизованным пентамерным контрольным лигандом с доменами Z и иммобилизованным rSPA.

Дополнительное подтверждение результатов SDS-PAGE с иммобилизованными пентамерными лигандами с доменами Z и лигандом rSPA получали с помощью SEC-анализа. Результаты иллюстративного эксперимента изображены на хроматограмме,

10 показанной на фигуре 7. Как видно из фигуры 7, у иммобилизованного лиганда с доменами Z SEQ ID NO: 84 наблюдали уменьшенную фрагментацию после продолжительной выдержки в щелочи, что показано с помощью прямоугольника, по сравнению с его эквивалентом д.т. с SEQ ID NO: 91, у которого наблюдали выделяющиеся низкомолекулярные пики на хроматограмме. Кроме того, как и ожидали,

15 у иммобилизованного rSPA наблюдали избыточную фрагментацию после продолжительной выдержки в щелочи, что было видно по широким и неразрешенным пикам на хроматограмме.

Пример 8: Измерение статической связывающей способности хроматографических матриц с иммуноглобулином до и после воздействия 0,5 М NaOH в течение 25 часов

20 Описанные выше матрицы для аффинной хроматографии (т.е. смолы с иммобилизованными на них лигандами посредством многоточечного прикрепления) дополнительно тестировали на их статическую связывающую способность до и после воздействия 0,5 М NaOH в течение 25 часов.

В одном эксперименте получали 10% суспензию в воде Milli-Q® (MILLIPORE, Биллерика, Массачусетс) каждой из хроматографических матриц (в 1 мл объеме) с

25 иммобилизованными описанными выше димерными или пентамерными лигандами с доменами Z или C, либо при воздействии 0,1, 0,3 или 0,5 М NaOH, либо без воздействия NaOH. 1 мл каждой суспензии добавляли к 15 мл поликлонального IgG (SERACARE, 1 мг/мл) в 10 мМ фосфатно-солевом буферном растворе и перемешивали вращательным

30 движением в течение 4 часов при комнатной температуре. Уменьшение УФ на уровне 280 нм использовали для расчета способности до и после связывающей способности в щелочных условиях. Процент сохранившейся связывающей с IgG способности рассчитывали путем деления связывающей с IgG способности после воздействия щелочью на связывающую с IgG способность без воздействия щелочью. В таблице II

35 подытожены результаты одного такого эксперимента. Как подытожено в таблице II, у димерного лиганда с доменом Z с SEQ ID NO: 78, судя по всему, наблюдали более высокую сохраняющуюся связывающую способность по сравнению с его эквивалентом д.т. (т.е. димерным лигандом с доменом Z с SEQ ID NO: 85), после продолжительной выдержки в щелочи в 0,5 М NaOH в течение 25 часов.

40 Аналогично, как также подытожено в приведенной ниже таблице II, у димерного лиганда с доменом C с SEQ ID NO: 35, судя по всему, наблюдали более высокую сохраняющуюся связывающую способность, чем у его эквивалента д.т. с SEQ ID NO: 92, после продолжительной выдержки в щелочи в 0,5 М NaOH в течение 25 часов.



Таблица II

5	<b>Последовательность иммобилизированного на матрице лиганда</b>	<b>Сохраняющаяся статическая связывающая с IgG способность матрицы (%)</b>
	SEQ ID NO: 85	64
10	SEQ ID NO: 78	70
	SEQ ID NO: 92	65
	SEQ ID NO: 35	70

15 В дополнительном эксперименте связывающую с IgG способность пентамерного лиганда с доменами Z оценивали после продолжительной выдержки в щелочи в 0,1 М NaOH, 0,3 М NaOH или 0,5 М NaOH в течение 25 часов. Результаты одного такого эксперимента подытожены в приведенной ниже таблице III.

20 В таблице III продемонстрирован процент сохраняющейся связывающей с IgG способности матрицы с иммобилизированной на ней пентамерной формой лиганда с доменами Z, который содержит мутацию A29K, и все, за исключением первого, домены содержат делецию четырех последовательных аминокислот с N-конца (аминокислотная последовательность, показанная в SEQ ID NO: 84), после выдержки матрицы в 0,1 М NaOH, 0,3 М NaOH или 0,5 М NaOH. Как подытожено ниже, у матрицы с пентамерным лигандом с содержащим N-концевую делецию доменом Z наблюдали до 95% от  
25 изначальной связывающей способности после выдержки в 0,1 М NaOH в течение 25 часов; до 85% от изначальной связывающей способности после выдержки в 0,3 М NaOH в течение 25 часов и до 65% от изначальной связывающей способности после выдержки в 0,5 М NaOH в течение 25 часов.

30	<b>Концентрация NaOH (М)</b>	<b>Сохраняющаяся статическая связывающая с IgG способность матрица с иммобилизированной SEQ ID NO 84 (%)</b>
	0,1	95
35	0,3	85
	0,5	65

Пример 9: SpA-захват IgG до и после воздействия 0.5 М NaOH

40 В этом эксперименте очистку поликлонального иммуноглобулина у загрузочного материала нуль-СНО-S с помощью матрицы с иммобилизированным пентамером лиганда с доменами Z, причем все, за исключением первого, домены характеризуются наличием делеций 4 последовательных аминокислот, исследовали наряду с очисткой с помощью рекомбинантно синтезированного SpA (rSPA) с целью демонстрации того, что лиганды по настоящему изобретению работают так же хорошо, как и  
рекомбинантный SpA, при удалении примесей.

45 Каждый из образцов смолы с иммобилизированным rSPA (REPLIGEN, Уолтем, Массачусетс) и пентамерным лигандом с доменом Z (аминокислотная последовательность, показанная в SEQ ID NO: 84) упаковывали в хроматографическую колонку с диаметром 1 см и высотой упакованного слоя 5 см. После уравнивания

с помощью фосфатно-солевого буферного раствора (10 мМ фосфат натрия) в упакованные смолы вводили загрузочный материал нуль-СНО с поликлональным hIgG (SERACARE, 5 мг/мл) со скоростью потока 50 см/ч. После загрузки на уровне 90% 5% проскока смолу промывали посредством PBS-буфера и 50 мМ NaOAc, pH 5,5. Затем связавшийся IgG элюировали с помощью 50 мМ NaOAc, pH 3. Фракции собирали и анализировали анализом на наличие примесей. Упакованную смолу затем подвергали воздействию 0,5 М NaOH в течение 15 минут (со скоростью потока 100 см/час) перед повторным введением в контакт с поликлональным hIgG в загрузочном материале нуль-СНО. Смолы затем промывали посредством PBS-буфера и 50 мМ NaOAc, pH 5,5, а IgG элюировали для последующего анализа.

Такое воздействие щелочью и цикл с подачей загрузочного материала повторяли для сбора достаточного количества IgG для последующего катионообменного этапа. Выщелоченный белок А количественно оценивали с применением набора n-Protein A ELISA (REPLIGEN, Уолтем, Массачусетс) согласно инструкциям от производителя. Белок клеток-хозяев выявляли при помощи набора 3G CHO HCP ELISA (CYGNUS TECHNOLOGIES, Саутпорт, Северная Каролина) согласно инструкциям производителя. ДНК выявляли с применением реактива dsDNA PicoGreen® Quant-iT™ (LIFE TECHNOLOGIES, Фостер Сити, Калифорния). Результаты одного такого иллюстративного эксперимента показаны в таблице IV.

Пример 10: Очистка выщелоченных SpA-лигандов и дальнейшее удаление ДНК и белка клеток-хозяев с помощью катионообменной и анионообменной хроматографии

Очистка выщелоченных лигандов, а также дальнейшее удаление белков клеток-хозяев (HCP) и ДНК из полученного в результате элюирования пула у матриц для аффинной хроматографии, включающих любой из SpA-лигандов по настоящему изобретению, или матриц, содержащих рекомбинантные SpA, rSPA (REPLIGEN, Уолтем, Массачусетс), исследовали описываемым далее способом.

Объединение полученного в результате элюирования пула от нескольких повторов описанного в примере 8 эксперимента давало загрузочный материал для дальнейшего выведения выщелоченных лигандов и других примесей с применением катионообменной хроматографии.

Фрактогель  $\text{SO}_3^-$  (MILLIPORE, Биллерика, Массачусетс) упаковывали в колонку с размером слоя 1,0 см (внутренний диаметр)×7 см (высота слоя). Колонку уравнивали с помощью 50 мМ NaOAc, pH 4,5, 4 мСм/см, и нагружали объединенным IgG, полученным в результате элюирования с белком А, со скоростью 140 см/час. После промывки колонки при помощи EQ-буфера IgG элюировали с помощью 0,5 н NaCl в 50 мМ NaOAc посредством 20 объемов колонки (с линейным градиентом). Получаемые в результате элюирования пулы собирали в 10 мл фракции и анализировали в отношении выщелоченных лигандов, ДНК и белка клеток-хозяев.

Фракции из колонки с фрактогелем  $\text{SO}_3^-$  дополнительно объединяли и доводили до pH 7,6 при 12 мСм/см. Этот загрузочный материал нагружали на предварительно уравновешенное (трис, 25 мМ, pH 7,6, ~1 мСм/см) устройство ChromaSorb (0,08 мл, MILLIPORE, Биллерика, Массачусетс) со скоростью потока 1 мл/мин. Фракции собирали для каждого 187 объема колонки и дополнительно анализировали в отношении выщелоченного лиганда и белка клетки-хозяина, как описано в примере 8.

Как подытожено на приведенной ниже таблице IV, как выщелоченный лиганд rSPA, так и пентамерная форма домена Z со всеми, кроме первого, доменами, характеризующимися N-концевой делецией четырех последовательных аминокислот

(SEQ ID NO: 84), могут быть очищены до менее 1 PPM после катионообменной и анионообменной хроматографии. Кроме того, удаление белков и ДНК клетки-хозяина соответствует нормам промышленного стандарта и является более или менее эквивалентным в обоих случаях, что также подытожено на приведенной ниже таблице.

Таблица IV

Лиганд на смоле		rSPA	SEQ ID NO:
			84
Выщелоченный белок А (PPM)	Пул белка А	7,1	3,8
	Полученный в результате катионообменной хроматографии пул	1,1	1,1
	Полученный в результате анионообменной хроматографии пул (при загрузке 1 г/мл)	0,6	1,0
Белки клетки-хозяина (PPM)	Загрузочный материал	25568	25568
	Пул белка А	232	133
	Полученный в результате катионообменной хроматографии пул	49	60
	Полученный в результате анионообменной хроматографии пул (при загрузке 1 г/мл)	3	7
ДНК (PPM)	Загрузочный материал	6,8	6,8
	Пул белка А	0,05	0,04
Полученный в результате катионообменной хроматографии пул		0,03	0,03
Полученный в результате анионообменной хроматографии пул (при загрузке 1 г/мл)	Ниже предела выявления	Ниже предела	Ниже предела

Пример 11: Влияние количества N-концевых аминокислотных делеций на фрагментацию лиганда после продолжительной выдержки в щелочи

В другом примере, 1, 2, 3 или 4 аминокислотных остатка удаляли с N-конца второго

домена димерного лиганда с доменами Z, начиная с положения 1, и определяли влияние 1, 2, 3 или 4 аминокислотных делеций на фрагментацию лиганда после продолжительной выдержки в щелочи по сравнению с контрольным димерным лигандом с доменами Z (A29K).

5 Результаты одного такого эксперимента изображены на хроматограмме, показанной на фигуре 8. Как продемонстрировано на фигуре 8, влияние на фрагментацию количества аминокислотных остатков, которые были удалены с N-конца второго домена димерного лиганда с доменом Z, можно наблюдать после продолжительной выдержки в щелочи каждого из лигандов в 0,5 М NaOH в течение 25 часов с последующим проведением  
10 SEC-анализа, который описан в примере 5.

После выдержки лигандов в 0,5 М NaOH в течение 25 часов, у каждого из контрольного лиганда (SEQ ID NO: 85), лиганда с единственной удаленной с N-конца второго домена аминокислотой (SEQ ID NO: 87), и лиганда с первыми двумя удаленными с N-конца второго домена аминокислотами (SEQ ID NO: 88) наблюдали фрагменты с  
15 более низкой молекулярной массой, которые указаны при помощи стрелочек, что свидетельствует о фрагментации. Между тем, у лиганда с первыми тремя удаленными с N-конца второго домена аминокислотами (SEQ ID NO: 69) и лиганда с первыми четырьмя удаленными с N-конца второго домена аминокислотами (SEQ ID NO: 78) наблюдали значительно уменьшенную фрагментацию с более низкой молекулярной  
20 массой, как указано при помощи прямоугольников на хроматограмме, что свидетельствует об уменьшенной фрагментации.

Эти результаты позволяют предположить, что аффинные лиганды на основе одного или нескольких доменов белка A и по меньшей мере с 3 удаленными с N-конца одного или нескольких доменов аминокислотами характеризуются уменьшенной фрагментацией  
25 после продолжительного воздействия щелочью и, соответственно, являются преимущественными кандидатами для применения в качестве лигандов для аффинной хроматографии.

Пример 12: Сравнение сохраняющейся связывающей способности у пентамеров с доменом C с N-концевыми делениями и дикого типа, причем оба имеют мутацию не в  
30 Fab-участке (G29K)

В настоящем эксперименте исследовали сохраняющуюся связывающую способность у двух пентамерных лигандов с доменами C, иммобилизованных на хроматографической матрице на основе поливинилового спирта, причем один лиганд имеет N-концевую делецию (начиная с положения 1) 4 аминокислот в каждом из 5  
35 доменов, аланин в качестве первой аминокислоты пентамерной последовательности с целью улучшения однородного посттрансляционного процессинга, а также мутацию G29K (аминокислотная последовательность которого показана в SEQ ID NO: 93), а другой лиганд соответствует его эквиваленту д.т. с мутацией G29K (аминокислотная последовательность которого показана в SEQ ID NO: 95).

40 Лиганды иммобилизовали на смолы для аффинной хроматографии на основе поливинилового спирта посредством многоточечного прикрепления (см., например, Hermanson et al., Immobilized Affinity Ligand Techniques, Academic Press, pp. 51-136 (1992)) и тестировали на сохраняющуюся динамическую связывающую способность после повторного воздействия NaOH.

45 В одном эксперименте хроматографические матрицы упаковывали в колонки (0,66 см внутренний диаметр × 1,0 см высота слоя) и подвергали стандартному циклу хроматографирования путем уравнивания с последующим нанесением 30 мг поликлонального IgG человека (hIgG) со скоростью 60 см/час. После тщательной

отмывки несвязавшихся белков при помощи равновесного буфера (10 мМ фосфатно-солевого буферного раствора) связавшиеся IgG элюировали при помощи элюирующего буфера (0,1 М уксусной кислоты, pH 3) со скоростью 60 см/час. За этим следовала очистка без разборки (CIP) посредством 0,7 М NaOH в течение 30 минут. Колонку

5 повторно уравнивали и циклы повторяли еще 16 раз (общее воздействие 0,7 М NaOH в течение 8 часов). Сохраняющуюся связывающую способность измеряли при помощи определения общего количества элюированного IgG (элюирующий объем, умноженный на концентрацию IgG, измеренную при УФ<sub>280</sub>) с течением времени.

Относительную сохраняющуюся способность строили на графике относительно первого

10 цикла с 0 мин воздействием NaOH, и она показана на фигуре 9. Этот эксперимент повторяли 3 раза с похожими результатами. Как продемонстрировано на фигуре 9, у обоих пентамерных лигандов с доменами С, с и без делеций, наблюдали похожую сохраняющуюся связывающую способность после продолжительного воздействия NaOH с течением времени. Кроме того, в другом эксперименте сохраняющуюся

15 связывающую способность пентамерного лиганда с доменами С без аланина и с мутацией G29K (аминокислотная последовательность которого показана в SEQ ID NO: 80) сравнивали с его эквивалентом д.т. с мутацией G29K (аминокислотная последовательность которого показана в SEQ ID NO: 95) с похожим результатом (данные не показаны).

20 Описание будет наиболее полностью понятно в свете идей источников, указанных в ссылках, процитированных в описании, которые, таким образом, включены по упоминанию. Варианты осуществления в настоящем описании дают иллюстрацию вариантов осуществления настоящего изобретения и не должны трактоваться как

25 ограничивающие его объем. Специалист в данной области легко поймет, что настоящим изобретением охвачены многие другие варианты осуществления. Все публикации и изобретения включены при помощи ссылки в их полном объеме. В случае, если включенный по ссылке материал конфликтует или не соответствует настоящему описанию, то настоящее описание будет заменять любой такой материал. Упоминание

30 любых ссылок в настоящем документе не является признанием того, что такие ссылки являются прототипом настоящего изобретения.

Если не указано иное, все числа, указывающие количества ингредиентов, клеточной культуры, условий обработки и т.д., используемые в настоящем описании, включая формулу изобретения, необходимо понимать как модифицируемые во всех случаях термином "приблизительно". Соответственно, если не указано иное об обратном,

35 числовые параметры являются приближениями и могут варьировать в зависимости от требуемых свойств, которые необходимо получить с помощью настоящего изобретения. Если не указано иное, предшествующий серии элементов термин "по меньшей мере" необходимо понимать как относящийся к каждому элементу в серии. Специалисты в данной области техники поймут или смогут установить с помощью постановки всего-

40 навсего простого эксперимента многие эквиваленты для конкретных вариантов осуществления описываемого в настоящем документе настоящего изобретения. Такие эквиваленты рассматривают как охватываемые приведенной далее формулой изобретения.

Многие модификации и вариации настоящего изобретения могут быть осуществлены

45 без отступления за пределы его идеи и объема, что будет очевидно для специалистов в данной области. Конкретные описываемые в настоящем документе варианты осуществления предложены лишь для примера и не должны пониматься как каким-либо образом ограничивающие. Подразумевают, что настоящее описание и примеры

рассмотрены как только иллюстративные, причем истинный объем и идея настоящего изобретения указана в приведенной далее формуле изобретения.

(57) Формула изобретения

1. Способ очистки одного или нескольких иммуноглобулинов из образца, причем способ включает следующие этапы:

(а) получение образца, содержащего один или несколько иммуноглобулинов;

(b) контактирование образца с матрицей в таких условиях, что один или несколько иммуноглобулинов связываются с матрицей, где матрица содержит лиганд для аффинной хроматографии, прикрепленный к твердой подложке, и который представляет собой лиганд на основе двух или более доменов В, или двух или более доменов Z, или двух или более доменов С белка A *Staphylococcus aureus*, причем каждый домен содержит делецию по меньшей мере 3 или 4 последовательных аминокислот с N-конца, начиная с положения 1 или 2, соответствующего положениям доменов В, Z или С дикого типа, и дополнительно содержит мутацию для уменьшения Fab-связывания; и

(с) выделение одного или нескольких связавшихся иммуноглобулинов путем элюирования.

2. Способ по п. 1, причем образец выбран из группы, состоящей из культуральной жидкости, культурального супернатанта и ферментативного бульона.

3. Способ по п. 1, причем мутация для уменьшения Fab-связывания предусматривает замену остатка аминокислоты глицин в положении 29 в домене В и домене С остатком аминокислоты лизин, замену остатка аминокислоты аланин в положении 29 в домене Z остатком аминокислоты лизин.

4. Способ по п. 1, причем у лиганда наблюдается уменьшенная фрагментация по сравнению с эквивалентом дикого типа после воздействия 0,5 М NaOH в течение по меньшей мере 5 часов.

5. Способ по п. 1, причем матрица сохраняет по меньшей мере 95% от изначальной связывающей способности через 5 часов инкубации в 0,5 М NaOH.

6. Способ по п. 1, причем матрица сохраняет по меньшей мере 95% от изначальной связывающей способности через 25 часов инкубации в 0,1 М NaOH.

7. Способ по п. 1, причем образец представляет собой осветленный культуральный бульон клеток.

8. Способ отделения иммуноглобулина от одного или нескольких белков клеток-хозяев (НСР), ДНК, вирусов, эндотоксинов, питательных веществ, одного или нескольких компонентов клеточной культуральной среды и связанных с продуктом примесей, причем способ включает следующие этапы:

(а) получение образца, содержащего иммуноглобулин и один или несколько из белков клеток-хозяев (НСР), ДНК, вирусов, эндотоксинов, питательных веществ, один или несколько компонентов клеточной культуральной среды и связанных с продуктом примесей;

(b) контактирование образца с матрицей в таких условиях, что иммуноглобулин связывается с матрицей, где матрица содержит лиганд для аффинной хроматографии, прикрепленный к твердой подложке, который представляет собой лиганд на основе двух или более доменов В, или двух или более доменов Z, или двух или более доменов С белка A *Staphylococcus aureus*, причем каждый домен содержит делецию по меньшей мере 3 или 4 последовательных аминокислот с N-конца, начиная с положения 1 или 2, соответствующего положениям доменов В, Z или С дикого типа, и дополнительно содержит мутацию для уменьшения Fab-связывания; и

(с) выделение связавшегося иммуноглобулина путем элюирования для отделения иммуноглобулина от одного или нескольких белков клеток-хозяев (НСР), ДНК, вирусов, эндотоксинов, питательных веществ, одного или нескольких компонентов клеточной культуральной среды и связанных с продуктом примесей.

5 9. Способ по п. 8, причем образец представляет собой ферментативный бульон.

10. Способ по п. 8, причем мутация для уменьшения Fab-связывания предусматривает замену остатка аминокислоты глицин в положении 29 в домене В и домене С остатком аминокислоты лизин, замену остатка аминокислоты аланин в положении 29 в домене Z остатком аминокислоты лизин.

10 11. Способ по п. 8, причем один или несколько компонентов клеточной культуральной среды выбраны из группы, состоящей из пеногасителей и антибиотиков.

12. Способ по п. 8, причем связанные с продуктом примеси включают неправильно свернутые частицы и агрегаты.

15 13. Способ по п. 8, причем образец представляет собой осветленный культуральный бульон клеток.

14. Способ по п. 8, причем матрица сохраняет по меньшей мере 95% от изначальной связывающей способности через 5 часов инкубации в 0,5 М NaOH.

15. Способ по п. 8, причем матрица сохраняет по меньшей мере 95% от изначальной связывающей способности через 25 часов инкубации в 0,1 М NaOH.

20 16. Способ по п. 8, причем у лиганда наблюдается уменьшенная фрагментация по сравнению с эквивалентом дикого типа после воздействия 0,5 М NaOH в течение по меньшей мере 5 часов.

25

30

35

40

45

## ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> SPECTOR, SHARI  
SMITH, ROBERT  
ORLANDO, JOE  
NANYING, BIAN

<120> ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ МАТРИЦЫ, СОДЕРЖАЩИЕ НОВЫЕ ЛИГАНДЫ  
НА ОСНОВЕ БЕЛКА STAPHYLOCOCCUS AUREUS

<130> MCA-1353 US

<140>

<141>

<150> 61/494,701

<151> 2011-06-08

<160> 96

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 51

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 1

Ala Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Gln Val Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn  
1 5 10 15

Ala Asp Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser  
20 25 30

Gln Ser Ala Asn Val Leu Gly Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln  
35 40 45

Ala Pro Lys  
50

<210> 2

<211> 58

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<400> 2

Ala Asp Asn Asn Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15

Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln  
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala  
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55

<210> 3

<211> 58



<212> PRT  
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 3  
 Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
 1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln  
 20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala  
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 50 55

<210> 4  
 <211> 58  
 <212> PRT  
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 4  
 Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
 1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln  
 20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala  
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 50 55

<210> 5  
 <211> 61  
 <212> PRT  
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 5  
 Ala Asp Ala Gln Gln Asn Lys Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe  
 1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly  
 20 25 30

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
 35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
 50 55 60

<210> 6  
 <211> 58  
 <212> PRT  
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 6  
Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15  
Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln  
20 25 30  
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala  
35 40 45  
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
50 55

<210> 7  
<211> 159  
<212> ДНК  
<213> Staphylococcus aureus

<400> 7  
gcgcaacaaa acgcttttcta tcaggtactg aacatgccta acctgaacgc cgatcagcgt 60  
aacggcttca tccaaagcct gaaggacgac ccgagccagt ccgcaaactg tctgggtgaa 120  
gctcaaaaac tgaacgacag ccaggcaccg aaagctgac 159

<210> 8  
<211> 174  
<212> ДНК  
<213> Staphylococcus aureus

<400> 8  
gccgacaaca acttcaacaa agagcagcaa aacgctttct acgaaatcct gaatatgccca 60  
aatctgaacg aagagcagcg taacggtttc atccaatctc tgaaagacga tccgtcccag 120  
tccgcgaatc tgctggcgga ggctaaaaag ctgaacgaat cccaggctcc gaaa 174

<210> 9  
<211> 174  
<212> ДНК  
<213> Staphylococcus aureus

<400> 9  
gcagacaata agttcaataa agagcagcag aacgcatttt acgagatcct gcatctgccg 60  
aacctgaacg aagaacaacg caacggtttc attcagagcc tgaaagacga cccatctcag 120  
tccgctaacc tgctggcgga agcaagaag ctgaacgatg cacaggcgcc gaaa 174

<210> 10  
<211> 174  
<212> ДНК  
<213> Staphylococcus aureus

<400> 10  
gcggataaca aattcaacaa ggagcaacag aacgcattct atgaaattct gcacctgccg 60  
aatctgacgg aggagcaacg taacggcttt atccagtcct tgaaggatga tccgtctgtg 120  
tctaaagaga tcctggcgga ggcaaaaaaa ctgaatgatg cacaagctcc gaaa 174

Page 3

<210> 11  
 <211> 177  
 <212> ДНК  
 <213> Staphylococcus aureus

<400> 11  
 gcccaacaga acaaatttaa caaagaccag cagtccgctg tctacgagat tctgaacatg 60  
 cctaacctga atgaagaaca gcgcaacggt tttattcagt ctctgaagga cgatccttct 120  
 caatccacca acgtactggg cgaagcgaag aaactgaacg aatctcaggc tccgaag 177

<210> 12  
 <211> 174  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид  
 <400> 12  
 gtagacaaca aattcaataa agaacagcag aacgctttct atgaaatcct gcacctgccg 60  
 aacctgaacg aagaacagcg taacgcgttt atccagtccc tgaaagacga cccgagccag 120  
 agcgcaaatc tgctggcgga agcgaaaaag ctgaacgatg cccaggcgcc gaaa 174

<210> 13  
 <211> 55  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид  
 <400> 13  
 Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu 15  
 1 5 10

Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys 30  
 20 25 30

Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu 45  
 35 40 45

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys 55  
 50 55

<210> 14  
 <211> 55  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 14

Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu  
1 5 10 15

Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys  
20 25 30

Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu  
35 40 45

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
50 55

<210> 15

<211> 55

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 15

Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu  
1 5 10 15

Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys  
20 25 30

Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu  
35 40 45

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
50 55

<210> 16

<211> 110

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 16

Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu  
1 5 10 15

Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys  
20 25 30

Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu  
35 40 45

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala  
50 55 60

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn  
65 70 75 80

Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu  
85 90 95

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
100 105 110

<210> 17

<211> 110

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 17

Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu  
1 5 10 15

Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys  
20 25 30

Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu  
35 40 45

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala  
50 55 60

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn  
65 70 75 80

Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile  
85 90 95

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
100 105 110

<210> 18

<211> 110

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 18

Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu  
1 5 10 15

Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys  
20 25 30

Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu  
35 40 45

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala  
50 55 60

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn  
65 70 75 80

Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu  
85 90 95

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
100 105 110

<210> 19

<211> 113

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 19

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln  
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala  
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln  
50 55 60

Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu  
65 70 75 80

Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser  
85 90 95

Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro  
100 105 110

Lys

<210> 20

<211> 113

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 20

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln  
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala  
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln  
50 55 60

Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu  
65 70 75 80

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

Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro  
100 105 110

Lys

<210> 21

<211> 113

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 21

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln  
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala  
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln  
50 55 60

Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu  
65 70 75 80

Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser  
85 90 95

Page 8

Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro  
 100 105 110

Lys

<210> 22  
 <211> 275  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 22  
 Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu  
 1 5 10 15

Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys  
 20 25 30

Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu  
 35 40 45

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala  
 50 55 60

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn  
 65 70 75 80

Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu  
 85 90 95

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe  
 100 105 110

Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn  
 115 120 125

Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp  
 130 135 140

Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp  
 145 150 155 160

Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr  
 165 170 175

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe  
 180 185 190



Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala  
195 200 205

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys  
210 215 220

Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn  
225 230 235 240

Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser  
245 250 255

Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln  
260 265 270

Ala Pro Lys  
275

<210> 23  
<211> 275  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 23  
Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu  
1 5 10 15

Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys  
20 25 30

Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu  
35 40 45

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala  
50 55 60

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn  
65 70 75 80

Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile  
85 90 95

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe  
100 105 110

Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn  
115 120 125

Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp  
130 135 140

Page 10

Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp  
 145 150 155 160  
 Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr  
 165 170 175  
 Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe  
 180 185 190  
 Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala  
 195 200 205  
 Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys  
 210 215 220  
 Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr  
 225 230 235 240  
 Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser  
 245 250 255  
 Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln  
 260 265 270  
 Ala Pro Lys  
 275  
 <210> 24  
 <211> 275  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 полипептид  
 <400> 24  
 Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu  
 1 5 10 15  
 Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys  
 20 25 30  
 Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu  
 35 40 45  
 Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala  
 50 55 60  
 Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn  
 65 70 75 80

Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu  
85 90 95

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe  
100 105 110

Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn  
115 120 125

Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp  
130 135 140

Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp  
145 150 155 160

Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr  
165 170 175

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe  
180 185 190

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala  
195 200 205

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys  
210 215 220

Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn  
225 230 235 240

Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser  
245 250 255

Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln  
260 265 270

Ala Pro Lys  
275

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 278

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

&lt;400&gt; 25

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln  
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala  
 35 40 45  
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln  
 50 55 60  
 Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser  
 85 90 95  
 Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro  
 100 105 110  
 Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His  
 115 120 125  
 Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu  
 130 135 140  
 Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys  
 145 150 155 160  
 Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn  
 165 170 175  
 Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg  
 180 185 190  
 Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn  
 195 200 205  
 Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys  
 210 215 220  
 Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro  
 225 230 235 240  
 Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
 245 250 255  
 Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
 260 265 270  
 Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 275

<210> 26  
 <211> 278

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

&lt;400&gt; 26

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

Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
245 250 255

Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
260 265 270

Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
275

<210> 27

<211> 278

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 27

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln  
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala  
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln  
50 55 60

Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu  
65 70 75 80

Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser  
85 90 95

Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro  
100 105 110

Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His  
115 120 125

Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu  
130 135 140

Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys  
145 150 155 160

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn  
165 170 175

Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg  
180 185 190

Page 15

Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn  
 195 200 205

Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys  
 210 215 220

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro  
 225 230 235 240

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
 245 250 255

Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
 260 265 270

Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 275

<210> 28  
 <211> 54  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 28  
 Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro  
 1 5 10 15

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
 20 25 30

Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
 35 40 45

Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 50

<210> 29  
 <211> 54  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 29  
 Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro  
 1 5 10 15

Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
 20 25 30

Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
35 40 45

Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
50

<210> 30  
<211> 54  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 30  
Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro  
1 5 10 15

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
20 25 30

Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
35 40 45

Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
50

<210> 31  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 31  
Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro  
1 5 10 15

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
20 25 30

Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
35 40 45

Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr  
50 55 60

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

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala  
85 90 95



Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
100 105

<210> 32

<211> 108

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 32

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro  
1 5 10 15

Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
20 25 30

Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
35 40 45

Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr  
50 55 60

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe  
65 70 75 80

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala  
85 90 95

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
100 105

<210> 33

<211> 108

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 33

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro  
1 5 10 15

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
20 25 30

Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
35 40 45

Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr  
50 55 60

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe  
65 70 75 80

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala  
85 90 95

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
100 105

<210> 34  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 34  
Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln  
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala  
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln  
50 55 60

Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln  
65 70 75 80

Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala  
85 90 95

Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
100 105 110

<210> 35  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 35  
Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln  
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala  
35 40 45  
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln  
50 55 60  
Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln  
65 70 75 80  
Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys  
85 90 95  
Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
100 105 110

<210> 36  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид  
<400> 36  
Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln  
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala  
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln  
50 55 60

Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln  
65 70 75 80

Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala  
85 90 95

Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
100 105 110

<210> 37  
<211> 270  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

&lt;400&gt; 37

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

Page 21

<210> 38  
 <211> 270  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 38  
 Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro  
 1 5 10 15  
 Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
 20 25 30  
 Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
 35 40 45  
 Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr  
 50 55 60  
 Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe  
 65 70 75 80  
 Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala  
 85 90 95  
 Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu  
 100 105 110  
 Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu  
 115 120 125  
 Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val  
 130 135 140  
 Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala  
 145 150 155 160  
 Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His  
 165 170 175  
 Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu  
 180 185 190  
 Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys  
 195 200 205  
 Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala  
 210 215 220

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn  
225 230 235 240

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

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
260 265 270

<210> 39

<211> 270

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 39

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro  
1 5 10 15

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
20 25 30

Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
35 40 45

Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr  
50 55 60

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe  
65 70 75 80

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala  
85 90 95

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu  
100 105 110

Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu  
115 120 125

Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln  
130 135 140

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

Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His  
165 170 175

Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu  
180 185 190

Page 23

Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys  
195 200 205

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala  
210 215 220

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn  
225 230 235 240

Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu  
245 250 255

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
260 265 270

<210> 40

<211> 274

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 40

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln  
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala  
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln  
50 55 60

Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln  
65 70 75 80

Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala  
85 90 95

Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
100 105 110

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro  
115 120 125

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
130 135 140

Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
 145 150 155 160  
 Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr  
 165 170 175  
 Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe  
 180 185 190  
 Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala  
 195 200 205  
 Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu  
 210 215 220  
 Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu  
 225 230 235 240  
 Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln  
 245 250 255  
 Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala  
 260 265 270  
 Pro Lys

<210> 41  
 <211> 274  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 полипептид  
 <400> 41  
 Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
 1 5 10 15  
 Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln  
 20 25 30  
 Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala  
 35 40 45  
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln  
 50 55 60  
 Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln  
 65 70 75 80  
 Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys  
 85 90 95

Page 25



Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
100 105 110

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro  
115 120 125

Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
130 135 140

Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
145 150 155 160

Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr  
165 170 175

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe  
180 185 190

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala  
195 200 205

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu  
210 215 220

Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu  
225 230 235 240

Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val  
245 250 255

Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala  
260 265 270

Pro Lys

<210> 42

<211> 274

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 42

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln  
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala  
 35 40 45  
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln  
 50 55 60  
 Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln  
 65 70 75 80  
 Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala  
 85 90 95  
 Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 100 105 110  
 Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro  
 115 120 125  
 Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
 130 135 140  
 Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
 145 150 155 160  
 Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr  
 165 170 175  
 Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe  
 180 185 190  
 Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala  
 195 200 205  
 Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu  
 210 215 220  
 Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu  
 225 230 235 240  
 Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln  
 245 250 255  
 Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala  
 260 265 270

Pro Lys

<210> 43  
 <211> 51  
 <212> PRT  
 <213> staphylococcus aureus

Page 27

&lt;400&gt; 43

Ala Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Gln Val Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn  
 1 5 10 15

Ala Asp Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser  
 20 25 30

Gln Ser Ala Asn Val Leu Gly Glu Ala Gln Lys Leu Asn Asp Ser Gln  
 35 40 45

Ala Pro Lys  
 50

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 58

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Staphylococcus aureus

&lt;400&gt; 44

Ala Asp Asn Asn Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
 1 5 10 15

Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln  
 20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala  
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
 50 55

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 58

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Staphylococcus aureus

&lt;400&gt; 45

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
 1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln  
 20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala  
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 50 55

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 58

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Staphylococcus aureus

&lt;400&gt; 46

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln  
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala  
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
50 55

<210> 47  
<211> 61  
<212> PRT  
<213> Staphylococcus aureus

<400> 47  
Ala Asp Ala Gln Gln Asn Lys Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe  
1 5 10 15

Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys  
20 25 30

Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu  
35 40 45

Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55 60

<210> 48  
<211> 58  
<212> PRT  
<213> Staphylococcus aureus

<400> 48  
Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln  
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala  
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
50 55

<210> 49  
<211> 159  
<212> ДНК  
<213> Staphylococcus aureus

<400> 49  
gcgcaacaaa acgctttcta tcaggtactg aacatgccta acctgaacgc cgatcagcgt 60

aacaaattca tccaaagcct gaaggacgac ccgagccagt ccgcaaactgt tctgggtgaa 120  
gctcaaaaac tgaacgacag ccaggcaccg aaagctgac 159

<210> 50  
<211> 174  
<212> ДНК  
<213> Staphylococcus aureus

<400> 50  
gccgacaaca atttcaaca agagcagcaa aacgctttct acgaaatcct gaatatgcc 60  
aatctgaacg aagagcagcg taacaaattc atccaatctc tgaagacga tccgtcccag 120  
tccgcgaatc tgctggcgga ggctaaaaag ctgaacgaat cccaggctcc gaaa 174

<210> 51  
<211> 174  
<212> ДНК  
<213> Staphylococcus aureus

<400> 51  
gcagacaata agttcaataa agagcagcag aacgcatttt acgagatcct gcatctgccg 60  
aacctgaacg aagaacaacg caacaaattc attcagagcc tgaagacga cccatctcag 120  
tccgctaacc tgctggcgga agcaagaag ctgaacgatg cacaggcgcc gaaa 174

<210> 52  
<211> 174  
<212> ДНК  
<213> Staphylococcus aureus

<400> 52  
gcggataaca aattcaaca ggagcaacag aacgcattct atgaaattct gcacctgccg 60  
aatctgacgg aggagcaacg taacaaattt atccagtcct tgaaggatga tccgtctgtg 120  
tctaaagaga tcctggcgga ggcaaaaaa ctgaatgatg cacaagctcc gaaa 174

<210> 53  
<211> 177  
<212> ДНК  
<213> Staphylococcus aureus

<400> 53  
gcccacaga acaaatttaa caaagaccag cagtccgct tctacgagat tctgaacatg 60  
cctaacctga atgaagaaca gcgcaacaaa ttattcagct ctctgaagga cgatccttct 120  
caatccacca acgtactggg cgaagcgaag aaactgaacg aatctcaggc tccgaag 177

<210> 54  
<211> 174  
<212> ДНК  
<213> Staphylococcus aureus

<400> 54  
gtagacaaca aattcaataa agaacagcag aacgctttct atgaaatcct gcacctgccg 60  
aacctgaacg aagaacagcg taacaaattt atccagtcct tgaagacga cccgagccag 120  
agcgcaaatc tgctggcgga agcgaaaaa ctgaacgatg cccaggcgcc gaaa 174

<210> 55  
 <211> 55  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид  
  
 <400> 55  
 Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu  
 1 5 10 15  
  
 Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys  
 20 25 30  
  
 Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu  
 35 40 45  
  
 Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 50 55

<210> 56  
 <211> 55  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид  
  
 <400> 56  
 Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu  
 1 5 10 15  
  
 Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys  
 20 25 30  
  
 Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu  
 35 40 45  
  
 Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 50 55

<210> 57  
 <211> 55  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид  
  
 <400> 57  
 Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu  
 1 5 10 15

Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys  
20 25 30

Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu  
35 40 45

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
50 55

<210> 58

<211> 110

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 58

Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu  
1 5 10 15

Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys  
20 25 30

Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu  
35 40 45

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala  
50 55 60

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn  
65 70 75 80

Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu  
85 90 95

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
100 105 110

<210> 59

<211> 110

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 59

Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu  
1 5 10 15

Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys  
20 25 30

Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu  
35 40 45

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala  
50 55 60

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn  
65 70 75 80

Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile  
85 90 95

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
100 105 110

<210> 60

<211> 110

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 60

Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu  
1 5 10 15

Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys  
20 25 30

Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu  
35 40 45

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala  
50 55 60

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn  
65 70 75 80

Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu  
85 90 95

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
100 105 110

<210> 61

<211> 113

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 61



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

<210> 62  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 62  
 Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
 1 5 10 15  
 Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln  
 20 25 30  
 Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala  
 35 40 45  
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln  
 50 55 60  
 Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser  
 85 90 95  
 Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro  
 100 105 110

Page 34

Lys

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 113

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

&lt;400&gt; 63

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

Lys

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 275

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

&lt;400&gt; 64

Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu  
1 5 10 15Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys  
20 25 30Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu  
35 40 45

Page 35

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala  
 50 55 60  
 Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn  
 65 70 75 80  
 Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu  
 85 90 95  
 Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe  
 100 105 110  
 Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn  
 115 120 125  
 Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp  
 130 135 140  
 Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp  
 145 150 155 160  
 Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr  
 165 170 175  
 Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe  
 180 185 190  
 Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala  
 195 200 205  
 Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys  
 210 215 220  
 Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn  
 225 230 235 240  
 Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser  
 245 250 255  
 Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln  
 260 265 270  
 Ala Pro Lys  
 275

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 275

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 65

```

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

```

Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln  
 260 265 270

Ala Pro Lys  
 275

<210> 66

<211> 275

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 66

Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu  
 1 5 10 15

Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys  
 20 25 30

Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu  
 35 40 45

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala  
 50 55 60

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn  
 65 70 75 80

Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu  
 85 90 95

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe  
 100 105 110

Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn  
 115 120 125

Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp  
 130 135 140

Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp  
 145 150 155 160

Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr  
 165 170 175

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe  
 180 185 190

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala  
 195 200 205

Page 38

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys  
 210 215 220  
 Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn  
 225 230 235 240  
 Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser  
 245 250 255  
 Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln  
 260 265 270  
 Ala Pro Lys  
 275

<210> 67  
 <211> 278  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический  
 полипептид  
 <400> 67  
 Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
 1 5 10 15  
 Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln  
 20 25 30  
 Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala  
 35 40 45  
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln  
 50 55 60  
 Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser  
 85 90 95  
 Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro  
 100 105 110  
 Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His  
 115 120 125  
 Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu  
 130 135 140

Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys  
145 150 155 160

Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn  
165 170 175

Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg  
180 185 190

Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn  
195 200 205

Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys  
210 215 220

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro  
225 230 235 240

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
245 250 255

Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
260 265 270

Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
275

<210> 68

<211> 278

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 68

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln  
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala  
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln  
50 55 60

Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu  
65 70 75 80

Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser  
85 90 95

Page 40

Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro  
 100 105 110  
 Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His  
 115 120 125  
 Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu  
 130 135 140  
 Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys  
 145 150 155 160  
 Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn  
 165 170 175  
 Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg  
 180 185 190  
 Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu  
 195 200 205  
 Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys  
 210 215 220  
 Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro  
 225 230 235 240  
 Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
 245 250 255  
 Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
 260 265 270  
 Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 275

<210> 69

<211> 278

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 69

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
 1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln  
 20 25 30



Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala  
 35 40 45  
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln  
 50 55 60  
 Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu  
 65 70 75 80  
 Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser  
 85 90 95  
 Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro  
 100 105 110  
 Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His  
 115 120 125  
 Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu  
 130 135 140  
 Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys  
 145 150 155 160  
 Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn  
 165 170 175  
 Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg  
 180 185 190  
 Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn  
 195 200 205  
 Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Lys  
 210 215 220  
 Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro  
 225 230 235 240  
 Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
 245 250 255  
 Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
 260 265 270  
 Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 275

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 54

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

Page 42

<220>  
 <223> описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид  
 <400> 70  
 Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro  
 1 5 10 15  
 Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
 20 25 30  
 Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
 35 40 45  
 Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 50

<210> 71  
 <211> 54  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид  
 <400> 71  
 Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro  
 1 5 10 15  
 Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
 20 25 30  
 Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
 35 40 45  
 Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 50

<210> 72  
 <211> 54  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид  
 <400> 72  
 Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro  
 1 5 10 15  
 Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
 20 25 30  
 Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
 35 40 45

Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
50

<210> 73  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 73  
Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro  
1 5 10 15

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
20 25 30

Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
35 40 45

Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr  
50 55 60

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe  
65 70 75 80

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala  
85 90 95

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
100 105

<210> 74  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 74  
Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro  
1 5 10 15

Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
20 25 30

Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
35 40 45

Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr  
50 55 60

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe  
65 70 75 80

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala  
85 90 95

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
100 105

<210> 75

<211> 108

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 75

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro  
1 5 10 15

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
20 25 30

Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
35 40 45

Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr  
50 55 60

Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe  
65 70 75 80

Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala  
85 90 95

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
100 105

<210> 76

<211> 112

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 76

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln  
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala  
 35 40 45  
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln  
 50 55 60  
 Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln  
 65 70 75 80  
 Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala  
 85 90 95  
 Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 100 105 110

<210> 77  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид  
 <400> 77  
 Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
 1 5 10 15  
 Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln  
 20 25 30  
 Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala  
 35 40 45  
 Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln  
 50 55 60  
 Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln  
 65 70 75 80  
 Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys  
 85 90 95  
 Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 100 105 110

<210> 78  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 78  
Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15  
Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln  
20 25 30  
Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala  
35 40 45  
Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln  
50 55 60  
Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln  
65 70 75 80  
Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala  
85 90 95  
Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
100 105 110

<210> 79  
<211> 270  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность  
<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический  
полипептид  
<400> 79  
Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro  
1 5 10 15  
Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
20 25 30  
Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
35 40 45  
Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr  
50 55 60  
Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe  
65 70 75 80  
Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala  
85 90 95  
Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu  
100 105 110

Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu  
 115 120 125  
 Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln  
 130 135 140  
 Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala  
 145 150 155 160  
 Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His  
 165 170 175  
 Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu  
 180 185 190  
 Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys  
 195 200 205  
 Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala  
 210 215 220  
 Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn  
 225 230 235 240  
 Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu  
 245 250 255  
 Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 260 265 270

<210> 80

<211> 270

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 80

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro  
 1 5 10 15  
 Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
 20 25 30  
 Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
 35 40 45  
 Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr  
 50 55 60  
 Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe  
 65 70 75 80

Page 48

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

<210> 81

<211> 270

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 81

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro  
 1 5 10 15

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
 20 25 30



Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
 35 40 45  
 Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr  
 50 55 60  
 Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe  
 65 70 75 80  
 Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala  
 85 90 95  
 Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu  
 100 105 110  
 Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu  
 115 120 125  
 Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln  
 130 135 140  
 Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala  
 145 150 155 160  
 Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His  
 165 170 175  
 Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu  
 180 185 190  
 Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys  
 195 200 205  
 Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala  
 210 215 220  
 Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn  
 225 230 235 240  
 Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu  
 245 250 255  
 Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 260 265 270

&lt;210&gt; 82

&lt;211&gt; 274

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

&lt;400&gt; 82

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

Page 51

Pro Lys

&lt;210&gt; 83

&lt;211&gt; 274

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

&lt;400&gt; 83

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln  
20 25 30Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala  
35 40 45Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln  
50 55 60Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln  
65 70 75 80Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys  
85 90 95Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
100 105 110Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro  
115 120 125Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
130 135 140Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
145 150 155 160Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr  
165 170 175Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe  
180 185 190Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala  
195 200 205

Page 52

Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu  
210 215 220

Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu  
225 230 235 240

Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val  
245 250 255

Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala  
260 265 270

Pro Lys

<210> 84

<211> 274

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 84

Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln  
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala  
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln  
50 55 60

Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln  
65 70 75 80

Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala  
85 90 95

Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
100 105 110

Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro  
115 120 125

Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp  
130 135 140

Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
145 150 155 160

Page 53

Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr  
 165 170 175  
 Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe  
 180 185 190  
 Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala  
 195 200 205  
 Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu  
 210 215 220  
 Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu  
 225 230 235 240  
 Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln  
 245 250 255  
 Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala  
 260 265 270

Pro Lys

<210> 85  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

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

Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala  
 100 105 110

Gln Ala Pro Lys  
 115

<210> 86  
 <211> 18  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид

<400> 86  
 catcaccatc atcaccac

18

<210> 87  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 87  
 Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
 1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln  
 20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala  
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Asp Asn Lys Phe Asn Lys  
 50 55 60

Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn  
 65 70 75 80

Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser  
 85 90 95

Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln  
 100 105 110

Ala Pro Lys  
 115

<210> 88  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

Page 55

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

&lt;400&gt; 88

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

Pro Lys

&lt;210&gt; 89

&lt;211&gt; 112

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

&lt;400&gt; 89

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln  
20 25 30Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala  
35 40 45Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln  
50 55 60Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln  
65 70 75 80Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala  
Page 56

85 90 95

Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
100 105 110

<210> 90  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 90  
 Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Asp Gln Gln Ser Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15

Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln  
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr Asn Val Leu Gly Glu Ala  
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Asp Gln Gln  
50 55 60

Ser Ala Phe Tyr Glu Ile Leu Asn Met Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln  
65 70 75 80

Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Thr  
85 90 95

Asn Val Leu Gly Glu Ala Lys Lys Leu Asn Glu Ser Gln Ala Pro Lys  
100 105 110

<210> 91  
 <211> 290  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 91  
 Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15

Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln  
20 25 30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala  
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Asn Lys Phe Asn  
Page 57



50                      55                      60  
 Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu  
 65                      70                      75                      80  
 Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro  
 85                      90                      95  
 Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala  
 100                      105                      110  
 Gln Ala Pro Lys Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala  
 115                      120                      125  
 Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn  
 130                      135                      140  
 Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu  
 145                      150                      155                      160  
 Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp  
 165                      170                      175  
 Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His  
 180                      185                      190  
 Leu Pro Asn Leu Asn Glu Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu  
 195                      200                      205  
 Lys Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys  
 210                      215                      220  
 Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu  
 225                      230                      235                      240  
 Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Asn Glu  
 245                      250                      255  
 Glu Gln Arg Asn Ala Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Gln  
 260                      265                      270  
 Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala  
 275                      280                      285  
 Pro Lys  
 290

<210> 92  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

&lt;400&gt; 92

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
1 5 10 15Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln  
20 25 30Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala  
35 40 45Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn  
50 55 60Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu  
65 70 75 80Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro  
85 90 95Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala  
100 105 110Gln Ala Pro Lys  
115

&lt;210&gt; 93

&lt;211&gt; 271

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Искусственная последовательность

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

&lt;400&gt; 93

Ala Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu  
1 5 10 15Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys  
20 25 30Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu  
35 40 45Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe  
50 55 60Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys  
65 70 75 80Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu  
Page 59

85 90 95

Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys  
100 105 110

Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr  
115 120 125

Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser  
130 135 140

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

Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu  
165 170 175

His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Lys Phe Ile Gln Ser  
180 185 190

Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys  
195 200 205

Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn  
210 215 220

Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg  
225 230 235 240

Asn Lys Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu  
245 250 255

Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
260 265 270

<210> 94  
<211> 271  
<212> PRT  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 94  
Ala Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu  
1 5 10 15

Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys  
20 25 30

Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu  
35 40 45

Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe  
 50 55 60  
 Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly  
 65 70 75 80  
 Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu  
 85 90 95  
 Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys  
 100 105 110  
 Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr  
 115 120 125  
 Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser  
 130 135 140  
 Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln  
 145 150 155 160  
 Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu  
 165 170 175  
 His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser  
 180 185 190  
 Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys  
 195 200 205  
 Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn  
 210 215 220  
 Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg  
 225 230 235 240  
 Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu  
 245 250 255  
 Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys  
 260 265 270

<210> 95

<211> 290

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 95

Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile

Page 61

Page 62

275                      280                      285

Pro Lys  
290

<210> 96  
 <211> 290  
 <212> PRT  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид

<400> 96  
 Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile  
 1                      5                      10                      15

Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln  
                     20                      25                      30

Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala  
                     35                      40                      45

Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn  
                     50                      55                      60

Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu  
 65                      70                      75                      80

Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro  
                     85                      90                      95

Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala  
                     100                      105                      110

Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala  
                     115                      120                      125

Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn  
                     130                      135                      140

Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile  
 145                      150                      155                      160

Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp  
                     165                      170                      175

Asn Lys Phe Asn Lys Glu Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His  
                     180                      185                      190

Leu Pro Asn Leu Thr Glu Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu  
                     195                      200                      205

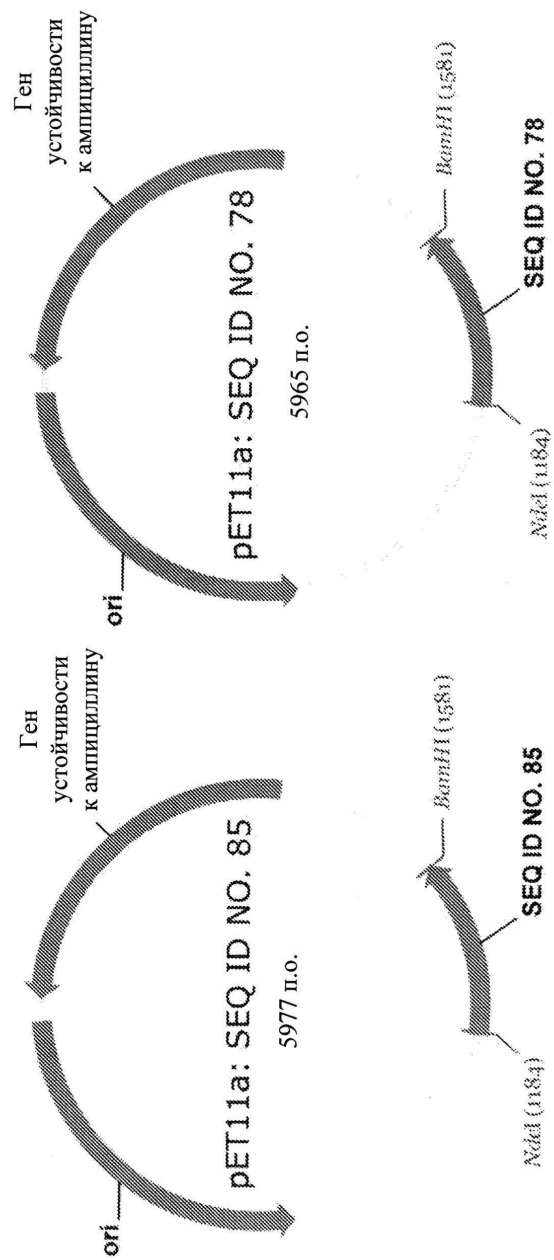
Lys Asp Asp Pro Ser Val Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys  
 210 215 220  
 Leu Asn Asp Ala Gln Ala Pro Lys Ala Asp Asn Lys Phe Asn Lys Glu  
 225 230 235 240  
 Gln Gln Asn Ala Phe Tyr Glu Ile Leu His Leu Pro Asn Leu Thr Glu  
 245 250 255  
 Glu Gln Arg Asn Gly Phe Ile Gln Ser Leu Lys Asp Asp Pro Ser Val  
 260 265 270  
 Ser Lys Glu Ile Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala Gln Ala  
 275 280 285  
 Pro Lys  
 290

1/9

E	-----AQQNAFYQVIMNPINLADQQRNGFTQSLKDDPSQSANVLGEAQKLNDSQAPK 51 (SEQ ID NO:1)
D	ADAQQNKFKQOSAFYEIIMNPINLNEEQQRNGFTQSLKDDPSQSTNVLGEAKKLNESQAPK 61 (SEQ ID NO:5)
A	---ADNN--FNKEQQNAFYEIIMNPINLNEEQQRNGFTQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNESQAPK 58 (SEQ ID NO:2)
B	---ADNKTNKEQQNAFYEIILHLPNINLNEEQQRNGFTQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDSQAPK 58 (SEQ ID NO:3)
C	---ADNKTNKEQQNAFYEIILHLPNLTDEQQRNGFTQSLKDDPSQSVSKNELLAEAKKLNDSQAPK 58 (SEQ ID NO:4)
Z	---VDNKTNKEQQNAFYEIILHLPNINLNEEQQRNGFTQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDSQAPK 58 (SEQ ID NO:6)

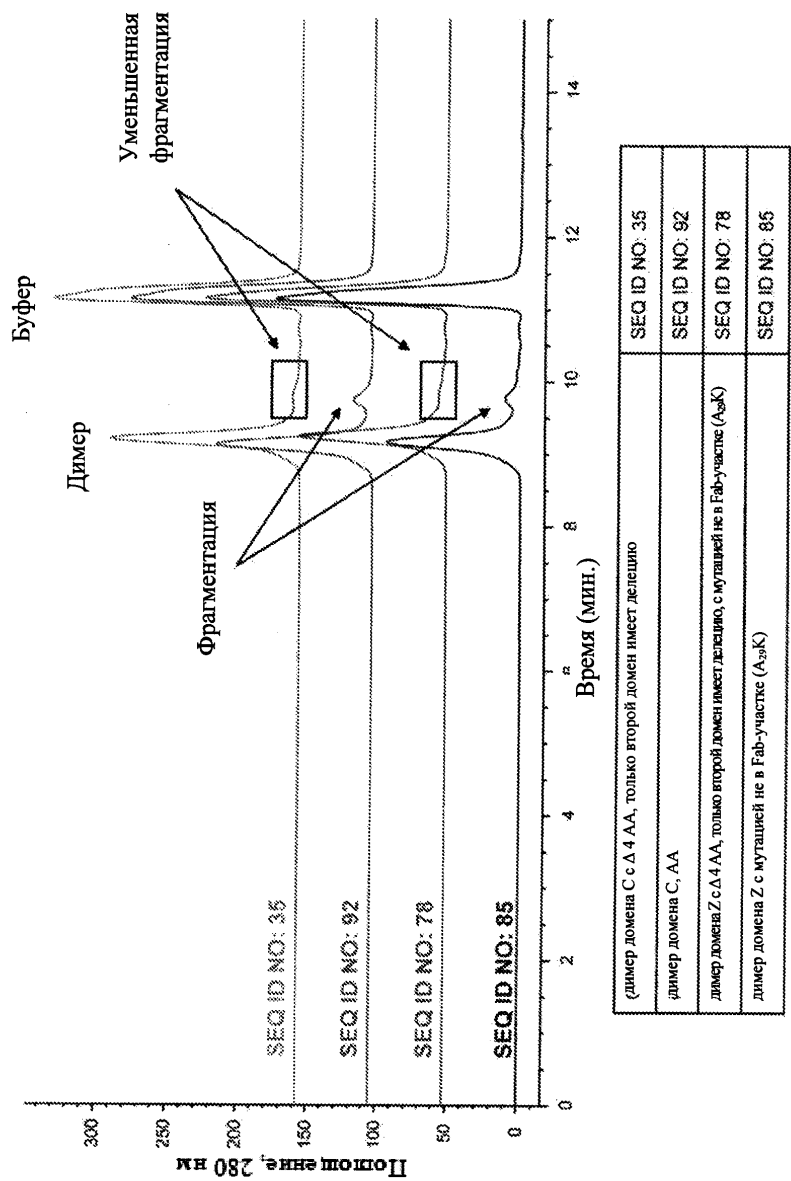
Фиг. 1. Выравнивание аминокислотной последовательности



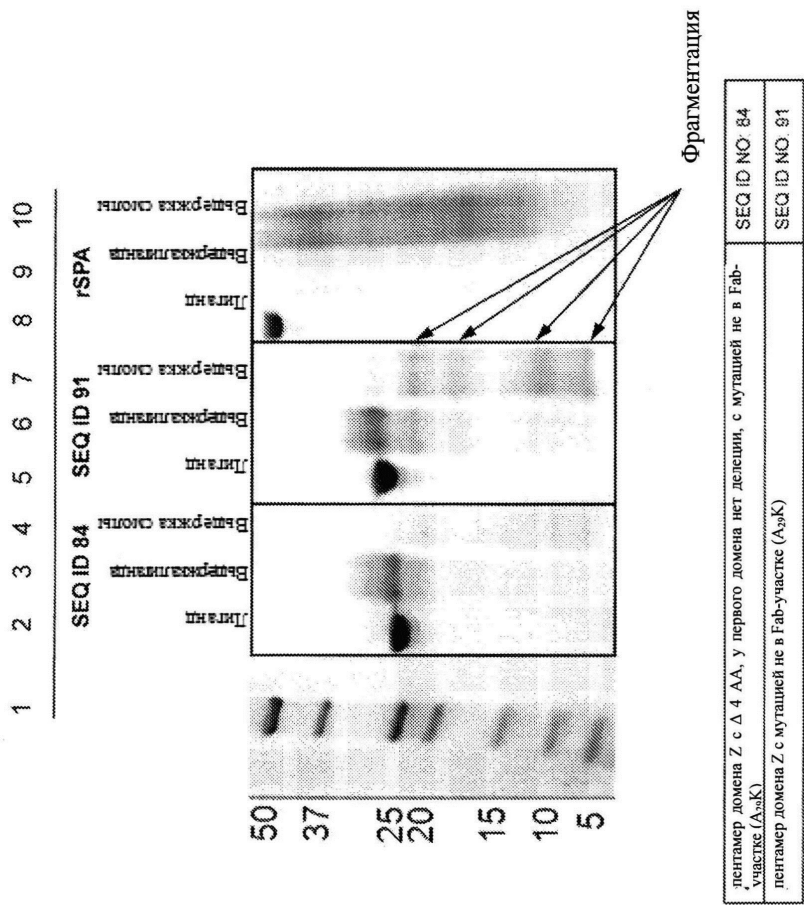


Фиг. 2. Плазмидная карта

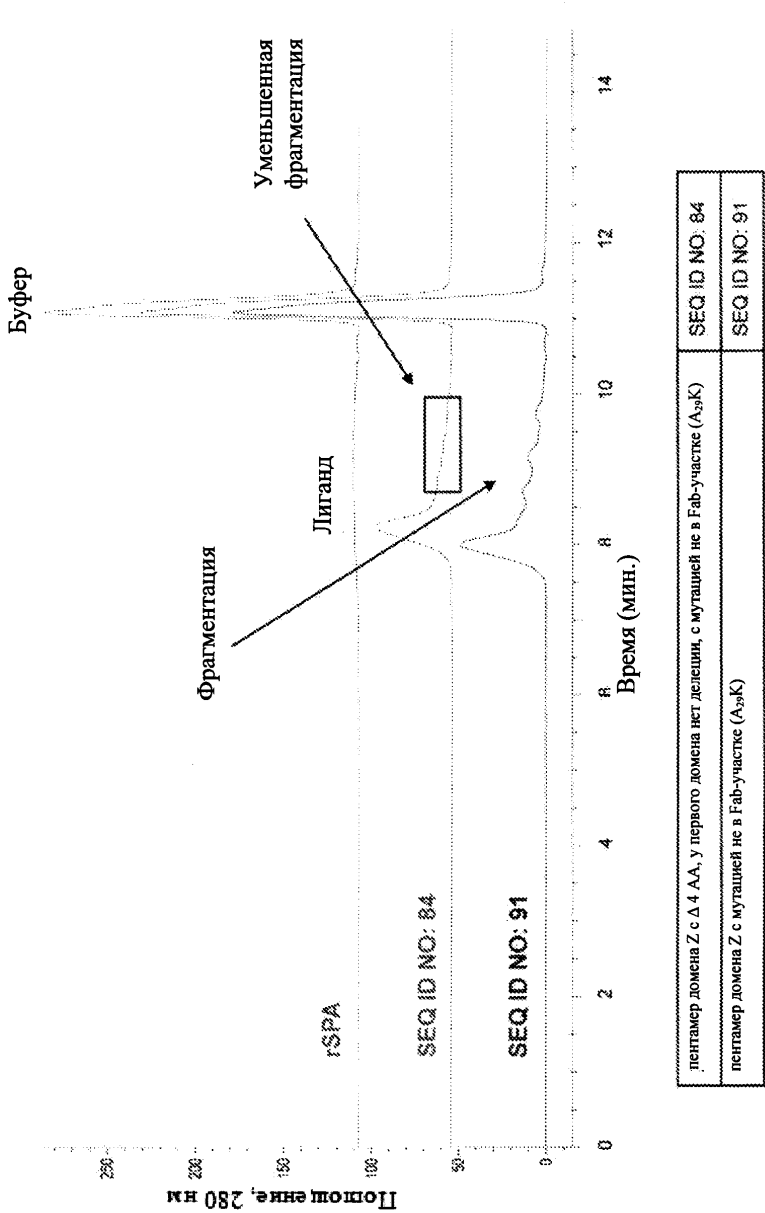




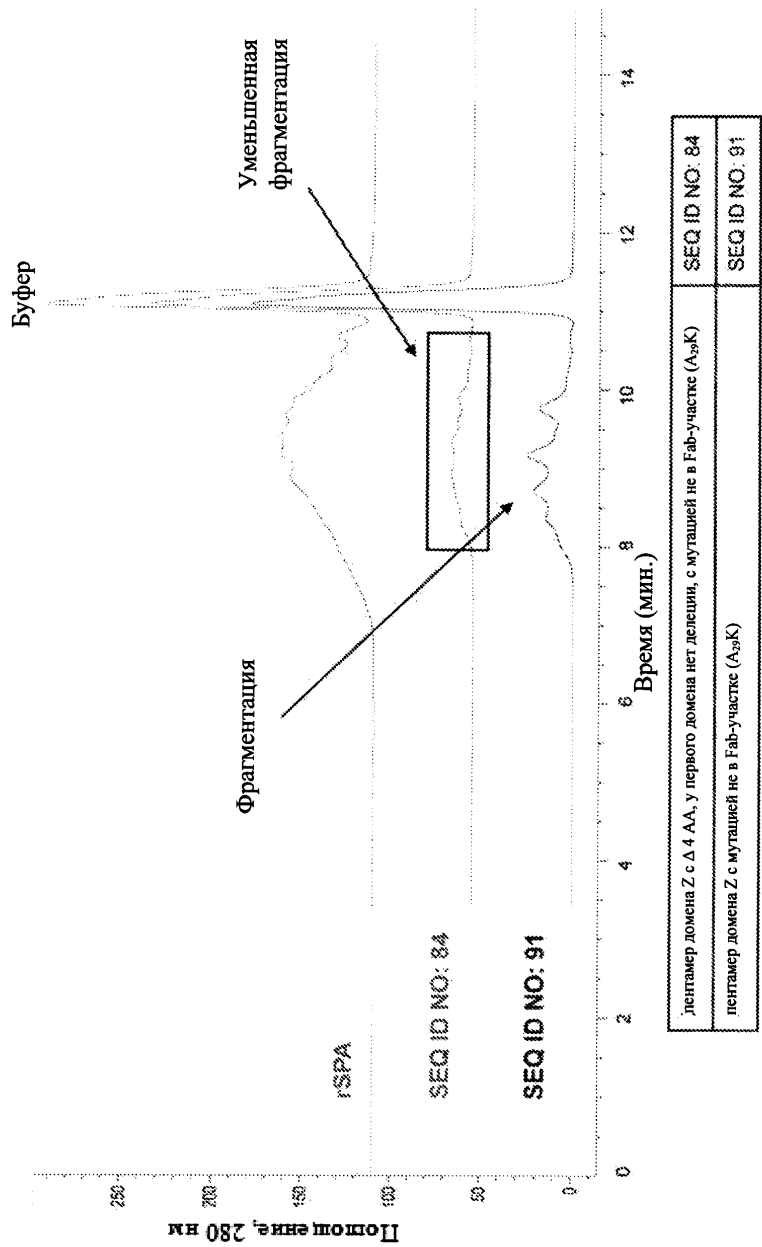
Фиг. 4. SEC – сравнение лигандов после продолжительной выдержки в щелочи



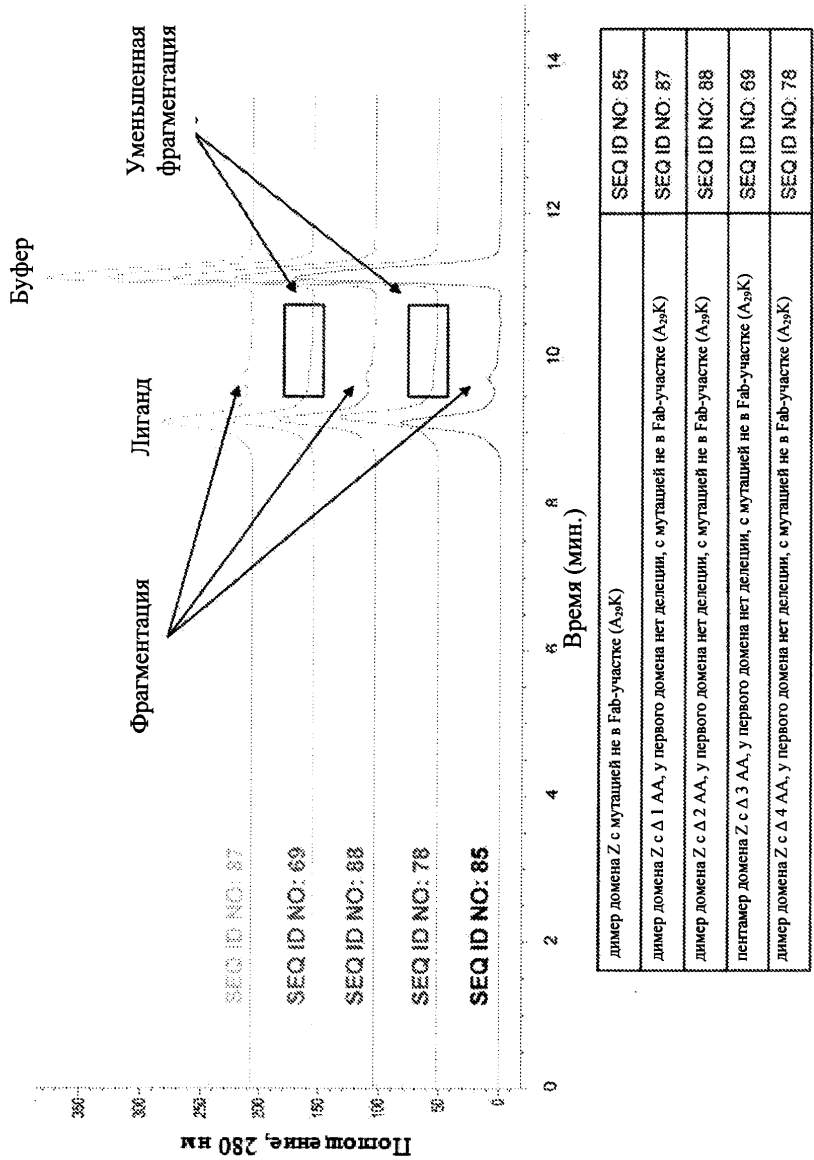
Фиг. 5. SDS - PAGE – сравнение лигандов (до и после продолжительной выдержки в щелочи) и имбилизированных лигандов (после продолжительной выдержки в щелочи



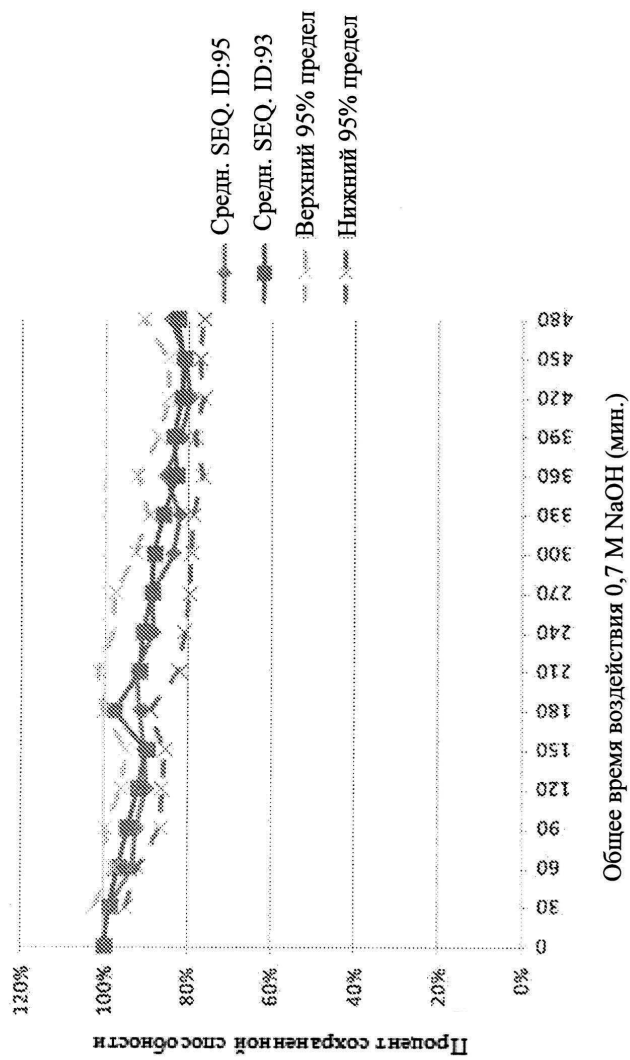
Фиг. 6. SEC – сравнение лигандов после продолжительной выдержки в щелочи



Фиг. 7. SEC – сравнение лигандов после продолжительной выдержки в щелочи



Фиг. 8. SEC – сравнение лигандов после продолжительной выдержки в щелочи



Фиг. 9.