(19) **RU** (11) **2 224 766** (13) **C2**

(51) МПК[7] **C 07 K 16/00, 16/30, A 61 K 39/395**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 99123926/13 , 14.04.1998

(24) Дата начала действия патента: 14.04.1998

(30) Приоритет: 14.04.1997 EP 97106109.8

(46) Дата публикации: 27.02.2004

(56) Ссылки: WO 9700271 A, 03.01.1997. WO 9311236 A, 10.06.1993. EP 0266663 B1, 11.05.1988. EP 0546634 A, 16.06.1993. EP 0521842 B1, 07.01.1993.

(85) Дата перевода заявки PCT на национальную фазу: 15.11.1999

(86) Заявка PCT:
EP 98/02180 (14.04.1998)

(87) Публикация PCT:
WO 98/46645 (22.10.1998)

(98) Адрес для переписки:
193036, Санкт-Петербург, а/я 24, "НЕВИНПАТ", пат.пов. А.В.Поликарпову, рег.№ 0009

(72) Изобретатель: КУФЕР Петер (DE), РАУМ Тобиас (DE)

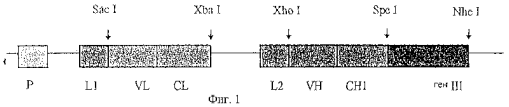
(73) Патентообладатель:
Микромет АГ (DE)

(74) Патентный поверенный:
Поликарпов Александр Викторович

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РЕЦЕПТОРОВ ДЛЯ ЧЕЛОВЕЧЕСКИХ АНТИГЕНОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(57)

Изобретение относится к области иммунобиотехнологии и может найти применение в медицине. Изобретение касается способа получения рецептора для человеческого антигена, который является низкоиммуногенным или неиммуногенным у людей, включающий в себя стадии, на которых отбирают комбинацию функционально перегруппированных VH и VL цепей иммуноглобулина, где по меньшей мере указанная VH цепь получена из по существу непримированных зрелых человеческих В-лимфоцитов или из по существу анергических человеческих В клеток, а указанная VL цепь получена из природной популяции человеческих В клеток, причем указанные цепи экспрессируются с рекомбинантного вектора и для отбора используют in vitro дисплей-систему для связывания с человеческим антигеном. Описаны также рецепторы, которые являются низкоиммуногенными или неиммуногенными у людей и направлены на человеческие антигены, причем указанные рецепторы можно получить с помощью способа по изобретению. Рецепторы предпочтительно представляют собой антитела или их фрагменты, либо иммуноконъюгаты, содержащие VH/VL цепи указанного антитела. В частности, описываются рецепторы, направленные на человеческие опухолевые антигены, предпочтительно на человеческий опухолевый антиген 17-1 A, также известный как EpCAM, EGP или GA 733-2. Создан набор, полезный для осуществления способа по изобретению, и фармацевтическая композиция, способная конъюгировать антигены в человеческом организме, содержащие вышеупомянутые рецепторы. 5 с. и 21 з.п. ф-лы, 55 ил., 3 табл.



Фиг. 1

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(19) **RU** (11) **2 224 766** (13) **C2**

(51) Int. Cl.[7] **C 07 K 16/00, 16/30, A 61 K 39/395**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 99123926/13 , 14 .04 .1998

(24) Effective date for property rights: 14 .04 .1998

(30) Priority: 14 .04 .1997 EP 97106109.8

(46) Date of publication: 27 .02 .2004

(85) Commencement of national phase: 15.11.1999

(86) PCT application:
EP 98/02180 (14.04.1998)

(87) PCT publication:
WO 98/46645 (22.10.1998)

(98) Mail address:
193036, Sankt-Peterburg, a/ja 24,
"NEVINPAT", pat.pov. A.V.Polikarpovu,
reg.№ 0009

(72) Inventor: KUFER Peter (DE),
RAUM Tobias (DE)

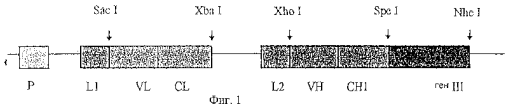
(73) Proprietor:
Mikromet AG (DE)

(74) Representative:
Polikarpov Aleksandr Viktorovich

(54) METHOD FOR PREPARING RECEPTORS FOR HUMAN ANTIGENS AND THEIR APPLICATION

(57) Abstract:

FIELD: immunobiotechnology, medicine. SUBSTANCE: invention relates to method for preparing receptors for human antigen that shows low- -immunity property or absence of immunogenicity in humans. Method involves stages wherein combination of functionally rearranged VH and VL chains of immunoglobulin is selected wherein at least indicated chain VH is prepared from essentially non-primed mature human B-lymphocytes or from essentially anergic human B-cells; indicated VL chain is obtained from natural population of human B-cells. Indicated chains are expressed from recombinant vector and display-system is used in vitro for selection and binding with human antigen. Invention describes also receptors that show low-immunity property or absence of immunogenicity in humans and directed for human antigens being indicated receptors can be obtained using method according to this invention. Receptors represent preferably antibodies or their fragments or immunoconjugates comprising VH/VL chains of indicated antibody. In particular, invention describes receptors directed for human tumor antigens but preferably for human tumor antigen 17-1 A known also as EpCAM, EGP or GA 733-2. Invention proposes the developed set useful for realization of method and pharmaceutical composition that is able to conjugate antigens in human body and comprising above indicated receptors. EFFECT: improved preparing, valuable medicinal properties of antigens. 26 cl, 51 dwg, 3 tbl, 5 ex



Фиг. 1

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

Текст описания в факсимильном виде (см. графическую часть)н

Формула изобретения:

1. Способ получения рецептора для человеческого антигена, который низкоиммуногенен или неиммуногенен у людей, включающий стадию отбора комбинации функционально перегруппированных VH и VL цепей иммуноглобулина, отличающийся тем, что по меньшей мере VH цепь получают из непримированных зрелых человеческих B-лимфоцитов, а VL цепь - из природного репертуара человеческих B клеток, причем указанные цепи экспрессируются с рекомбинантного вектора, используя для отбора дисплей-систему in vitro для связывания с человеческим антигеном.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что рецептор для человеческого антигена представляет собой иммуноглобулин или его фрагмент.

3. Способ по п.2, отличающийся тем, что фрагмент иммуноглобулина представляет собой Fv-фрагмент.

4. Способ по любому из пп.1-3, отличающийся тем, что человеческий антиген представляет собой человеческий опухолевый антиген.

5. Способ по любому из пп.1-4, отличающийся тем, что человеческий опухолевый антиген представляет собой человеческий 17-1A антиген.

6. Способ по любому из пп.1-5, отличающийся тем, что дисплей-система in vitro представляет собой фаговую дисплей-систему.

7. Способ по любому из пп.1-6, отличающийся тем, что VH и возможно VL цепи иммуноглобулина получают из репертуара человеческого IgD.

8. Способ по любому из пп.1-7, отличающийся тем, что указанная комбинация перегруппированных цепей экспрессируется с одной или более различных библиотек.

9. Способ по любому из пп.1-8, отличающийся тем, что VH цепь имеет одну из двух аминокислотных последовательностей, описанных в SEQ ID No 143 (аминокислотные положения со 108 по 234) и SEQ ID No 145 (аминокислотные положения со 139 по 251), и/или VI цепь имеет одну из двух аминокислотных последовательностей, описанных в SEQ ID No 141 (аминокислотные положения с 1 по 107) и SEQ ID No 147 (аминокислотные положения со 125 по 231).

10. Способ по любому из пп.1-9, отличающийся тем, что отбор включает (1) связывание дисплей-носителя, экспрессирующего рецептор антигена (а) на иммобилизованном антигене-мишени или его фрагментах, (б) на возможно меченых клетках, экспрессирующих антиген-мишень или его фрагменты, или (в) с растворимым, предпочтительно меченым антигеном-мишенью или его фрагментами, (2) отмывку неспецифически связывающегося дисплей-носителя (а и б) и последующую элюцию специфически связывающегося дисплей-носителя или (3) позитивное обогащение дисплей-носителя, связанного с антигеном-мишенью (б и в), из раствора антигена-мишени или из суспензий клеток, экспрессирующих антиген-мишень, выделенные дисплей-носители, включающие рецепторы антигена, при необходимости размножают репликацией и подвергают дальнейшему отбору in vitro соответствии со стадиями (1)-(3).

11. Способ по любому из пп.1-10, отличающийся тем, что перед стадией отбора VH или VL цепь отбирают по способности связывания с антигеном вместе с заместительной V цепью.

12. Способ по п.11, отличающийся тем, что заместительная V цепь представляет собой мышиную VH или VL цепь.

13. Способ по любому из пп.1-12, отличающийся тем, что отбор, подходящей комбинации VH и VL цепей осуществляют путем тестирования одной и той же VH или VL цепи в комбинации со множеством различных VL или VH цепей на способность связывания с человеческим антигеном.

14. Способ по любому из пп.1-13, отличающийся тем, что после отбора дополнительно получают человеческие VH или VL цепи или соответствующие кодирующие их нуклеиновые кислоты и сливают эти цепи с теми же или другими VH или VL цепями, либо с константными областями тяжелой (CH) или легкой (CL) цепей иммуноглобулина или с их участками, либо с неиммуноглобулиновыми цепями и соответствующими нуклеиновыми кислотами соответственно, и/или после отбора дополнительно получают человеческие VH и VL цепи и физически соединяют эти цепи с небелковыми фармацевтическими средствами и/или другими биологически активными молекулами.

15. Способ по п.14, отличающийся тем, что константные области CH и CL цепей получены из человеческого IgGI или IgGS.

16. Рецептор для человеческого антигена, который является низкоиммуногенным или неиммуногенным у людей, содержащий комбинацию функционально перегруппированных VH и VL цепей, где по меньшей мере указанная VH цепь получена из непримированных зрелых человеческих B-лимфоцитов, а указанная VL цепь получена из природного репертуара человеческих B клеток.

17. Рецептор для человеческого антигена по п.16, отличающийся тем, что он получен способом по любому из пп.1-15.

18. Рецептор для человеческого антигена по п.16 или 17, отличающийся тем, что этот рецептор представляет собой антитело или его фрагмент.

19. Рецептор для человеческого антигена по любому из пп.16-18, отличающийся тем, что этот рецептор является специфичным для человеческого опухолевого антигена.

20. Рецептор для человеческого антигена по любому из пп.16-19, отличающийся тем, что этот рецептор является специфичным для нативного человеческого 17-1A антигена.

21. Рецептор для человеческого антигена по п.20, отличающийся тем, что VH цепь имеет одну из двух аминокислотных последовательностей, описанных SEQ ID No 143 (аминокислотные положения со 108 по 234) и SEQ ID No 145 (аминокислотные положения со 139 по 251), и/или VL цепь имеет одну из двух аминокислотных последовательностей, описанных SEQ ID No 141 (аминокислотные положения с 1 по 107) и SEQ ID No 147 (аминокислотные положения со 125 по 231).

22. Набор для отбора рецептора для

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

человеческого антигена, содержащий комбинацию функционально перегруппированных VH и VL цепей иммуноглобулина, отличающийся тем, что по меньшей мере одна из VH и VL цепей получена из непримированных зрелых человеческих B-лимфоцитов, причем указанные цепи экспрессируются с рекомбинантных векторов in vitro дисплей-системы.

23. Рецептор для человеческого антигена, распознающий эпитоп внеклеточного домена нативного человеческого 17-1A антигена, отличающийся тем, что содержит человеческую VH цепь и человеческую VL цепь, которые были функционально перегруппированы.

24. Рецептор по п.23, отличающийся тем, что указанный эпитоп содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере одного из пептидов №8, 11, 13, 14, 59, 60, 77 и 79, как определено в таблице 3.

25. Рецептор по п.24, отличающийся тем, что VH цепь имеет одну из двух аминокислотных последовательностей, описанных в SEQ ID No 143 (аминокислотные положения со 108 по 234) и SEQ ID No 145 (аминокислотные положения со 139 по 251), и/или VL цепь имеет одну из двух аминокислотных последовательностей, описанных в SEQ ID No 141 (аминокислотные положения с 1 по 107) и SEQ ID No 147 (аминокислотные положения со 125 по 231).

26. Фармацевтическая композиция, способная конъюгировать антигены в человеческом организме, содержащая рецептор по любому из пп.16-21 и/или рецептор для человеческого антигена по любому из пп.23-25 и фармацевтически приемлемый носитель.

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

Настоящее изобретение относится к способу получения рецептора для человеческого антигена, который является низкоиммуногенным или неиммуногенным у людей, включающему в себя стадии, на которых отбирают комбинации функционально перегруппированных VH и VL цепей иммуноглобулина, причем по меньшей мере указанная VH цепь получена из по существу непримированных зрелых человеческих B-лимфоцитов или из по существу анергических человеческих B клеток, а указанная VL цепь получена из природного репертуара человеческих B клеток, причем указанные цепи экспрессируются с рекомбинантного вектора и используют дисплей-систему in vitro для связывания с человеческим антигеном.

Далее настоящее изобретение относится к рецепторам, которые являются низкоиммуногенными или неиммуногенными у людей и направлены на человеческие антигены, причем указанные рецепторы получаются с помощью способа по изобретению. Указанные рецепторы предпочтительно представляют собой антитела или их фрагменты, либо иммуноконъюгаты, содержащие VH/VL цепи указанного антитела. В частности, рецепторы по изобретению направлены на человеческие опухолевые антигены, предпочтительно на человеческий опухолевый антиген 17-1A, также известный как EpCAM, EGP или GA 733-2. Наконец, настоящее изобретение относится к наборам, полезным для осуществления способа по изобретению.

Иммунные системы млекопитающих, как например иммунная система человека, производят отбор против иммунокомпетентных клеток и молекул, которые являются специфичными для собственных антигенов. В этом отношении нарушение регуляции иммунной системы может приводить к аутоиммунным заболеваниям, таким как ревматоидный артрит. Как правило, надзор иммунной системы в отношении аутореактивных антител или T-клеток является, таким образом, в высшей степени благотворным. Однако, могут быть случаи, где было бы благоприятным иметь аутореактивные антитела, которые направлены на антигены, экспрессируемые у млекопитающего, и в частности, в организме человека. Такие антигены представляют собой, например, антигены,

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

ассоциированные с опухолью. Например, показано, что человеческий антиген 17-1A или EpCAM, поверхностный гликопротеин, экспрессируемый клетками однослойного эпителия и происходящих от него злокачественных опухолей, является полезной мишенью для терапии рака моноклональными антителами, особенно у пациентов с минимальными остаточными явлениями заболевания, страдающих от рассеянных опухолевых клеток, которые могут вызвать последующий твердый метастаз, ухудшая, таким образом, прогноз у пациента. У пациентов с минимальным остаточным колоректальным раком мышиное моноклональное антитело, специфичное для человеческого антигена 17-1A, снижало 5-летний коэффициент смертности на 30%, по сравнению с пациентами без лечения, при системном применении в пяти дозах в течение четырех месяцев после операции первичной опухоли; в целом каждого пациента лечили 900 мг антитела (Riethmüller, Lancet 343 (1994), 1177-1183). Однако, в течение курса лечения антителом у пациентов развивался сильный гуморальный иммунный ответ против мышиного иммуноглобулина. Эти человеческие антимышиные антитела (HAMA) серьезно ограничивают продолжительное применение терапий антителом и прогрессивно снижают их эффективность. Более того, ранее образованные HAMA, индуцированные предшествующим лечением антителом или другим контактом с мышиным иммуноглобулином, могут серьезно препятствовать последующим терапиям антителом.

Чтобы предотвратить возникновение этих проблем, были бы предпочтительны терапевтические антитела с минимальной иммуногенностью. Для достижения этой цели можно было бы, например, предусмотреть, чтобы терапевтические антитела или производные антител полностью являлись человеческими по своей аминокислотной последовательности, и иммуногенный профиль идиотипа человеческого антитела минимизировался бы использованием человеческих Ig-вариабельных областей, по отношению к которым иммунная система человека, вероятно, является толерантной.

Однако, получение человеческих антител против человеческих антигенов сталкивается с двумя главными проблемами:

(1) Гибридомная или другие методики получения иммортализированных клеток оказались совершенно неэффективными при создании клеточных линий,

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

продуцирующих человеческие антитела, по сравнению с мышиной гибридомной технологией.

(2) Аутореактивные антитела относительно эффективно истощены в природном репертуары антител благодаря механизмам, опосредующим аутотолерантность.

Человеческие антитела стали в целом более доступны в связи с тем, что имеются в распоряжении трансгенные мыши, экспрессирующие человеческие антитела (Brüggemann, Immunol. Today 17 (1996), 391-397), а также комбинаторная библиотека антител и технология фагового дисплея, дающая возможность соединять вариабельные области тяжелых и легких цепей (VH и VL) Ig in vitro и отбирать их in vitro по антиген-связывающей специфичности (Winter, Annu. Rev. Immunol. 12 (1994), 433-455). С помощью использования способа фагового дисплея можно легко выделить редкие события, такие как одна специфически связывающая форма из 10^7-10^9 различных пар VL/VH или VH/VL; это особенно верно, когда репертуар вариабельных областей был обогащен специфически связывающими формами посредством использования в качестве источника для клонирования репертуара В-лимфоцитов из иммунизированных хозяев.

Однако, часто в природных репертуарах антител частота отдельных связывающих форм является по существу сниженной. В частности, это верно для случаев антител, связывающихся с собственными антигенами. Чаще всего случайные комбинации VL- и VH-областей из аутотолерантного хозяина, из которых получают комбинаторную библиотеку антител общепринятого размера (от 10^7 до 10^9 независимых клонов), являются недостаточными для успешного отбора аутореактивных антител in vitro с помощью способа фагового дисплея.

Для того, чтобы обойти эту проблему, одной из стратегий является использование очень больших комбинаторных библиотек антител, где низкая частота аутореактивных антител в природных репертуарах компенсируется размером библиотеки. Однако, комбинаторные библиотеки антител, превышающие размер, составляющий 10^9 независимых клонов, сложно получить в связи с существующим в настоящее время техническим пределом эффективности трансформации плазмидной ДНК в клетки E.coli.

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

Чтобы избежать опосредованного аутотолерантностью смещения встречающихся в природе репертуаров антител, которое снижает репрезентативность аутореактивных антител и значительно уменьшает шансы выделения антител, специфически распознающих собственные антигены, разработаны подходы, использующие полусинтетические или полностью синтетические репертуары VH- и/или VL цепей. Например, почти полный репертуар неперегруппированных сегментов человеческого V-гена клонировали из геномной ДНК и использовали для рекомбинации in vitro функциональных генов вариабельных областей, напоминающей V-J- или V-D-J-рекомбинацию in vivo (Hoogenboom, J. Mol. Biol. 227 (1992), 381-388; Nissim, EMBO J. 13 (1994) 692-698; Griffiths, EMBO J. 13 (1994), 3245-3260). Обычно при полусинтетических и полностью синтетических подходах разнообразие V-D-/D-J-соединения и D-сегмента, главным образом ответственное за необычную длину и вариабельность последовательности CDR3 тяжелой цепи, так же как разнообразие V-J-соединения, вносящее вклад в вариабельность последовательности CDR3 легкой цепи, имитируют с помощью рандомизированных последовательностей, используя вырожденные олигонуклеотиды (Hoogenboom (1994), см. выше; Nissim, см. выше; Griffiths, см. выше; Barbas, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89 (1992), 4457-4461).

Однако, при отборе VL/VH- или VH/VL-пар на связывание с человеческим антигеном из таких полусинтетических или полностью синтетических репертуаров, основанных на последовательностях человеческого V-гена, существует риск образования иммуногенных эпитопов, которые могут индуцировать нежелательный иммунный ответ у людей (Hoogenboom, TIBTECH 15 (1997), 62-70); особенно CDR3-районы, полученные из репертуаров полностью рандомизированных последовательностей, склонны к образованию потенциально иммуногенных эпитопов, поскольку они никогда не подвергались человеческому иммунному надзору, не будучи распознанными в качестве чужеродного антигена, что приводит к их последовательной элиминации. Это в равной степени верно для человеческих антител из трансгенных мышей, экспрессирующих человеческие антитела, поскольку их молекулы иммуноглобулина отобраны по толерантности мышиной, но не человеческой иммунной системы.

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

Соответственно, технической задачей, лежащей в основе настоящего изобретения, являлась разработка способа, дающего возможность получения рецепторов, которые являются низкоиммуногенными или неиммуногенными у людей и которые можно использовать для конъюгирования с антигенами в человеческом организме. Решение указанной технической проблемы достигается путем разработки воплощений, охарактеризованных в формуле изобретения.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способу получения рецептора для человеческого антигена, который является низкоиммуногенным или неиммуногенным у людей, включающему в себя стадии, на которых отбирают комбинацию функционально перегруппированных VH и VL цепей иммуноглобулина, где по меньшей мере указанная VH цепь получена из по существу непримированных зрелых человеческих В-лимфоцитов или из по существу анергических человеческих В клеток, а указанная VL цепь получена из природного репертуара В клеток, причем указанные цепи экспрессируются с рекомбинантного вектора и используют дисплей-систему in vitro для связывания с человеческим антигеном.

Способ по настоящему изобретению является в высшей степени благоприятным для создания рецепторов, которые можно использовать для конъюгирования с антигенами у людей, причем сами по себе они не являются иммуногенными вовсе или в какой-либо значимой степени. Такие рецепторы можно успешно использовать для лечения множества заболеваний, таких как опухоли или аутоиммунные заболевания, отторжение трансплантата после трансплантации, инфекционные заболевания посредством конъюгирования с клеточными рецепторами, а также аллергические, воспалительные, эндокринные и дегенеративные заболевания посредством конъюгирования с ключевыми молекулами, вовлеченными в патологический процесс.

VH/VL цепи иммуноглобулина рецепторов по настоящему изобретению можно, несомненно, исследовать далее в отношении их нуклеиново-кислотных и аминокислотных последовательностей, используя методики, хорошо известные специалистам (см. например Sambrook (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY (1989)). Как только нуклеиново-кислотная последовательность или

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

аминокислотная последовательность определена, рецепторы по изобретению можно также получить с помощью других способов, например с помощью синтетических или полусинтетических способов, дающих синтетические или полусинтетические рецепторы, либо в трансгенных мышах, экспрессирующих человеческие иммуноглобулиновые рецепторы, рецепторы, несущие описанные выше свойства и полученные с помощью таких синтетических или полусинтетических способов или в указанных трансгенных мышах, также включены в объем настоящего изобретения.

После связывания рецептора с человеческим антигеном этот рецептор можно подвергнуть дальнейшей очистке. Например, несвязанные рецепторы, которые не несут антигенной специфичности, можно удалить с помощью стадий отмывки. Связанный рецептор можно элюировать с человеческого антигена и подвергнуть дальнейшей очистке, причем дополнительные раунды экспрессии, связывания и отбора желаемого рецептора можно использовать до тех пор, пока желаемый рецептор и/или соответствующий рекомбинантный вектор не будут выделены в очищенной форме.

В способе по настоящему изобретению, таким образом, используется предварительный отбор Ig-вариабельных областей человеческой иммунной системой. Эти рецепторы получают из репертуара, отобранного in vitro из комбинаторных библиотек человеческих антител, созданных исключительно или предпочтительно из природного репертуара антител, экспрессируемого по существу непримированными зрелыми человеческими В-лимфоцитами, либо из по существу анергических человеческих В-клеток.

Однако, эти вариабельные домены Ig можно также получить из множества других источников, которые представляют эти предварительно отобранные популяции В клеток.

Научное обоснование в отношении происхождения В клеток, функционирующих в качестве источника указанных VH или VL цепей, можно объяснить следующим образом:

Зрелые непримированные В-лимфоциты, экспрессирующие IgD или IgM в качестве мембранных рецепторов антигена, во время их направленной миграции во вторичные лимфоидные органы или между ними входят в первичные фолликулы, если они не сталкиваются с мультивалентным

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

собственным антигеном, что приводит к клональной делеции, либо с растворимым моновалентным собственным антигеном, что делает их анергическими и короткоживущими вследствие исключения из первичных фолликулов.

Контакт незрелых В-клеток, которые исключительно экспрессируют IgM, с собственным антигеном в костном мозге приводит либо к клональной делеции, либо к анергии в зависимости от валентности антигена. Анергические В-клетки, хотя они экспрессируют поверхностный IgD, не способны реагировать на антиген посредством данного рецептора; без доступа к первичным фолликулам и в отсутствие помощи Т-клеток эти клетки обладают коротким периодом полужизни всего в несколько дней.

Напротив, зрелые непримированные В-лимфоциты, которые не сталкивались с собственным антигеном и, следовательно, имеют доступ к первичным фолликулам, обладают длительным периодом полужизни в несколько недель. Несмотря на описанные механизмы, опосредующие аутотолерантность, эти популяции долгоживущих зрелых непримированных В-лимфоцитов все же содержат потенциально аутореактивные В-клетки, для которых, однако, маловероятно найти помощь специфических Т-клеток вследствие толерантности Т-клеток, и, следовательно, они воздерживаются от пролиферации и секреции антител. Оказывается, что отсутствие реактивности В-клеток на многие собственные антигены, которые присутствуют на низких уровнях, относится к этому типу, воздействуя на хелперные Т-клетки, но не воздействуя на В-клетки. По настоящему изобретению эти долгоживущие, нереактивные, потенциально аутореактивные зрелые непримированные В-лимфоциты были идентифицированы как наиболее многообещающий природный репертуар человеческих антител для конструирования комбинаторных библиотек антител, особенно подходящих для отбора человеческих антител к человеческим антигенам, например, с помощью способа фагового дисплея.

Ожидается, что этот высокоселективный репертуар антител, используемый в качестве основы настоящего изобретения, полученный главным образом из В-клеток с длительным периодом полужизни in vivo и, таким образом, подвергнутый воздействию человеческой иммунной системы в

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

течение продолжительных периодов времени, значительно обеднен молекулами антител, образующими эпитопы, в особенности в пределах высоко вариабельных CDR3-областей, которые являются иммуногенными для человеческой иммунной системы. Следовательно, ожидается, что человеческие антитела, отобранные из этого репертуара антител, обладают более низким иммуногенным профилем у людей, чем человеческие антитела, отобранные из полусинтетических или полностью синтетических библиотек человеческих антител.

Зрелые непримированные В-клетки, которые активируются контактом с чужеродным антигеном, прекращают экспрессировать IgD и начинают клональную пролиферацию и дифференциацию в плазматические клетки, секретирующие растворимый иммуноглобулин; на ранних стадиях реакции антител доминируют IgM-антитела, тогда как позже преобладающими изотипами являются IgG и IgA, причем IgE вносит небольшой, но биологически важный вклад в реакцию антител.

В отличие от IgD-негативных зрелых антиген-примированных В-лимфоцитов, экспрессирующих IgM, IgG, IgA или IgE, IgD-позитивные зрелые непримированные В-клетки еще не претерпели клональную пролиферацию, поэтому в комбинаторных IgD-библиотеках антигенные специфичности, которые в настоящий момент или ранее были вовлечены в иммунные ответы, обычно направляемые чужеродным антигеном, не являются сверхпредставленными, что, таким образом, уменьшает разнообразие репертуара и потери из объема библиотеки антител-кандидатов, которые маловероятно связывают собственный антиген. Это явно противоречит данным предшествующих специалистов, рекомендующих использование комбинаторных библиотек человеческих антител IgM для отбора in vitro человеческих антител против человеческих антигенов из природных репертуаров человеческих антител (Hoogenboom (1997), см. выше).

В предпочтительном воплощении способа по изобретению указанный рецептор антигена представляет собой иммуноглобулин или его фрагмент.

Этот фрагмент иммуноглобулина может представлять собой любой фрагмент, который общеизвестен специалистам как Fab или $F(ab)_2$ фрагмент.

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

В особенно предпочтительном воплощении способа по изобретению указанный фрагмент иммуноглобулина представляет собой Fv-фрагмент.

В следующем предпочтительном воплощении способа по изобретению по меньшей мере указанная VH и, возможно, указанная VL цепь иммуноглобулина получены из репертуара человеческого IgD.

Сделан вывод, что данный рецептор и предпочтительно репертуар антител, отобранный на низкую иммуногенность, лучше всего представлен в библиотеке человеческих IgD-антител. IgD экспрессируется как мембранный рецептор антигена вместе с поверхностным IgM на зрелых непримированных B-лимфоцитах, которые во время их направленной миграции к вторичным лимфоидным органам или между ними входят в первичные фолликулы, если они не столкнулись с мультивалентным собственным антигеном, что приводит к клональной делеции, или с растворимым моновалентным собственным антигеном, что делает их анергическими и короткоживущими вследствие исключения из первичных фолликулов. Кроме репертуара антител зрелых непримированных B-лимфоцитов, в библиотеках человеческих IgD представлены только те короткоживущие B-клетки, которые стали анергическими при контакте с растворимым моновалентным собственным антигеном, но маловероятно, что они вносят вклад в специфически связывающие формы с поверхностными молекулами клеток человека, напоминающими мультивалентные собственные антигены, которые индуцируют клональную делецию вместо анергии B-клеток.

В следующем предпочтительном воплощении способа по изобретению указанная in vitro дисплей-система представляет собой фаговую дисплей-систему.

Фаговую дисплей-систему ранее с удобством использовали для отбора ряда пептидов и белков, которые связываются со специфическими мишенями. На основе этих знаний VH и VL цепи иммуноглобулина можно удобно клонировать в векторы, которые также содержат молекулы, полезные для фаговых дисплей-систем. Такие молекулы и векторы, соответственно, хорошо известны специалистам (Winter, см. выше; Barbas, METHODS: A Companion to Methods in Enzymology 2 (1991), 119-124), и нет необходимости более детально описывать их здесь.

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

В следующем предпочтительном воплощении способа по изобретению указанная комбинация перегруппированных цепей экспрессируется с одной или более чем одной из различных библиотек.

Данное воплощение является особенно предпочтительным, если известно, что VH или VL цепи связываются со специфической мишенью, а соответствующая вторая V цепь отобрана таким образом, что восстанавливает или улучшает связывание

В следующем предпочтительном воплощении способа по изобретению указанный человеческий антиген представляет собой опухолевый антиген.

Если человеческий антиген представляет собой опухолевый антиген, указанный антиген предпочтительно экспрессируется на поверхности указанной опухоли. В этом случае благоприятно соединять VH и VL цепи с токсином. Это соединение можно осуществлять на уровне нуклеиновой кислоты с помощью генетической инженерии или на уровне белка с помощью, например, химического соединения.

Особенно предпочтительно, чтобы указанный опухолевый антиген представлял собой 17-1A антиген.

В следующем особенно предпочтительном воплощении способа по изобретению указанная VH цепь содержит одну или две последовательности, показанные на Фиг. 7 (нуклеотиды с 1 по 381) и Фиг. 8 (нуклеотиды с 1 по 339) и/или указанная VL цепь содержит одну или две следующие последовательности, показанные на Фиг. 6 (нуклеотиды с 1 по 321) и Фиг. 9 (нуклеотиды с 1 по 321). Рецепторы с этими специфическими VH и VL областями, где указанную VL область можно комбинировать с обеими VH областями, представляют собой первые человеческие антитела, которые являются специфичными для человеческого 17-1A антигена.

В следующем предпочтительном воплощении способа по изобретению указанная стадия отбора включает в себя

(i) связывание дисплей-носителя, экспрессирующего рецептор антигена

(а) на иммобилизованном антигене-мишени или его фрагментах;

(б) на возможно меченых клетках, экспрессирующих антиген-мишень или его фрагменты; или

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(в) с растворимым, предпочтительно меченым антигеном-мишенью или его фрагментами;

(ii) отмывку неспецифически связывающегося дисплей-носителя (а и б) и последующую элюцию специфически связывающегося дисплей-носителя с помощью неспецифических (например буфер с низким pH) или специфических средств (например антитело, специфичное к антигену-мишени) или

(iii) позитивное обогащение дисплей-носителя, связанного с антигеном-мишенью (б и в), из раствора антигена-мишени или из суспензий клеток, экспрессирующих антиген-мишень, например, с использованием магнитных шариков, связывающихся с меченым антигеном-мишенью или мечеными клетками, экспрессирующими антиген-мишень, соответственно; выделенные таким образом дисплей-носители, включающие в себя их рецепторы антигена, возможно размножают с помощью репликации и подвергают дальнейшим раундам отбора in vitro, как описано.

В следующем предпочтительном воплощении способа по изобретению перед указанной стадией отбора либо указанную VH цепь, либо указанную VL цепь отбирают на связывание с указанным антигеном вместе с заместительной V цепью.

Данную двухступенчатую процедуру можно применять, используя специфичное к антигену-мишени антитело-матрицу из другого вида, например мышиное моноклональное антитело против человеческого антигена-мишени. Сначала человеческий VL- или VH-репертуар объединяют с отдельной заместительной VH- или VL- цепью из мышиного антитела-матрицы, отображаемого, например, на нитевидном фаге и отобранного in vitro на связывание антигена. Таким образом, полный размер библиотеки является исключительно доступным для человеческого VL- или VH-репертуара, и можно выделить человеческие VL- или VH-цепи-кандидаты, которые способны участвовать в специфическом связывании человеческого антигена-мишени. На второй стадии заместительную вариабельную область антитела-матрицы заменяют на соответствующий репертуар человеческих вариабельных областей с последующим вторым раундом отбора in vitro; снова полный размер библиотеки является исключительно доступным для репертуара отдельных VH- и VL-областей, следовательно, намного больше VH- и VL-областей -

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

кандидатов для скрининга на связывание антигена в условиях ограниченного размера библиотеки обеспечивается двухступенчатой процедурой, чем одноступенчатой процедурой.

Для клонирования последовательностей ДНК, кодирующих вариабельные области человеческих антител, которые специфически связываются с человеческим 17-1A антигеном, применение данной двухступенчатой процедуры отбора для скрининга человеческих IgD-комбинаторных библиотек антител с помощью способа фагового дисплея являлось благоприятным. Сначала сегмент Fd-тяжелой цепи (VH+CH1) мышиного моноклонального антитела M79 (Göttlinger, Int. J. Cancer 38 (1986), 47-53), которое специфически связывается с человеческим 17-1A антигеном, объединяли с человеческим репертуаром легких цепей каппа- или лямбда-соответственно. Полученные библиотеки проявляли на нитевидном фаге и отбирали in vitro с помощью нескольких раундов пэннинга на иммобилизованном рекомбинантном человеческом 17-1A антигене. Растворимые Fab-фрагменты экспрессировали с нескольких клонов после каждого раунда пэннинга и подвергали скринингу на связывание антигена с помощью ELISA (иммуноферментного твердофазного анализа). Оказалось, что каждая из сильно связывающихся форм, обогащенных в процессе процедуры пэннинга, содержит одну и ту же человеческую легкую цепь каппа, что подтвердилось анализом последовательности. Эту человеческую легкую цепь, в дальнейшем называемую K8, затем объединяли с человеческой библиотекой IgD-тяжелых цепей, которую снова проявляли на нитевидном фаге и отбирали in vitro с помощью нескольких раундов пэннинга на иммобилизованном рекомбинантном человеческом 17-1A антигене. Несколько Fab-фрагментов экспрессировали с нескольких клонов после каждого раунда пэннинга и снова подвергали скринингу на связывание антигена с помощью ELISA. Анализ последовательности связывающих форм, обогащенных в процессе процедуры пэннинга, выявил две различные вариабельные области тяжелой цепи, названные D4.5 и D7.2, каждая из которых объединяется с K8-легкой цепью с образованием различных сайтов связывания человеческого антигена со специфичностью для человеческого 17-1A антигена. Человеческие репертуары легких и тяжелых цепей клонировали из нескольких препаратов тотальной

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

РНК, выделенной из образцов крови и костного мозга человека от нескольких доноров с помощью использования ОТ-ПЦР, специфичной как для легкой цепи каппа или лямбда, так и для IgD-тяжелой цепи. Поскольку невозможно избирательно амплифицировать репертуар легких цепей, которые объединены с IgD-тяжелыми цепями in vivo, если только IgD-позитивные В-клетки не очищены для получения препаратов РНК, то используемые библиотеки легких цепей не ограничены репертуаром антител зрелых непримированных или анергических В-лимфоцитов. Однако, в связи с преобладанием тяжелой цепи в распознавании антигена это, по существу, не подрывает преимуществ IgD-репертуара для отбора человеческих антител к собственным антигенам. Кроме того, что наиболее важно, в связи с воздействием на иммунную систему человека, отбор таких легких цепей гарантирует низкий иммуногенный профиль у людей.

В еще одном особенно предпочтительном воплощении способа по изобретению указанная заместительная цепь представляет собой мышиную VH или VL цепь.

В следующем особенно предпочтительном воплощении способа по изобретению указанный отбор подходящей комбинации включает в себя

(а) тестирование одной и той же VH цепи в комбинации с множеством различных VL цепей на связывание с указанным человеческим антигеном; или

(б) тестирование одной и той же VL цепи в комбинации с множеством различных VH цепей на связывание с указанным человеческим антигеном.

Данное воплощение, опять же, целесообразно применять, если известно, что либо VL, либо VH цепи специфически взаимодействуют с молекулой-мишенью человека. Затем подходящую вторую цепь можно отобрать предпочтительно на основании улучшенного связывания с этой молекулой-мишенью.

В следующем особенно предпочтительном воплощении способа по изобретению указанный способ включает в себя стадии, на которых получают, после отбора, человеческие VH и VL цепи или соответствующие нуклеиновые кислоты и осуществляют слияние указанных цепей с теми же самыми или другими VH или VL цепями, с константными областями тяжелых (CH) или легких (CL) цепей иммуноглобулинов или их участками, либо с другими

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

биологически активными молекулами, такими как пептиды, белки, нуклеиновые кислоты, малые органические соединения, гормоны, нейромедиаторы, пептидомиметики, ФГА (Milner, Nature Medicine 1 (1995), 879-880; Hupp, Cell 83 (1995), 237-245; Gibbs and Oliff, Cell 79 (1994), 193-198) Другая функциональная молекула может быть либо физически присоединена, например, химическими средствами, к VH и VL цепям, либо может быть слита с помощью методик рекомбинантных ДНК, хорошо известных специалистам.

Данное воплощение изобретения является особенно полезным для разработки специфических лекарств, которые можно применять для нацеливания на желаемые антигены в человеческом организме. Например, если мишенью являются опухолевые антигены, VH и VL цепи могут быть слиты на уровне нуклеиновой кислоты или на аминокислотном уровне с группировкой токсина, в результате чего образуется иммунотоксин, с внеклеточной частью клеточного рецептора или растворимого цитокина, либо с их участками соответственно, в результате чего получаются конструкции, усиливающие противоопухолевый иммунный ответ, или с Fv-фрагментом антитела, в результате чего получается биспецифичное производное антитела.

В следующем особенно предпочтительном воплощении способа по изобретению указанные цепи константных областей получены из человеческого IgG1 или IgG3.

Цепи константных областей человеческого IgG1 или IgG3 преимущественно используют, если клетки, экспрессирующие антиген-мишень, должны разрушаться в человеческом организме. Специалистам хорошо известно, что эти IgG-подклассы эффективно опосредуют антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) и вносят вклад в разрушение клеток, распознанных и связанных этими подклассами антител.

В еще одном предпочтительном воплощении способа по изобретению указанные VH и/или VL цепи сшиты с небелковыми фармацевтическими средствами предпочтительно с низкой молекулярной массой, такими как радиоизотопы или вещества, используемые для химиотерапии, что приводит к более специфичному нацеливанию указанных фармацевтических средств.

В следующем предпочтительном воплощении способа по изобретению указанные VH и/или VL цепи экспрессируют с нуклеиново-кислотных

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

последовательностей, которые являются результатом ОТ-ПЦР амплификации мРНК, полученной из по существу непримированных зрелых человеческих В-лимфоцитов или по существу анергических человеческих В-клеток.

Предпочтительно амплифицировать VH или VL цепи с помощью ОТ-ПЦР, как только их подходящий источник идентифицирован и выделен. Для амплификации VH или VL цепей посредством ОТ-ПЦР предпочтительно использовать мРНК содержащих ядро клеток из человеческого костного мозга, или более предпочтительно - из человеческой крови, поскольку эти два тканевых компартмента являются наиболее легко доступными источниками В-клеток у людей. Далее, перед получением препарата РНК предпочтительно выделять анергические В-клетки или, наиболее предпочтительно, зрелые непримированные В-лимфоциты из содержащих ядро клеток указанных тканевых компартментов путем использования, например, магнитных шариков или сортировки клеток на основе проточной цитометрии. Данная процедура гарантирует, что как VH, так и VL цепи, амплифицированные с помощью ОТ-ПЦР, происходят из предпочтительной популяции В-клеток. Альтернативно, если для амплификации VH или VL цепей с помощью ОТ-ПЦР используют мРНК целой фракции содержащих ядро клеток из указанных тканевых компартментов, предпочтительно амплифицировать VH-область как половину Fd-сегмента (VH-CH1) тяжелой цепи человеческого IgD путем использования IgD-специфичного 3'-ПЦР-праймера, например такого, как указан в таблице 1, который дает продукты ПЦР исключительно с человеческой IgD-тяжелой цепи, экспрессирующейся только в зрелых непримированных человеческих В-лимфоцитах и в анергических человеческих В-клетках.

В следующем предпочтительном воплощении способа по изобретению рецептор для человеческого антигена, который является низкоиммуногенным или неиммуногенным у людей, содержит комбинацию функционально перегруппированных VH и VL цепей предпочтительно из по существу непримированных человеческих В-лимфоцитов или по существу анергических человеческих В-клеток, и его можно получить с помощью способа по изобретению, описанного выше.

Преимущества антитела по изобретению здесь подчеркнуты выше. Необходимо подчеркнуть, что специалистами до сих пор не выделены

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

соответствующие антитела, направленные против человеческих антигенов и полученные из человеческих источников, причем указанные антитела обладают низкой иммуногенностью или не обладают иммуногенностью у людей. Поэтому антитела по изобретению являются стартовой точкой для целого нового направления в разработке антител, которые можно использовать в различных областях медицины и фармации.

В дополнительном предпочтительном воплощении способа по изобретению рецептор представляет собой антитело или его фрагмент.

В другом предпочтительном воплощении способа по изобретению рецептор является специфичным для человеческого опухолевого антигена, наиболее предпочтительно для человеческого 17-1A антигена.

Далее изобретение относится к рецептору, где указанная VH цепь содержит одну из последовательностей, показанных на Фиг. 7 (нуклеотиды с 1 по 381) и Фиг. 8 (нуклеотиды с 1 по 339), и/или указанная VL цепь содержит одну из двух следующих последовательностей, показанных на Фиг. 6 (нуклеотиды с 1 по 321) и Фиг. 9 (нуклеотиды с 1 по 321).

Кроме того, изобретение относится к VH цепи или ее участку, содержащимся в рецепторе по изобретению.

Изобретение также относится к VL цепи или ее участку, содержащимся в рецепторе по изобретению.

В следующем особенно предпочтительном воплощении способа по изобретению указанный участок указанной VH цепи представляет собой CDR3 домен.

Кроме того, изобретение относится к набору, содержащему комбинацию функционально перегруппированных VH или VL цепей иммуноглобулина, причем по меньшей мере одна из VH или VL цепей получена из по существу непримированных зрелых человеческих B лимфоцитов или из по существу анергических человеческих B клеток, причем указанные цепи возможно экспрессировать с рекомбинантных векторов in vitro дисплей-системы.

Указанный набор целесообразно применять при осуществлении способа по изобретению и, следовательно, при получении рецепторов желаемой специфичности.

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

Предпочтительно в указанном наборе указанная in vitro дисплей-система представляет собой фаговую дисплей-систему.

Далее изобретение относится к антителу, отличающемуся тем, что оно является производным человеческих последовательностей и специфично для человеческого 17-1A антигена.

Человеческое антитело, которое является специфичным для человеческого 17-1A антигена, способом по изобретению разработано впервые. Как показано ранее, данная разработка не являлась тривиальной задачей, поскольку человеческие антитела против человеческих антигенов, ассоциированных с опухолью, обычно подвержены механизмам, опосредующим аутотолерантность иммунной системы, что приводит к элиминации B-лимфоцитов, экспрессирующих аутореактивные антитела in vivo. Среди известных антигенов, ассоциированных с опухолью, 17-1A, кроме его экспрессии на эпителиальных опухолях, экспрессируется на широком круге нормальных эпителиальных тканей гораздо более повсеместно, чем другие опухолевые антигены.

Таким образом, в настоящее время считают, что 17-1A антиген представляет скорее панэпителиальный антиген, чем опухолевый антиген, каким его считали во время его первого описания. По сравнению с ним другие так называемые опухолевые антигены, обнаруженные на эпителиальных опухолях, подобные erb-B2 (Her 2/neu), Muc-1 (PEM) или антиген Томпсона-Фридриха (Thompson-Friedreich-antigen), обычно проявляют намного более ограниченный паттерн экспрессии на нормальных эпителиальных тканях. Следовательно, ожидается, что сила отбора аутотолерантности против B-лимфоцитов, экспрессирующих 17-1A реактивные антитела даже с низкой аффинностью, будет исключительно высокой, поскольку для таких B-клеток благодаря повсеместности данного антигена оказывается почти невозможным избежать столкновений с 17-1A антигеном в течение длительных периодов времени. Таким образом, в соответствии с настоящим изобретением было неожиданно обнаружено, что специфичные к 17-1A антитела или по меньшей мере соответствующие тяжелые цепи можно выделить из репертуара антител человеческих B-клеток, таких как например зрелые непримированные B-лимфоциты. Известно, что эти B-клетки имеют длительный период полужизни

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

in vivo, и им уже удалось избежать истощения до их созревания, несмотря на присутствие 17-1A антигена даже в сайте созревания; анергия B-клеток не встречается в случае 17-1A антигена, поскольку данный тип B-клеточной толерантности индуцируется только растворимым собственным антигеном. Только долгоживущие B-клетки, которым удалось выжить несмотря на их потенциальную 17-1A реактивность, представляют репертуар вариабельных областей человеческого иммуноглобулина, который при использовании для конструирования человеческих антител и производных антител, предназначенных, чтобы повторно вводить их системно людям, вероятно, характеризуется хорошей толерантностью человеческой иммунной системы, поскольку уже был подвергнут скринингу на иммуногенные последовательности и последовательно исключен из них посредством функции надзора иммунной системы. Таким образом, настоящее изобретение также относится к человеческим антителам, специфичным для 17-1A антигена и подходящим для повторного применения in vivo независимо от способа, которым они получены, поскольку с высокой вероятностью ожидается, что последовательности человеческих антител с указанной высокой совместимостью in vivo будут обнаруживаться в репертуаре B-клеток здоровых людей, например, с помощью способа по изобретению. Поэтому теперь впервые разработано человеческое антитело, которое можно успешно использовать при мониторинге и/или разрушении опухолевых клеток, несущих 17-1A антиген.

Таким образом, антитело по изобретению благоприятно тем, что оно является низкоиммуногенным или неиммуногенным у людей. В предпочтительном воплощении указанное антитело представляет собой то, которое можно получить согласно способу, как описано выше. В другом предпочтительном воплощении антитело по изобретению распознает эпитоп внеклеточного домена 17-1A антигена, предпочтительно включающий в себя по меньшей мере одну аминокислотную последовательность пептида № 8, 11, 13, 14, 59, 60, 77 и 79. Предпочтительно VH цепь этого антитела по изобретению содержит по меньшей мере один CDR одной из двух следующих последовательностей, показанных на Фиг. 7 (нуклеотиды с 1 по 381) и Фиг. 8 (нуклеотиды с 1 по 339), и/или VL цепь содержит по меньшей мере один CDR двух следующих последовательностей, показанных на Фиг. 6 (нуклеотиды с 1

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

по 321) и Фиг. 9 (нуклеотиды с 1 по 321). Особенно предпочтительным является антитело, где указанная VH цепь содержит одну или две следующие последовательности, показанные на Фиг. 7 (нуклеотиды с 1 по 381) и Фиг. 8 (нуклеотиды с 1 по 339), и/или указанная VL цепь содержит одну из следующих двух последовательностей, показанных на Фиг. 6 (нуклеотиды с 1 по 321) и Фиг. 9 (нуклеотиды с 1 по 321).

Сделан вывод, что данный рецептор и предпочтительно репертуар антител, отобранный на низкую иммуногенность, лучше всего представлен в библиотеке человеческих IgD-антител. IgD экспрессируется как мембранный рецептор антигена вместе с поверхностным IgM на зрелых непримированных В-лимфоцитах, которые во время их направленной миграции к вторичным лимфоидным органам или между ними входят в первичные фолликулы, если они не столкнулись с мультивалентным собственным антигеном, что приводит к клональной делеции, или с растворимым моновалентным собственным антигеном, что делает их анергическими и короткоживущими вследствие исключения из первичных фолликулов. Кроме зрелых непримированных В-лимфоцитов, в библиотеках человеческих IgD представлен репертуар антител только тех короткоживущих В-клеток, которые стали анергическими при контакте с растворимым моновалентным собственным антигеном, но маловероятно, что они вносят вклад в специфические связывающие формы с поверхностными молекулами клеток человека, напоминающими мультивалентные собственные антигены, которые индуцируют клональную делецию вместо анергии В-клеток.

Кроме того, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один из вышеупомянутых рецепторов или их участков по изобретению, либо отдельно, либо в комбинации, и возможно фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. Примеры фармацевтически приемлемых носителей хорошо известны специалистам и включают в себя забуференные фосфатом физиологические растворы, воду, эмульсии, такие как эмульсии масло/вода, различные типы увлажняющих агентов, стерильные растворы и т. д. Композиции, содержащие такие носители, можно готовить в виде препаратов с помощью известных общепринятых способов. Данные фармацевтические

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

композиции можно вводить субъекту в подходящей дозе. Введение подходящих композиций можно осуществлять различными путями, например внутривенным, внутрибрюшинным, подкожным, внутримышечным, местным или внутрикожным введением.

Таким образом, изобретение также относится к применению рецептора или его участков, полученных согласно способу по изобретению, для приготовления фармацевтической композиции для лечения, предупреждения и/или замедления опухоли у субъекта, предпочтительно если эта опухоль имеет эпителиальное происхождение.

На фигурах показано:

Фиг. 1: Сайт клонирования pComb3H с важными сайтами рестрикции. Использованы следующие сокращения: P, промотор; VL, вариабельный домен легкой цепи; CL, константный домен легкой цепи; VH, вариабельный домен тяжелой цепи; CH1, константный домен тяжелой цепи 1; L 1/2, прокариотические лидерные последовательности. Домен, обозначенный как ген III в pComb3H, кодирует неинфекционный участок продукта гена III нитевидных фагов, как например VCSM13.

Фиг. 2: Схема плазмиды pComb3H и полностью экспрессированного фага M13. На pComb3H показана организация лидерной последовательности (L) *ampA*, легкой цепи, лидерной последовательности (L) *pelB*, тяжелой цепи и гена III. Полностью экспрессированный фаг M13 проявляет на своей поверхности фенотип определенного Fab-фрагмента антитела, состоящего из легкой цепи, и Fd-сегмента тяжелой цепи (VH+CH1), связанного с неинфекционным участком продукта гена III, и содержит соответствующий генотип в виде однонитевой ДНК, кодирующей тяжелую и легкую цепи проявляемого Fab-фрагмента. Инфекционный белок гена III обеспечивается хелперным фагом VCSM13.

Фиг. 3: ELISA растворимых Fab фрагментов. Препараты растворимых Fab фрагментов периплазмы, каждый из которых содержит Fd сегмент химерного M79 и одну человеческую цепь каппа на клон. Планшеты ELISA инкубировали в течение ночи с растворимым 17-1A антигеном. Обнаружение связанных Fab-фрагментов антитела осуществляли с помощью сконъюгированного с пероксидазой поликлонального антитела против иммуноглобулина человека. Окончательно ELISA проявляли путем добавления

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

раствора АБТС-субстрата (АБТС = 2,2 азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновая кислота)), и превращение субстрата измеряли при длине волны 405 нм (у-ось). Клоны представлены на х-оси, первый номер указывает раунд пэннинга, второй представляет собой номер клона. Клоны 1.5-9 имеют комбинацию химерного Fd сегмента M79 с одной случайной цепью каппа и представляют собой негативные контроли.

Фиг. 4: ELISA растворимых Fab фрагментов. Препараты растворимых Fab фрагментов периплазмы, каждый из которых содержит легкую цепь к8 и один Fd-сегмент дельта-цепи человеческого Ig. Планшеты ELISA инкубировали в течение ночи с растворимым 17-1A антигеном. Обнаружение связанных Fab-фрагментов антитела осуществляли с помощью биотинилированного поликлонального антитела против легкой цепи каппа человека, а затем сконъюгированным с пероксидазой стрептавидином. Окончательно ELISA проявляли путем добавления раствора АБТС-субстрата (АБТС = 2,2 азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновая кислота)), и превращение субстрата измеряли при длине волны 405 нм (у-ось). Клоны представлены на х-оси, первый номер указывает раунд пэннинга, второй представляет собой номер клона. Клоны 1.2-6 имеют комбинацию легкой цепи к8 с одним случайным Fd сегментом тяжелой цепи дельта Ig и представляют собой негативные контроли.

Фиг. 5: ELISA растворимых Fab фрагментов. Препараты растворимых Fab фрагментов периплазмы, каждый из которых содержит Fd сегмент D4.5 и одну человеческую цепь каппа на клон. Планшеты ELISA инкубировали в течение ночи с растворимым 17-1A антигеном. Обнаружение связанных Fab-фрагментов антитела осуществляли с помощью биотинилированного поликлонального антитела против легкой цепи каппа человека, а затем сконъюгированным с пероксидазой стрептавидином. Окончательно ELISA проявляли путем добавления раствора АБТС-субстрата (АБТС = 2,2 азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновая кислота)), и превращение субстрата измеряли при длине волны 405 нм (у-ось). Клоны представлены на х-оси, первый номер указывает раунд пэннинга, второй представляет собой номер клона; S представляет собой сокращение для клонов перед первым раундом отбора. Клоны S.1-3 имеют комбинацию легкой цепи к8 с одним случайным Fd сегментом тяжелой цепи дельта Ig и представляют собой негативные контроли.

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

Фиг. 6: Последовательности ДНК и белка вариабельной области человеческой легкой цепи каппа 8. Номера указывают положения нуклеотидов (нт), аминокислоты представлены в однобуквенном коде. CDR1 включает в себя от нт 70 до нт 102, CDR2 - от нт 148 до нт 168, CDR3 - от нт 265 до нт 294.

Фиг. 7: Последовательность ДНК вариабельной области тяжелой цепи человеческого D4.5. Номера указывают положения нуклеотидов (нт), аминокислоты представлены в однобуквенном коде. CDR1 включает в себя от нт 91 до нт 105, CDR2 - от нт 148 до нт 198, CDR3 - от нт 292 до нт 351. Граница между вариабельной областью тяжелой цепи и CH1 доменом константной области Ig дельта локализована между нт 382 и нт 383, причем константная область дельта белковой последовательности начинается с нт 384.

Фиг. 8: Последовательность ДНК вариабельной области тяжелой цепи человеческого D7.2. Номера указывают положения нуклеотидов (нт), аминокислоты представлены в однобуквенном коде. CDR1 включает в себя от нт 91 до нт 105, CDR2 - от нт 148 до нт 198, CDR3 - от нт 292 до нт 351. Граница между вариабельной областью тяжелой цепи и CH1 доменом константной области дельта Ig локализована между нт 340 и нт 341, причем константная область дельта белковой последовательности начинается с нт 343.

Фиг. 9: Последовательности ДНК и белка вариабельной области человеческой легкой цепи каппа 5.1. Номера указывают положения нуклеотидов (нт), аминокислоты представлены в однобуквенном коде. CDR1 включает в себя от нт 70 до нт 102, CDR2 - от нт 148 до нт 168, CDR3 - от нт 265 до нт 294.

Фиг. 10: Анализ Fab-фрагментов антитела проточной цитометрией и контрольного антитела M79 на 17-1A позитивных клетках Kato для тестирования связывающей активности препарата периплазмы, содержащего k8-D4.5-Fab-фрагмент. Клетки Kato инкубировали с I) посторонним препаратом периплазмы; II) 10 мкг/мл химерного (бивалентного!) M79, III) препаратом периплазмы k8-D4.5 и IV) 1:10 разведением препарата периплазмы k8-D4.5. Относительные количества клеток показаны на y-оси, относительная интенсивность флуоресценции показана на x-оси.

Фиг. 11: Анализ Fab-фрагментов антитела и полноразмерных антител проточной цитометрией на 17-1A позитивных клетках Kato и CHO-клетках,

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

трансфицированных 17-1A и нетрансфицированных соответственно, для тестирования связывающей активности препаратов периплазмы (пп), содержащих k8-D4.5-, k5.1-D4.5- или посторонний k-D4.5-Fab-фрагмент. Клетки Kato инкубировали I) с посторонним пп (пунктир) или k5.1-D4.5-pp (сплошная линия), или II) с 20 мкг/мл M79-антитела (сплошная линия) или соответствующим мышиным Ig2a контролем изотипа (пунктир). CHO-клетки, трансфицированные 17-1A, инкубировали III) с посторонним пп (пунктир) или k5.1-D4.5-пп (сплошная линия), IV) с посторонним пп (пунктир) или k8-D4.5-пп (сплошная линия), или V) с 20 мкг/мл M79-антитела (сплошная линия) или соответствующим мышиным Ig2a контролем изотипа (пунктир). В III), IV) и V) инкубацию и обнаружение нужного пп (k5.1-D4.5Fab-пп и k8-D4.5-Fab-пп, соответственно) и мышиного антитела M79 также проводили на нетрансфицированных CHO-клетках (точечные линии). Относительные количества клеток показаны на y-оси, относительная интенсивность флуоресценции показана на x-оси.

Фиг. 12: Сайт клонирования pEF-ADA с важными сайтами рестрикции. Использованы следующие сокращения: P, промотор; VL, вариабельный домен легкой цепи; CL, константный домен легкой цепи; Leuc, эукариотическая лидерная последовательность.

Фиг. 13: Сайт клонирования pEF-DHFR с важными сайтами рестрикции. Использованы следующие сокращения: P, промотор; VH, вариабельный домен тяжелой цепи; CH1/2/3, константный домен тяжелой цепи 1/2/3; Leuc, эукариотическая лидерная последовательность.

Фиг. 14: ДДС-ПААГ электрофорез препаратов человеческого антитела H79. Примерно 10 мкг каждого антитела разгоняли на 12,5%-ном денатурирующем полиакриламидном геле в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях и окрашивали Кумасси синим.

Дорожка 1: Маркер (MM [кДа] отдельных полос, указанная на левой стороне геля)

Дорожка 2: человеческий IgG1-вариант H79 (невосстанавливающие)

Дорожка 3: человеческий IgG1-вариант H79 (в восстанавливающих условиях)

Дорожка 4: мышиный IgG1-вариант H79 (невосстанавливающие)

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

Дорожка 5: мышиный IgG1-вариант H79 (в восстанавливающих условиях)

Фиг. 15: ДДС-ПААГ электрофорез препаратов человеческих антител H79 и HD70. 10 мкг H79 и 3,5 мкг HD70 разгоняли на 12,5%-ном денатурирующем полиакриламидном геле в невосстанавливающих (гель 1) и восстанавливающих (гель 2) условиях и окрашивали Кумасси синим.

Гель 1: Дорожка 1: Маркер (ММ [кДа] отдельных полос, указанная на левой стороне геля)

Дорожка 2: человеческий IgG1-вариант H79 (невосстанавливающие)

Дорожка 3: человеческий IgG1-вариант HD70 (невосстанавливающие)

Гель 2: Дорожка 4: Маркер (ММ [кДа] отдельных полос, указанная на левой стороне геля)

Дорожка 5: человеческий IgG1-вариант H79 в восстанавливающих условиях

Дорожка 6: человеческий IgG1-вариант HD70 в восстанавливающих условиях

Фиг. 16: Анализ проточной цитометрией 17-1A позитивных клеток Kato для тестирования связывающей активности очищенного человеческого IgG1 H79, а также очищенного мышиного IgG1 H79. Клетки Kato инкубировали с контролями изотипа IgG (10 мкг/мл человеческого IgG1 и мышиного IgG1, соответственно), позитивными контролями (M79 и химерным M74 в концентрации 10 мкг/мл, соответственно) (оба 17-1A специфичны) и с человеческим IgG1 H79 или мышиным IgG1 H79 (10 мкг/мл и 1 мкг/мл каждого). Относительные количества клеток показаны на y-оси, относительная интенсивность флуоресценции показана на x-оси.

Фиг. 17: Анализ антител (концентрация: 20 мкг/мл каждого) проточной цитометрией на 17-1A позитивных клетках Kato и CHO-клетках, трансфицированных 17-1A и нетрансфицированных, для тестирования связывающей активности очищенных антител человеческого IgG1 H79, мышиного IgG1 H79, HD70, D7.2, M79, Panorex и контролей изотипа (человеческий IgG1, мышиный IgG1 и 2a). I) человеческий IgG1 H79 (сплошная линия) и контроль изотипа человеческого IgG1 (пунктир) на клетках Kato, II) мышиный IgG1 H79 (сплошная линия) и контроль изотипа мышиного IgG1 (пунктир) на клетках Kato, III) HD70 (сплошная линия) и контроль изотипа

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

человеческого IgG1 (пунктир) на клетках Kato, IV) D7.2 (сплошная линия) и контроль изотипа человеческого IgG1 (пунктир) на клетках Kato, V) M79 (сплошная линия) и контроль изотипа мышиного IgG2a (пунктир) на клетках Kato, VI) Panorex (сплошная линия) и контроль изотипа мышиного IgG2a (пунктир) на клетках Kato, VII) человеческий IgG1 H79 (сплошная линия) и контроль изотипа человеческого IgG1 (пунктир) на CHO-клетках, трансфицированных 17-1A, VIII) мышиный IgG1 H79 (сплошная линия) и контроль изотипа мышиного IgG1 (пунктир) на CHO-клетках, трансфицированных 17-1A, IX) HD70 (сплошная линия) и контроль изотипа человеческого IgG1 (пунктир) на CHO-клетках, трансфицированных 17-1A, X) D7.2 (сплошная линия) и контроль изотипа человеческого IgG1 (пунктир) на CHO-клетках, трансфицированных 17-1A, XI) M79 (сплошная линия) и контроль изотипа мышиного IgG2a (пунктир) на CHO-клетках, трансфицированных 17-1A, XII) Panorex (сплошная линия) и контроль изотипа мышиного IgG2a (пунктир) на CHO-клетках, трансфицированных 17-1A. На фигурах VII-XII также показаны результаты инкубации и обнаружения нужных антител на нетрансфицированных CHO-клетках (точечные линии).

Фиг. 18: ^{51}Cr анализ антителозависимой клеточной цитотоксичности. Для высвобождения ^{51}Cr нестимулированные мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC, $5x10^5$ клеток) в качестве эффекторных клеток инкубировали с мечеными клетками-мишенями (клетки Kato, меченные в течение 2 ч ^{51}Cr) и антителами в различных концентрациях в течение 4 или 20 ч при 37°C. В качестве негативных контролей (H79 = H79huIgG1) использовали соответствующие несвязывающие изотипы (h-IgG = человеческий IgG1; m-IgG2a = мышиный IgG2a). Специфический лизис вычисляли как ((имп/мин, экспериментальное высвобождение) - (имп/мин, спонтанное высвобождение))/((ипм/мин, максимальное высвобождение) - (имп/мин, спонтанное высвобождение)).

Фиг. 19: Световая микрофотография здоровой ткани ободочной кишки человека, окрашенной M79 (позитивным) контролем. 5 нм криосрезы нормальной ткани слизистой оболочки инкубировали с мышиным антителом M79 (IgG2a) в качестве позитивного контроля (10 мкг/мл). Обнаружение связанных мышиных антител осуществляли с помощью сконъюгированного с

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

пероксидазой поликлонального антитела против Ig мыши и окрашивали карбазолом (коричневый). Для подсчета осуществляли окрашивание гемалоном (синий).

Фиг. 20: Световая микрофотография здоровой ткани ободочной кишки человека, окрашенной мышиным IgG1 H79. 5 нм криосрезы нормальной ткани слизистой оболочки инкубировали с мышиным IgG вариантом антитела H79 (10 мкг/мл). Обнаружение связанных мышиных антител осуществляли с помощью сконъюгированного с пероксидазой поликлонального антитела против Ig мыши и окрашивали карбазолом (коричневый). Для подсчета осуществляли окрашивание гемалоном (синий).

Фиг. 21: Световая микрофотография карциномы ободочной кишки, окрашенной M79 (позитивный контроль). 5 нм криосрезы карциномы ободочной кишки инкубировали с мышиным антителом M79 (IgG2a) в качестве позитивного контроля (10 мкг/мл). Обнаружение связанных мышиных антител осуществляли с помощью сконъюгированного с пероксидазой поликлонального антитела против Ig мыши и окрашивали карбазолом (коричневый). Для подсчета осуществляли окрашивание гемалоном (синий).

Фиг. 22: Световая микрофотография карциномы ободочной кишки, окрашенной мышиным IgG1 H79. 5 нм криосрезы ткани карциномы ободочной кишки инкубировали с мышиным IgG1 вариантом антитела H79 (10 мкг/мл). Обнаружение связанных мышиных антител IgG1 осуществляли с помощью сконъюгированного с пероксидазой поликлонального антитела против Ig мыши и окрашивали карбазолом (коричневый). Для подсчета осуществляли окрашивание гемалоном (синий).

Фиг. 23: Световая микрофотография здоровой ткани ободочной кишки человека, окрашенной мышиным IgG2 контролем изотипа. 5 нм криосрезы нормальной ткани слизистой оболочки инкубировали с посторонним мышиным IgG2a антителом в качестве негативного контроля (10 мкг/мл). Обнаружение связанных мышиных антител осуществляли с помощью сконъюгированного с пероксидазой поликлонального антитела против Ig мыши и окрашивали карбазолом (коричневый). Для подсчета осуществляли окрашивание гемалоном (синий).

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

Фиг. 24: Световая микрофотография здоровой ткани ободочной кишки человека, окрашенной IgG1 контролем изотипа. 5 нм криосрезы нормальной ткани слизистой оболочки инкубировали с посторонним мышиным IgG1 антителом в качестве негативного контроля (10 мкг/мл). Обнаружение связанных мышиных антител осуществляли с помощью сконъюгированного с пероксидазой поликлонального антитела против Ig мыши и окрашивали карбазолом (коричневый). Для подсчета осуществляли окрашивание гемалоном (синий).

Фиг. 25: Световая микрофотография карциномы ободочной кишки человека, окрашенной мышиным IgG2 контролем изотипа. 5 нм криосрезы нормальной ткани слизистой оболочки инкубировали с посторонним мышиным IgG2a антителом в качестве негативного контроля (10 мкг/мл). Обнаружение связанных мышиных антител осуществляли с помощью сконъюгированного с пероксидазой поликлонального антитела против Ig мыши и окрашивали карбазолом (коричневый). Для подсчета осуществляли окрашивание гемалоном (синий).

Фиг. 26: Световая микрофотография карциномы ободочной кишки человека, окрашенной IgG1 контролем изотипа. 5 нм криосрезы нормальной ткани слизистой оболочки инкубировали с посторонним мышиным IgG1 антителом в качестве негативного контроля (10 мкг/мл). Обнаружение связанных мышиных антител осуществляли с помощью сконъюгированного с пероксидазой поликлонального антитела против Ig мыши и окрашивали карбазолом (коричневый). Для подсчета осуществляли окрашивание гемалоном (синий).

Фиг. 27: Анализ эпитопов мышиного антитела M79 и человеческих антител H79 и HD70, каждое из которых является специфичным для человеческого 17-1A антигена. Антитела инкубировали с ранжированным в порядке решетки рядом пептидов, содержащим 119 полипептидов из 13 аминокислот, сдвинутых на две аминокислоты, и покрывающим полноразмерную внеклеточную аминокислотную последовательность человеческого 17-1A антигена. Эти пептиды ковалентно присоединяли по их C-концам к Pep Spots Membrane (Jerini Biotools, Berlin) в виде индивидуальных пятен. Связанное мышиное антитело M79 обнаруживали непосредственно на

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

Pep Spots Membrane с помощью антитела против мышиного иммуноглобулина, соединенного с пероксидазой из хрена (HRP) с последующей хемилюминесценцией. Сигналы, которые связаны с реактивностью только вторичного антитела с отдельными пептидными пятнами, показаны при соответствующем контрольном окрашивании Pep Spots Membrane. В результате вычитания основного фона окрашивания оказалось, что в пептидном пятне 87, пептидных пятнах 38 и 95 представлено специфическое связывание мышиного антитела M79. Вследствие более высокой степени перекрестной реактивности вторичного HRP-сконъюгированного антитела против иммуноглобулина человека с некоторыми пептидными пятнами, связанные человеческие антитела H79 и HD70 переносили с Pep Spots Membrane на мембрану для блоттинга, соответственно, с помощью метода электропереноса и обнаруживали последовательно указанным вторичным антителом против человека и хемилюминесценцией. Специфическое связывание человеческого антитела H79 может быть обнаружено главным образом в пептидных пятнах 8, 11, 13, 14, 59-60, 77 и 79; однако, никакого связывания не обнаруживалось в случае человеческого антитела HD70.

Примеры иллюстрируют изобретение:

Пример 1: Конструирование комбинаторных библиотек антител и фагового дисплея

Библиотеку легкой цепи иммуноглобулина (Ig) человека и Fd-ДНК-фрагментов тяжелой цепи Ig конструировали с помощью ОТ-ПЦР с наборами праймеров, специфичных для каппа-, лямбда- и Fd дельта на тотальной РНК, полученной из лимфоцитов периферической крови (ЛПК) и образцов костного мозга от четырех и десяти людей-доноров, соответственно, согласно (Chomczynski, Analytical Biochemistry 162 (1987) 156-159). кДНК синтезировали согласно стандартным способам (Sambrook, Cold Spring Harbour Laboratory Press 1989, second edition).

Были выбраны следующие наборы праймеров, дающие сайт распознавания 5'-*XhoI* и 3'-*SpeI* для фрагментов тяжелой цепи и сайт распознавания 5'-*SacI* и 3'-*XbaI* для легких цепей.

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

Для ПЦР амплификации дельта Fd кДНК-фрагментов каждый из пяти различных специфичных праймеров для 5'-VH-семейства объединяли с одним праймером 3'-CH1 дельта; для ПЦР амплификации фрагментов каппа (к) легкой цепи каждый из пяти различных специфичных праймеров для 5'-VK-семейства объединяли с одним праймером 3'-CK, а для амплификации фрагментов лямбда (L) легкой цепи восемь различных специфичных праймеров для 5'-VL-семейства объединяли с одним праймером 3'-CL.

Наборы праймеров для амплификации Fab-ДНК-фрагментов (от 5' к 3') показаны ниже в таблице I.

Для амплификации использовали следующую ПЦР программу:

Денатурация при 94°C с течение 15 секунд, отжиг праймеров при 52°C в течение 50 секунд и элонгация праймеров при 72°C в течение 90 секунд в течение 40 циклов с последующими 10 минутами конечной элонгации при 72°C.

Таблица I: Наборы праймеров:

Fd фрагмент тяжелой цепи:

5'-праймер:

VH1,3,5,7:	AGGTGCAGCTGCTCGAGTCTGG
VH2:	CAG(AG)TCACCTTGCTCGAGTCTGG
VH4:	CAGGTGCAGCTGCTCGAGTCGGG
VH4B:	CAGGTGCAGCTACTCGAGTGGGG
VH6:	CAGGTACAGCTGCTCGAGTCAGG

3'-праймер:

CD1:	TGCCTTACTAGTCTCTGGCCAGCGGAAGAT

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

Фрагмент цепи каппа:

5'-праймер:

VK1: GAGCCGCACGAGCCCGAGCTCCAGATGACCCAGTCTCC

VK3: GAGCCGCACGAGCCCGAGCTCGTG(AT)TGAC(AG)CAGTCTCC

VK2/4: GAGCCGCACGAGCCCGAGCTCGTGATGAC(CT)CAGTCTCC

VK5: GAGCCGCACGAGCCCGAGCTCACACTCACGCAGTCTCC

VK6: GAGCCGCACGAGCCCGAGCTCGTGCTGACTCAGTCTCC

3'-праймер:

CK1D:

GCGCCGTCTAGAATTAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCTTTGTGA CGGGCGAACTCAG

фрагмент цепи лямбда:

5'-праймер:

VL1: AATTTTGAGCTCACTCAGCCCCAC

VL2: TCTGCCGAGCTCCAGCCTGCCTCCGTG

VL3: TCTGTGGAGCTCCAGCCGCCCTCAGTG

VL4: TCTGAAGAGCTCCAGGACCCTGTTGTGTCTGTG

VL5: CAGTCTGAGCTCACGCAGCCGCCC

VL6: CAGACTGAGCTCACTCAGGAGCCC

VL7: CAGGTTGAGCTCACTCAACCGCCC

VL8: CAGGCTGAGCTCACTCAGCCGTCTTCC

3'-праймер:

CL2: CGCCGTCTAGAATTATGAACATTCTGTAGG

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

450 нг фрагментов легкой цепи каппа (ферментативно гидролизованных *SacI* и *XbaI*) лигировали с 1400 нг фагмиды pComb3H (ферментативно гидролизованной *SacI* и *XbaI*; большой фрагмент ДНК), производной от pComb3 (Barbas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991) 7978-7982), где положение тяжелой цепи было уже занято Fd фрагментом химеризованного мышиного антитела M79 (содержащего человеческий Ig1 CH1), направленного против внеклеточного участка 17-1A белка (см. сайт клонирования pComb3H на фиг. 1).

Затем полученной комбинаторной ДНК-библиотекой антител трансформировали 300 мкл электрокомпетентной *Escherichia coli* XL1 Blue с помощью электропорации (2,5 кВ, кювета с просветом 0,2 см, 25 Ф, 200 Ом, Biorad gene-pulser), в результате чего получали размер библиотеки $4x10^7$ независимых клонов. Через один час экспрессии фенотипа позитивные трансформанты отбирали на устойчивость к карбенициллину, кодируемую вектором pComb. После этой адаптации данные клоны инфицировали инфекционной дозой $1x10^{12}$ фаговых частиц хелперного фага VCSM13, что приводило к продуцированию и секреции нитевидных фагов M13, каждый из которых содержал однонитевую ДНК pComb3H, кодирующую одну человеческую легкую цепь и Fd сегмент химерного M79, и проявлял соответствующий Fab фрагмент на поверхности фага в результате трансляционного слияния с неинфекционным участком белка III фаговой оболочки (фаговый дисплей), см. Фиг. 2.

Данную фаговую библиотеку, несущую клонированный Fab репертуар, собирали из супернатанта культуры с помощью осаждения PEG8000/NaCl и центрифугирования, вновь растворяли в ТБС (трис-солевой буфер)/1%БСА (бычий сывороточный альбумин) и инкубировали с рекомбинантным s17-1A, иммобилизованным на 96-луночных планшетах ELISA. S17-1A получали, как описано (Mack, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7021-7025). Fab фаги, которые специфически не связывались с антигеном-мишенью, удаляли с помощью отмывки ТБС/0,5% Твин до десяти стадий. Связывающиеся фаги элюировали с помощью HCl-глицина pH 2,2 и после нейтрализации элюата 2M Трис pH 12 использовали для инфекции новой неинфицированной культуры *E.coli* XL1 Blue. Клетки, успешно трансдуцированные копией фагмиды pComb, кодирующей антиген-связывающий Fab фрагмент, вновь отбирали на

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

устойчивость к карбенициллину и последовательно инфицировали хелперным фагом VCSM13, чтобы начать второй раунд дисплея антитела и отбора in vitro.

После пяти раундов продуцирования и отбора антиген-связывающих Fab фагов получали плазмидную ДНК, содержащую отобранный Fab репертуар.

Для получения растворимых Fab белков фрагмент ДНК гена III вырезали из плазмид, разрушая таким образом трансляционное слияние Fd сегмента тяжелой цепи с белком гена III. После повторного лигирования данный пул плазмидной ДНК трансформировали в 100 мкл компетентной к тпловому шоку *E.coli* XL1 Blue и высевали на LB агар с карбенициллином (Carb). Отдельные колонии выращивали в 10 мл LB-Carb культур/20 мМ $MgCl_2$ и через шесть часов индуцировали экспрессию Fab путем добавления изопропил-β-тиогалактозида (ИПТГ) до конечной концентрации 1 мМ. Как данный отбор in vitro, так и экспрессию растворимых Fab фрагментов осуществляли согласно (Burton, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991), 10134-10137). Клетки собирали через 20 часов; препарат периплазмы получали с помощью четырех раундов замораживания (этанол/сухой лед) и оттаивания (37°C) и тестировали с помощью ELISA на связывание Fab фрагментов с s17-1A. 23 из 27 клонов проявляли связывающую активность. После секвенирования оказалось, что два клона с самыми сильными сигналами (см. Фиг. 3) имеют идентичные цепи каппа, и они были названы к8; см. Фиг. 6.

Эту человеческую легкую цепь к8 теперь использовали в качестве партнера связывания для пула тяжелых цепей дельта человеческого Ig; 2250 нг Fd ДНК-фрагментов человеческой тяжелой цепи дельта (ферментативно гидролизованных *XhoI* и *SpeI*) лигировали с 7000 нг фагмидного вектора pComb3H (ферментативно гидролизованного *XhoI* и *SpeI*; большой фрагмент ДНК), содержащего фрагмент ДНК к8 в положении легкой цепи.

Выбор репертуара человеческой цепи дельта в качестве источника вариабельных областей тяжелой цепи, которые специфически связываются с 17-1A антигеном при комбинировании с легкой цепью к8, оказался наиболее подходящим. Цепи дельта продуцируются только в зрелых непримированных и в специфичных к собственному антигену анергических В-клетках, которые еще не претерпели или не претерпят пролиферацию; следовательно, разнообразие их репертуара тяжелых цепей выше, а число каждой отдельной специфичности

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

в нем ниже по сравнению со репертуарами тяжелых цепей других изотипов иммуноглобулина.

Трансформация библиотеки pComb-k8-дельта Fd-фрагментов общего количества 1500 мкл *E.coli* XL1 Blue с помощью пяти равных электропораций (2,5 кВ, кювета с просветом 0,2 см, 25 Ф, 200 Ом) приводила к конечному числу $1,1x10^9$ независимых клонов.

Отбор этой комбинаторной библиотеки антител in vitro осуществляли, как описано выше для репертуара человеческих легких цепей. После четырех раундов пэннинга растворимые Fab фрагменты получали из восьми клонов.

Препараты периплазмы тестировали на ELISA. Один из клонов проявлял сильное связывание антигена (см. Фиг. 4). Этот клон был назван D4.5, и ДНК фрагмента Fd дельта была секвенирована с использованием обратного дельта CH1-специфичного праймера (см. Фиг. 7).

Другой s17-1A-связывающий Fab фрагмент был выделен после дальнейших раундов пэннинга, причем в раунде 7 ELISA сигнал оказался значительно слабее по сравнению с D4.5 (см. Фиг. 4). Этот клон был обозначен как D7.2, и вновь была определена последовательность ДНК с использованием дельта-специфичного праймера (см. Фиг. 8).

Чтобы идентифицировать дополнительных партнеров легкой цепи, которые комбинируются с Fd сегментом тяжелой цепи дельта D4.5 с образованием 17-1A-специфичного Fab фрагмента, провели эксперимент по перегруппировке:

450 нг фрагментов человеческой легкой цепи каппа и 450 нг фрагментов человеческой легкой цепи лямбда (и те, и другие ферментативно гидролизованы *SacI* и *XbaI*) каждые лигировали с 1400 нг фагмиды pComb3H (ферментативно гидролизованной *SacI* и *XbaI*; большой фрагмент ДНК), где положение тяжелой цепи было уже занято Fd фрагментом D4.5. Затем каждой из полученных комбинаторных библиотек антител (каппа и лямбда) трансформировали 300 мкл электрокомпетентной *Escherichia coli* XL1 Blue с помощью электропорации (2,5 кВ, кювета с просветом 0,2 см, 25 Ф, 200 Ом, Biorad gene-pulser), в результате чего получали размер библиотеки $0,5x10^7$ независимых клонов для каппа-библиотеки и $1,4x10^7$ независимых клонов для лямбда-библиотеки. Через один час экспрессии фенотипа позитивные

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

трансформанты отбирали на устойчивость к карбенициллину, кодируемую вектором pComb. После этой адаптации данные клоны инфицировали инфекционной дозой $1x10^{12}$ фаговых частиц хелперного фага VCSM13, что приводило к продуцированию и секреции нитевидных фагов M13, каждый из которых содержал однонитевую ДНК pComb3H, кодирующую одну человеческую легкую цепь и Fd сегмент тяжелой цепи D4.5, и проявлял соответствующий Fab фрагмент на поверхности фага в результате трансляционного слияния с неинфекционным участком белка III фаговой оболочки.

Обе фаговые библиотеки, несущие клонированные Fab репертуары (каппа и лямбда), собирали из супернатанта культуры с помощью осаждения ПЭГ8000/NaCl и центрифугирования, вновь растворяли в ТБС/1%БСА и инкубировали с рекомбинантным s17-1A, иммобилизованным на 96-луночных планшетах ELISA. Fab фаги, которые специфически не связывались с антигеном-мишенью, удаляли с помощью отмывки ТБС/0,5% Твин до десяти стадий. Связывающиеся фаги из обеих библиотек (каппа и лямбда) элюировали с помощью HCl-глицина pH 2,2 и после нейтрализации элюата 2M Трис pH 12 использовали для инфекции новых неинфицированных культур *E.coli* XL1 Blue, одной для каппа и одной для лямбда библиотеки. Клетки, успешно трансдуцированные копией фагмиды pComb, кодирующей антиген-связывающий Fab фрагмент, вновь отбирали на устойчивость к карбенициллину и последовательно инфицировали хелперным фагом VCSM13, чтобы начать второй раунд дисплея антитела и отбора in vitro.

После пяти раундов продуцирования и отбора антиген-связывающих Fab фагов получали препарат плазмидной ДНК, содержащей отобранный Fab репертуар из каждого раунда пэннинга, соответственно.

Для получения растворимых Fab белков фрагмент ДНК гена III вырезали из плазмид, разрушая таким образом трансляционное слияние Fd сегмента тяжелой цепи с белком гена III. После повторного лигирования данным пулом плазмидной ДНК трансформировали 100 мкл компетентной к тепловому шоку *E.coli* XL1 Blue и высевали на LB агар с карбенициллином (Carb). Отдельные колонии выращивали в 10 мл LB-Carb культур/20 мМ $MgCl_2$ и через шесть часов индуцировали экспрессию Fab путем добавления изопропил-β-тиогалактозида

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(ИПТГ) до конечной концентрации 1 мМ. Клетки собирали через 20 часов; препарат периплазмы получали с помощью замораживания и оттаивания и тестировали с помощью ELISA на связывание Fab фрагментов с s17-1A.

Всего 45 клонов каппа и 45 клонов лямбда библиотеки, полученные преимущественно из пятого раунда пэннинга, но в меньшей степени также из других раундов, тестировали на связывание с 17-1A антигеном. Оказалось, что только один клон, обозначенный k5.1 (каппа библиотека), в раунде пять проявлял связывающую активность (см. Фиг. 5). Была определена последовательность ДНК V-области каппа k5.1 (см. Фиг. 9).

Пример II: Бактериальная экспрессия в *E.coli* XL1 Blue

Как упомянуто ранее в примере I, *E.coli* XL1 Blue, трансформированные pComb3H, содержащей одну легкую цепь и Fd-сегмент одной тяжелой цепи, продуцируют растворимый Fab в достаточных количествах после вырезания фрагмента гена III и индукции с помощью ИПТГ. Fd-сегмент тяжелой цепи и легкая цепь экспортируются в периплазму, где они собираются и образуют функциональные Fab-фрагменты.

Для получения лучших препаратов периплазмы клетки выращивали в среде SB, обогащенной 20 мМ $MgCl_2$ и ресуспендировали в ЗФР (забуференный фосфатом физиологический раствор) после сбора. С помощью четырех раундов замораживания при –70°C и оттаивания при 37°C внешняя мембрана бактерий разрушалась термошоком, и растворимые периплазматические белки, включающие в себя Fab фрагменты, высвобождались в супернатант. После элиминации интактных клеток и клеточных обломков с помощью центрифугирования супернатанты, содержащие Fab-фрагменты антител, собирали и использовали для дальнейшего исследования.

Сначала препараты периплазмы k8-D4.5-Fab и k5.1-D4.5-Fab тестировали на связывание с иммобилизованным s17-1A антигеном, причем оба показали сильные ELISA сигналы (см. пример I).

Обнаружение k8-D4.5 и k5.1-D4.5-Fab-фрагментов, связанных с иммобилизованным s17-1A антигеном, осуществляли, используя поликлональное биотинилированное антитело против человеческой легкой

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

цепи каппа (1 мкг/мл ЗФР), обнаруживаемое сконъюгированным с пероксидазой хрена авидином (1 мкг/мл ЗФР). Сигнал проявляли путем добавления раствора субстрата, содержащего 2,2'азино-бис(3-этилбенз-тиазолин-6-сульфоновую кислоту) и перборат Na, и обнаруживали при длине волны 405 нм.

Тест на связывание двух 17-1A-позитивных человеческих Fab-фрагментов (k8-D4.5-Fab и k5.1-D4.5-Fab) на клетках Kato (клеточной линии рака желудка, экспрессирующей 17-1A), CHO-клетках, трансфицированных 17-1A (CHO/17-1A) и нетрансфицированных CHO-клетках снова проводили на препаратах периплазмы. CHO трансфицированные клеточные линии создавали путем субклонирования фрагмента ДНК, кодирующего полноразмерную аминокислотную последовательность 17-1A антигена, известного также как GA733-2 (Szala, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 3542-3546), в эукариотический вектор экспрессии pEF-DHFR (Mack, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7021-7025) согласно стандартным методикам (Sambrook, Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY (1989)). Полученную плазмиду линеаризовали *NdeI* и трансфицировали в DHFR-дефицитные CHO-клетки для стабильной экспрессии. Экспрессию трансмембранного 17-1A повышали путем ступенчатой амплификации гена, индуцированной последовательным добавлением возрастающих концентраций DHFR-ингибитора метотрексата (Methotrexat, MTC) до конечной концентрации 500 нМ, причем стадии концентрации составляли между 20 нМ и 100 нМ (Kaufmann, Methods Enzymol. 185 (1990), 537-566).

200000 клеток (Kato-, CHO/17-1A- или CHO-клетки) инкубировали с одним из препаратов периплазмы, содержащих нужные или посторонние Fab, с последующим добавлением биотинилированного поликлонального антитела против человеческой легкой цепи каппа (20 мкг/мл ЗФР) и ФИТЦ-сконъюгированного стрептавидина. Затем меченые клетки анализировали проточной цитометрией. Препараты периплазмы, содержащие k8-D4.5-Fab и k5.1-D4.5-Fab, соответственно проявляли отчетливые сигналы по сравнению с посторонним препаратом периплазмы (негативный контроль), но не наблюдалось окрашивания нетрансфицированных CHO-клеток, что, таким образом, демонстрирует специфичность к 17-1A-антигену. Анти-17-1A антитело

RU 2224766 C2
RU 2224766 C2

M79 (Göttlinger, Int. J. Cancer 38 (1986), 47-53) использовали в качестве позитивного контроля для 17-1A-позитивных клеток, а мышиное антитело IgG2a использовали в качестве контроля изотипа (см. Фиг. 10 и 11).

Пример III: Эукариотическая экспрессия в CHO-клетках

Бактерии обычно неспособны продуцировать полноразмерные функциональные иммуноглобулины, хотя они экспрессируют функциональные Fab-фрагменты.

Для продуцирования полноразмерных функциональных антител необходимо использовать клетки млекопитающих, и поэтому k8-легкую цепь и вариабельный домен тяжелой цепи D4.5 субклонировали в векторы экспрессии млекопитающих.

а) легкие цепи (k8 и k5.1): Для создания подходящих концевых сайтов рестрикции фрагменты ДНК k8 и k5.1 реамплифицировали с помощью ПЦР, в результате чего получали каппа-фрагменты с *Bsu36I*-сайтом на 5'-конце, а также *SalI* и *NotI*-сайтом на 3'-конце.

Эти фрагменты (k8 и k5.1) субклонировали в плазмиду BSPOLL по *Bsu36I* и *NotI*, таким образом добавляя лидерную последовательность млекопитающих, и секвенировали для предотвращения ПЦР-индуцированных мутаций.

Используя *EcoRI* и *SalI*, k8 и k5.1 вырезали из BSPOLL и субклонировали в эукариотический вектор экспрессии pEF-ADA (см. Фиг. 12), полученный из вектора экспрессии pEF-DHFR (Mack, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 (1995) 7021-7025) путем замещения кДНК, кодирующую мышиную дигидрофолатредуктазу (dihydrofolatereductase, DHFR), кДНК, кодирующей мышиную аденозиндезаминазу (adenosine deaminase, ADA).

Для каждого вида легкой цепи (k8 и k5.1) 10^7 CHO клеток трансфицировали 100 мкг линеаризованной плазмидной ДНК, соответственно, и последовательно культивировали в условиях отбора на активность аденозиндезаминазы (ADA), кодируемую вектором экспрессии.

Выживающие ADA-позитивные клетки культивировали для дальнейшей трансфекции тяжелыми цепями, несущими D4.5- или D7.2-вариабельный домен.

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

б) тяжелый 4.5 вариабельный домен: Вариабельную область реамплифицировали из дельта Fd-фрагмента D4.5 с помощью ПЦР, создавая сайты рестрикции *Bsu36I* на обоих концах.

Полученный в результате фрагмент ДНК V-D4.5 затем субклонировали с использованием этих сайтов рестрикции в эукариотический вектор экспрессии pEF-DHFR, уже содержащий как эукариотическую лидерную последовательность, так и фрагмент ДНК, кодирующий константную область тяжелой цепи человеческого IgG1 (см. Фиг. 13). Вариабельную область D4.5 тяжелой цепи, таким образом, встраивали между лидерной последовательностью и константной областью тяжелой цепи.

Эту вариабельную область секвенировали, и полноразмерный клон был обозначен H79V-D4.5 hu IgG1.

Для последующего окрашивания ткани константную область тяжелой цепи человеческого IgG1 заменяли константной областью тяжелой цепи мышиного IgG1, используя *XbaI* для субклонирования. Эта плазмида была обозначена H79V-D4.5 MIgG1.

Оба IgG1-варианта D4.5 тяжелой цепи, человеческий и мышиный, трансфицировали в 10^7 CHO-клеток, уже экспрессирующих легкую цепь k8, соответственно. Человеческий IgG1-вариант также трансфицировали в CHO-клетки, экспрессирующие легкую цепь k5.1. 100 мкг линеаризованной плазмидной ДНК использовали для трансфекции тяжелой цепи, соответственно.

Вариабельную область Fd-фрагмента тяжелой цепи D7.2 также субклонировали в pEF-DHFR, в результате чего получали плазмиду, экспрессирующую тяжелую цепь человеческого IgG1, как описано для VD4.5. Эту плазмиду экспрессии затем трансфицировали в CHO-клетки, уже экспрессирующие легкую цепь k8, как описано выше для H79V-D4.5 hu IgG1.

Трансфицированные клетки подвергали отбору на ADA- и DHFR-активность, как описано (Kaufmann, Methods Enzymol. 185 (1990), 537-566).

Полученные в результате клеточные линии обозначили как H79-huIgG1 (VD4.5huIgG1-k8), H79-MIgG1 (VD4.5MIgG1-k8), D7.2 (VD7.2huIgG1-k8) и HD70 (VD4.5huIgG1-k5.1).

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

Супернатанты трехдневных культур из четырех различных сливающихся 30 мл клеточных культур, каждая из которых продуцировала один из четырех анти-17-1А-антител (H79-huIgG1, H79-MIgG1, D7.2 и HD70) тестировали с помощью ELISA на связывание с иммобилизованным s17-1A. За исключением D7.2, проявляющим слабый ELISA-сигнал, три других антитела проявляли сильные сигналы, оцененные как представляющие связывающую аффинность на уровне мышиного антитела M79.

Продуцирование антител в большом количестве осуществляли во вращающихся бутылках, используя 500 мл среды.

Антитела H79-huIgG1, D7.2 и HD70 очищали путем использования аффинной колонки с белком А. Антитело H79-MIgG1 очищали аффинной хроматографией на антимышином IgG.

Чистоту и молекулярную массу очищенных антител определяли с помощью электрофореза в ДДС-ПААГ в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях (Фиг. 14 и 15).

Очистку белка и электрофорез в ДДС-ПААГ осуществляли согласно стандартным методикам.

Пример IV: Функциональный анализ антител H79 и HD70

IV.1. Тест на иммобилизованном антигене

Супернатант трехдневной культуры сливающейся 30 мл культуры трансфектантов человеческого и мышиного IgG1 соответственно, а также соответствующие препараты очищенного антитела тестировали на связывание на иммобилизованном s17-1A антигене с помощью ELISA и сравнивали с мышиным M79 анти-17-1A антителом.

Обнаружение осуществляли, как описано в II.

Антитела H79 (huIgG1- и MIgG1 вариант) и HD70 оценили как обладающие очень сходными связывающими аффинностями на уровне мышиного M79.

IV.2. Определение аффинностей

Измерение резонанса поверхностного плазмона проводили, используя аппарат BIACORE 2000 (Biacore AB, Freiburg, Freiburg, Germany). Иммобилизацию рекомбинантного растворимого 17-1A антигена в каждой

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

проточной ячейке и анализ взаимодействия осуществляли автоматическим способом в BIACORE 2000. Антиген ковалентно присоединяли к рецепторной стружке CM5 через первичные аминогруппы. После активации карбоксилированного декстранового матрикса CM5 рецепторной стружки однократной инъекцией 80 мкл 0,1 М N-гидроксисукцинимида/0,4 М N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида (NHS/EDC9) через все четыре проточные ячейки, проточные ячейки 1, 2, 3 и 4 успешно включались в проточный путь во время инъекции s17-1A-антигена (60 мкг/мл в 10 мМ ацетате натрия, pH 4,7). Различные периоды контакта 17-1A с активированной поверхностью приводили примерно к 2500 единицам ответа (ЕО) (ЕО9 в проточной ячейке 1, 14000 ЕО в проточной ячейке 2, 780 ЕО в проточной ячейке 3 и 290 ЕО в проточной ячейке 4). Избыточные активированные эфиры блокировали путем инъекции 85 мкл 1 М этаноламина pH 5 над всеми четырьмя проточными ячейками. Эксперименты по связыванию проводили при 25°С в буфере pH 7,4, содержащем 10 мМ ГЭПЭС, 150 мМ NaCl, 3 мМ ЭДТА и 0,005% сурфактанта P20. Кинетику связывания антител с иммобилизованным рекомбинантным 17-1A определяли путем инъецирования концентраций антитела, находящихся в пределах от 0,5 до 2 мкМ. Рецепторную стружку регенерировали между каждыми пробегами 100 мМ глицина, 500 мМ NaCl, 0,005% Твин pH 3. Константы скорости ассоциации и диссоциации, K_{on} и K_{off}, анализировали, используя BIA-оценку программного обеспечения Biacore AB, как описано (Karisson, (1991) J Immunol Meth 145: 229-240).

Провели две серии определений аффинности (1. Серия: M79, H79, D7.2, Panorex; 2. Серия: Panorex, HD70); мышиный Panorex включали также в серию 2 в качестве внутреннего контроля.

K_D для D7.2 оказалась ниже минимальной обнаружимой величины 10^{-4} М и поэтому не показана в табл. 2.

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

Табл. 2: K_D, K_{on} и K_{off} скоростей человеческого и соответствующего мышиного 17-1A антител

Антитело	K_{on} ($M^{-1}c^{-1}$)	K_{off} (c^{-1})	K_D (M)
1. серия:			
Мышиное M79	$6,0x10^4$	$4,5x10^{-2}$	$7,5x10^{-7}$
Человеческое H79	$2,1x10^4$	$7,2x10^{-3}$	$3,4x10^{-7}$
Мышиное Panorex	$1,1x10^5$	$2,2x10^{-2}$	$2,0x10^{-7}$
2. серия:			
Человеческое HD70	$0,9x10^5$	$3,5x10^{-2}$	$3,9x10^{-7}$
Мышиное Panorex	$1,0x10^5$	$2,7x10^{-2}$	$2,7x10^{-7}$

IV.3. Проточная цитометрия эукариотических клеток, экспрессирующих 17-1A

Очищенные препараты антител H79 (человеческий и мышиный вариант IgG1), HD70 (человеческий IgG1) и D7.2 (человеческий IgG1) тестировали с помощью FACS (клеточный сортер с возбуждением флуоресценции) анализа на экспрессирующих 17-1A клетках Kato, 17-1A-трансфицированных CHO-клетках и нетрансфицированных CHO-клетках. $2x10^5$ клеток инкубировали с очищенным H79-huIgG1, H79-MIgG1, HD70, D7.2, M79, Panorex, M74ch (= человеческий CHIgG1-человеческий C каппа-вариант мышиного анти-17-1A-антитела M74 (Göttlinger, Int. J. Cancer 38 (1986), 47-53)), мышиным IgG2a, мышиным IgG1 или человеческим IgG1 (20 мкг/мл антитела для каждого), соответственно. Обнаружение связанных с клеткой антител осуществляли мечеными ФИТЦ антителами против мышиного IgG или против человеческого IgG (20 мкг/мл каждого). Инкубацию проводили в течение 45-60 мин на льду.

H79-человеческий IgG1, H79-мышиный IgG1 и HD70 проявляли отчетливое связывание с 17-1A-позитивными клетками, так же как и M79 и Panorex. D7.2 проявлял слабое, но значимое связывание с 17-1A-позитивными клетками. Ни одно из антител не проявляло связывания с нетрансфицированными CHO-клетками, а IgG-контроли являлись негативными на клетках Kato, CHO/17-1A-клетках и нетрансфицированных CHO-клетках (см. Фиг. 16 и 17).

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

IV.4. Антителозависимая клеточная цитотоксичность (высвобождение ^{51}Cr).

Для высвобождения ^{51}Cr мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) в качестве эффекторных клеток выделяли из свежей лейкоцитарной пленки здоровых доноров. PBMC отделяли с помощью центрифугирования в градиенте плотности фиколла с последующей стадией центрифугирования 100xg. Нестимулированные PBMC ($5x10^5$ клеток) добавляли в объем, равный 100 мкл, среды RPMI 1640 с 10% фетальной сыворотки теленка (ФСТ) в каждую лунку плоскодонного титрационного микропланшета и инкубировали в течение ночи при 37°C. Клетки-мишени метили ^{51}Cr в течение 2 ч. Меченые клетки-мишени (100 мкл) и антитела в различных концентрациях (50 мкл) добавляли к PBMC и инкубировали в течение 18 ч при 37°C. Соответствующие несвязывающиеся изотипы использовали в качестве негативного контроля. Специфическийный лизис вычисляли как ((имп/мин, экспериментальное высвобождение) - (имп/мин, спонтанное высвобождение))/((имп/мин, максимальное высвобождение) - (имп/мин, спонтанное высвобождение)).

Оказалось, что в данном анализе высвобождения ^{51}Cr человеческие анти-17-1A антитела H79 и HD70 опосредуют высокую цитотоксичность для 17-1A-позитивной клеточной линии рака желудка KATO. Оказалось, что мышиные анти-17-1A антитела M79 и Panorex опосредуют клеточный киллинг на определенно более низком уровне (Фиг. 18).

IV.5. Тест на человеческой ткани

5 нм криосрезы карциномы ободочной кишки и нормальной ткани ободочной кишки соответственно инкубировали с мышиным IgG-вариантом антитела H79 (10 мкг/мл). В данном эксперименте использовали мышиный IgG1 вариант, чтобы избежать неспецифического окрашивания за счет присутствия человеческого иммуноглобулина в ткани человека. Обнаружение связанного H79MIgG1 осуществляли со сконъюгированным с пероксидазой поликлональным антителом против мышиного Ig и окрашивали карбазолом. Окрашивание для подсчета осуществляли гемалоном.

Результаты оценивали с помощью световой микроскопии.

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

Как H79MIgG1, так и мышиное моноклональное антитело M79 (позитивный контроль) демонстрировали сильное окрашивание на нормальной слизистой оболочке ободочной кишки (M79, Фиг. 19; H79-MIgG1, Фиг. 20) и более слабое окрашивание на клетках карциномы ободочной кишки (M79, Фиг. 21; H79-MIgG1, Фиг. 22). Напротив, контроли изотипа не демонстрировали окрашивания на тканях слизистой оболочки ободочной кишки и карциномы ободочной кишки (для M79; Фиг. 23 и 25 и для H79-MIgG1, Фиг. 24 и 26).

Пример V: Анализ эпитопов H79 и HD70

Чтобы сравнить 17-1A эпитопы, распознаваемые человеческими антителами H79 и HD70 и мышиным антителом-матрицей M79, синтезировали 13-мерные пептиды, производные от аминокислотной последовательности внеклеточного участка 17-1A-антигена, в виде отдельных пятен на Pep Spots Membrane. Эти пептиды покрывают полноразмерную внеклеточную аминокислотную последовательность 17-1A-антигена (как определено Szala, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 3542-3546) за счет того, что они имеют 11 перекрывающихся аминокислот с каждым из соседних пептидов, причем первая аминокислота пептида 1 идентична N-концевой аминокислоте 17-1A-антигена, а последняя аминокислота пептида 119 идентична C-концевой аминокислоте внеклеточного участка 17-1A-антигена (табл. 3).

Таблица 3: Синтезированные пептиды (номера соответствуют номерам пептидных пятен).

1. TATFAAAQEECVC	2. TFAAAQEECVCEN
3. AAAQEECVCENYK	4. AQEECVCENYKLA
5. EECVCENYKLAVN	6. CVCENYKLAVNCF
7. CENYKLAVNCFVN	8. NYKLAVNCFVNNN
9. KLAVNCFVNNNRQ	10. AVNCFVNNNRQCQ
11. NCFVNNNRQCQCT	12. FVNNNRQCQCTSV
13. NNNRQCQCTSVGA	14. NRQCQCTSVGAQN
15. QCQCTSVGAQNTV	16. QCTSVGAQNTVIC
17. TSVGAQNTVICSK	18. VGAQNTVICSKLA
19. AQNTVICSKLAAK	20. NTVICSKLAAKCL
21. VICSKLAAKCLVM	22. CSKLAAKCLVMKA
23. KLAAKCLVMKAEM	24. AAKCLVMKAEMNG
25. KCLVMKAEMNGSK	26. LVMKAEMNGSKLG
27. MKAEMNGSKLGRR	28. AEMNGSKLGRRAK

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

29. MNGSKLGRRAKPE
30. GSKLGRRAKPEGA
31. KLGRRAKPEGALQ
32. GRRAKPEGALQNN
33. RAKPEGALQNNDG
34. KPEGALQNNDGLY
35. EGALQNNDGLYDP
36. ALQNNDGLYDPDC
37. QNNDGLYDPDCDE
38. NDGLYDPDCDESG
39. GLYDPDCDESGLF
40. YDPDCDESGLFKA
41. PDCDESGLFKAKQ
42. CDESGLFKAKQCN
43. ESGLFKAKQCNGT
44. GLFKAKQCNGTST
45. FKAKQCNGTSTCW
46. AKQCNGTSTCWCV
47. QCNGTSTCWCVNT
48. NGTSTCWCVNTAG
49. TSTCWCVNTAGVR
50. TCWCVNTAGVRRT
51. WCVNTAGVRRTDK
52. VNTAGVRRTDKDT
53. TAGVRRTDKDTEI
54. GVRRTDKDTEITC
55. RRTDKDTEITCSE
56. TDKDTEITCSERV
57. KDTEITCSERVRT
58. TEITCSERVRTYW
59. ITCSERVRTYWII
60. CSERVRTYWIIIE
61. ERVRTYWIIIELK
62. VRTYWIIIELKHK
63. TYWIIIELKHKAR
64. WIIIELKHKAREK
65. IIELKHKAREKPY
66. ELKHKAREKPYDS
67. KHKAREKPYDSKS
68. KAREKPYDSKSLR
69. REKPYDSKSLRTA
70. KPYDSKSLRTALQ
71. YDSKSLRTALQKE
72. SKSLRTALQKEIT
73. SLRTALQKEITTR
74. RTALQKEITTRYQ
75. ALQKEITTRYQLD
76. QKEITTRYQLDPK
77. EITTRYQLDPKFI
78. TTRYQLDPKFITS
79. RYQLDPKFITSIL
80. QLDPKFITSILYE
81. DPKFITSILYENN
82. KFITSILYENNVI
83. ITSILYENNVITI
84. SILYENNVITIDL
85. LYENNVITIDLVQ
86. ENNVITIDLVQNS
87. NVITIDLVQNSSQ
88. ITIDLVQNSSQKT
89. IDLVQNSSQKTQN
90. LVQNSSQKTQNDV
91. QNSSQKTQNDVDI
92. SSQKTQNDVDIAD
93. QKTQNDVDIADVA
94. TQNDVDIADVAYY
95. NDVDIADVAYYFE
96. VDIADVAYYFEKD
97. IADVAYYFEKDVK
98. DVAYYFEKDVKGE
99. AYYFEKDVKGESL
100. YFEKDVKGESLFH
101. EKDVKGESLFHSK
102. DVKGESLFHSKKM
103. KGESLFHSKKMDL
104. ESLFHSKKMDLTV
105. LFHSKKMDLTVNG
106. HSKKMDLTVNGEQ
107. KKMDLTVNGEQLD
108. MDLTVNGEQLDLD
109. LTVNGEQLDLDPG
110. VNGEQLDLDPGQT
111. GEQLDLDPGQTLI
112. QLDLDPGQTLIYY
113. DLDPGQTLIYYVD
114. DPGQTLIYYVDEK
115. GQTLIYYVDEKAP
116. TLIYYVDEKAPEF
117. IYYVDEKAPEFSM
118. YVDEKAPEFSMQG
119. DEKAPEFSMQGLK

RU 2224766 C2

Pep Spot Membrane с синтезированными пептидами встряхивали в течение 10 минут в метаноле, а затем промывали три раза в течение 10 минут в ТСБ-буфере pH 8. Затем мембрану блокировали в блокирующем растворе на основе казеина, содержащем 0,05 г/мл сахарозы, в течение одного часа, а затем один раз встряхивали в ТСБ pH 8,0/0,05% Твин 20 (ТСБ-Т). Каждое из анти-17-1А антител инкубировали при комнатной температуре вместе с мембраной в течение трех часов в блокирующем растворе (1 мкг антитела/мл). После трех промывок в ТСБ-Т в течение 10 минут каждая, сконъюгированное с пероксидазой хрена (HRP) вторичное антитело (антимышиное/античеловеческое; 1 мкг/1 мл блокирующего раствора) инкубировали в течение двух часов при комнатной температуре вместе с мембраной. Затем мембрану промывали три раза в ТСБ-Т, каждая промывка в течение 10 минут. Обнаружение связанных антител осуществляли непосредственно на Pep Spots Membrane в случае М79 согласно протоколу производителя набора для хемилюминесценции (Boehringer). Проявленные пленки показаны на Фиг. 27. После трех промывок ТСБ-Т (10 мин) блот регенерировали в растворе, содержащем 50 мМ Трис-HCl pH 6,7, 100 мМ 2-меркаптоэтанола и 2% (масс./об.) ДДС в течение 30 мин при 50°С и последовательно использовали повторно для картирования эпитопов следующего антитела.

В связи с высокой степенью неспецифического связывания вторичного антитела против иммуноглобулина человека с полипептидными пятнами мембраны, в случае HD70 и H79 осуществляли электроперенос на вторичную мембрану для блоттинга с последующим обнаружением вторичным антителом против человека согласно Rüdiger, EMBO 16 (1997) 1501-1507. Инкубацию со вторичным антителом и обнаружение антитела на блотах осуществляли, как описано выше. Проявленные пленки представлены на Фиг. 27.

Как показано на данной фигуре (Фиг. 27), результаты картирования эпитопов на основе пептидов указывают на то, что эпитоп, распознаваемый мышиным антителом-матрицей М79, главным образом представленный пептидными пятнами 38 и 95, абсолютно отличается от эпитопа, распознаваемого человеческим антителом Н79, главным образом представленного пептидными пятнами 8, 11, 13, 14, 59-60, 77 и 79. Поскольку

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

человеческое антитело HD70 не проявляет никакого связывания вообще, можно далее предположить, что его эпитоп также отличается от эпитопа мышиного антитела M79 и что эпитопы человеческих антител H79 и HD70 также не являются идентичными.

Отсутствие обнаружимых сигналов связывания в случае человеческого антитела HD70 можно объяснить его возможным распознаванием либо конформационного, непрерывного или прерывистого, эпитопа, либо эпитопа, частично или полностью состоящего из углевода; в любом случае перекрывания таких эпитопов короткими пептидами с трудом можно ожидать.

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

(1) ОБЩАЯ ИНФОРМАЦИЯ

(i) ЗАЯВИТЕЛЬ:

(A) ИМЯ:: KUFER, Peter

(B) УЛИЦА: Graf-Konrad-Strasse 2

(C) ГОРОД: Moosburg

(E) СТРАНА: DE

(F) ПОЧТОВЫЙ ИНДЕКС (ZIP): 85368

(A) ИМЯ:: RAUM, Tobias

(B) УЛИЦА: Zentnerstrasse 20

(C) ГОРОД: Muenchen

(E) СТРАНА: DE

(F) ПОЧТОВЫЙ ИНДЕКС (ZIP): 80798

(ii) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ: Новый способ получения рецепторов античеловеческих антигенов и их применения

(iii) КОЛИЧЕСТВО ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ: 148

(iv) КОМПЬЮТЕРИЗИРОВАННАЯ ФОРМА:

(A) ТИП НОСИТЕЛЯ : Дискета

(B) КОМПЬЮТЕР: IBM PC совместимый

(C) ОПЕРАЦИОННАЯ СИСТЕМА: PC-DOS/MS-DOS

(D) ПРОГРАММНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPO)

(v) ДАННЫЕ ТЕКУЩЕЙ ЗАЯВКИ:

НОМЕР ЗАЯВКИ: WO PCT/EP98/02180

(vi) ДАННЫЕ ПРИОРИТЕТНОЙ ЗАЯВКИ:

(A) НОМЕР ЗАЯВКИ: EP 97 10 6109.8

(B) ДАТА ПОДАЧИ: 14 апреля 1997

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 1:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 22 пары оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: другая нуклеиновая кислота

(A) описание: / desc = «праймер»

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 1:

AGGTGCAGCT GCTCGAGTCT GG

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 2:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 24 пары оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: другая нуклеиновая кислота

(A) описание: /desc = «праймер»

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 2:

CAGAGTCACC TTGCTCGAGT CTGG

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 3:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 23 пары оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: другая нуклеиновая кислота

(A) описание: /desc = «праймер»

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 3:

CAGGTGCAGC TGCTCGAGTC GGG

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 4:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 23 пары оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: другая нуклеиновая кислота

(A) описание: /desc = «праймер»

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 4:

CAGGTGCAGC TACTCGAGTG GGG

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 5:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 23 пары оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: другая нуклеиновая кислота

(A) описание: /desc = «праймер»

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 5:

CAGGTACAGC TGCTCGAGTC AGG

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 6:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 30 пар оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: другая нуклеиновая кислота

(A) описание: /desc = «праймер»

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 6:

TGCCTTACTA GTCTCTGGCC AGCGGAAGAT

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 7:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 38 пар оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: другая нуклеиновая кислота

(A) описание: /desc = «праймер»

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 7:

GAGCCGCACG AGCCCGAGCT CCAGATGACC CAGTCTCC

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 8:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 40 пар оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: другая нуклеиновая кислота

(A) описание: /desc = «праймер»

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 8:

GAGCCGCACG AGCCCGAGCT CGTGATTGAC AGCAGTCTCC

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 9:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 39 пар оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: другая нуклеиновая кислота

(A) описание: /desc = «праймер»

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 9:

GAGCCGCACG AGCCCGAGCT CGTGATGACC TCAGTCTCC

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 10:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 38 пар оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: другая нуклеиновая кислота

(A) описание: /desc = «праймер»

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 10:

GAGCCGCACG AGCCCGAGCT CACACTCACG CAGTCTCC

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 11:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 38 пар оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: другая нуклеиновая кислота

(A) описание: /desc = «праймер»

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 11:

GAGCCGCACG AGCCCGAGCT CGTGCTGACT CAGTCTCC

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 12:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 58 пар оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: другая нуклеиновая кислота

(A) описание: /desc = «праймер»

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 12:

GCGCCGTCTA GAATTAACAC TCTCCCCTGT TGAAGCTCTT TGTGACGGGC GAACTCAG

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 13:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 24 пары оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: другая нуклеиновая кислота

(A) описание: /desc = «праймер»

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 13:

AATTTTGAGC TCACTCAGCC CCAC

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 14:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 27 пар оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: другая нуклеиновая кислота

(A) описание: /desc = «праймер»

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 14:

TCTGCCGAGC TCCAGCCTGC CTCCGTG

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 15:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 27 пар оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: другая нуклеиновая кислота

(A) описание: /desc = «праймер»

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 15:

TCTGTGGAGC TCCAGCCGCC CTCAGTG

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 16:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 33 пары оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: другая нуклеиновая кислота

(A) описание: /desc = «праймер»

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 16:

TCTGAAGAGC TCCAGGACCC TGTTGTGTCT GTG

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 17:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 24 пары оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: другая нуклеиновая кислота

(A) описание: /desc = «праймер»

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 17:

CAGTCTGAGC TCACGCAGCC GCCC

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 18:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 24 пары оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: другая нуклеиновая кислота

(A) описание: /desc = «праймер»

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 18:

CAGACTGAGC TCACTCAGGA GCCC

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 19:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 24 пары оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: другая нуклеиновая кислота

(A) описание: /desc = «праймер»

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 19:

CAGGTTGAGC TCACTCAACC GCCC

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 20:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 27 пар оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: другая нуклеиновая кислота

(A) описание: /desc = «праймер»

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 20:

CAGGCTGAGC TCACTCAGCC GTCTTCC

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 21:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 30 пар оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: другая нуклеиновая кислота

(A) описание: /desc = «праймер»

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 21:

CGCCGTCTAG AATTATGAAC ATTCTGTAGG

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 22:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 22:

```
Thr Ala Thr Phe Ala Ala Ala Gln Glu Glu Cys Val Cys
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 23:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 23:

```
Thr Phe Ala Ala Ala Gln Glu Glu Cys Val Cys Glu Asn
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 24:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 24:

```
Ala Ala Ala Gln Glu Glu Cys Val Cys Glu Asn Tyr Lys
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 25:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 25:

```
Ala Gln Glu Glu Cys Val Cys Glu Asn Tyr Lys Leu Ala
1               5                  10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 26:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 26:

```
Glu Glu Cys Val Cys Glu Asn Tyr Lys Leu Ala Val Asn
1               5                  10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 27:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 27:

```
Cys Val Cys Glu Asn Tyr Lys Leu Ala Val Asn Cys Phe
1               5                  10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 28:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 28:

```
Cys Glu Asn Tyr Lys Leu Ala Val Asn Cys Phe Val Asn
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 29:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 29:

```
Asn Tyr Lys Leu Ala Val Asn Cys Phe Val Asn Asn Asn
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 30:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 30:

```
Lys Leu Ala Val Asn Cys Phe Val Asn Asn Asn Arg Gln
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 31:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 31:

```
Ala Val Asn Cys Phe Val Asn Asn Asn Arg Gln Cys Gln
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 32:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 32:

```
Asn Cys Phe Val Asn Asn Asn Arg Gln Cys Gln Cys Thr
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 33:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 33:

```
Phe Val Asn Asn Asn Arg Gln Cys Gln Cys Thr Ser Val
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 34:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 34:

```
Asn Asn Asn Arg Gln Cys Gln Cys Thr Ser Val Gly Ala
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 35:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 35:

```
Asn Arg Gln Cys Gln Cys Thr Ser Val Gly Ala Gln Asn
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 36:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 36:

```
Gln Cys Gln Cys Thr Ser Val Gly Ala Gln Asn Thr Val
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 37:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 43:

```
Cys Ser Lys Leu Ala Ala Lys Cys Leu Val Met Lys Ala
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 44:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 44:

```
Lys Leu Ala Ala Lys Cys Leu Val Met Lys Ala Glu Met
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 45:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 45:

```
Ala Ala Lys Cys Leu Val Met Lys Ala Glu Met Asn Gly
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 46:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 46:

```
Lys Cys Leu Val Met Lys Ala Glu Met Asn Gly Ser Lys
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 47:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 47:

```
Leu Val Met Lys Ala Glu Met Asn Gly Ser Lys Leu Gly
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 48:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 48:

```
Met Lys Ala Glu Met Asn Gly Ser Lys Leu Gly Arg Arg
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 49:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 52:

```
Lys Leu Gly Arg Arg Ala Lys Pro Glu Gly Ala Leu Gln
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 53:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 53:

```
Gly Arg Arg Ala Lys Pro Glu Gly Ala Leu Gln Asn Asn
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 54:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 54:

```
Arg Ala Lys Pro Glu Gly Ala Leu Gln Asn Asn Asp Gly
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 55:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 61:

```
Tyr Asp Pro Asp Cys Asp Glu Ser Gly Leu Phe Lys Ala
1               5                  10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 62:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 62:

```
Pro Asp Cys Asp Glu Ser Gly Leu Phe Lys Ala Lys Gln
1               5                  10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 63:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 63:

```
Cys Asp Glu Ser Gly Leu Phe Lys Ala Lys Gln Cys Asn
1               5                  10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 64:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 64:

```
Glu Ser Gly Leu Phe Lys Ala Lys Gln Cys Asn Gly Thr
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 65:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 65:

```
Gly Leu Phe Lys Ala Lys Gln Cys Asn Gly Thr Ser Thr
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 66:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 66:

```
Phe Lys Ala Lys Gln Cys Asn Gly Thr Ser Thr Cys Trp
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 67:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 67:

```
Ala Lys Gln Cys Asn Gly Thr Ser Thr Cys Trp Cys Val
1               5                  10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 68:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 68:

```
Gln Cys Asn Gly Thr Ser Thr Cys Trp Cys Val Asn Thr
1               5                  10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 69:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 69:

```
Asn Gly Thr Ser Thr Cys Trp Cys Val Asn Thr Ala Gly
1               5                  10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 70:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 70:

```
Thr Ser Thr Cys Trp Cys Val Asn Thr Ala Gly Val Arg
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 71:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 71:

```
Thr Cys Trp Cys Val Asn Thr Ala Gly Val Arg Arg Thr
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 72:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 72:

```
Trp Cys Val Asn Thr Ala Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 73:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 73:

```
Val Asn Thr Ala Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Asp Thr
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 74:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 74:

```
Thr Ala Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Asp Thr Glu Ile
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 75:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 75:

```
Gly Val Arg Arg Thr Asp Lys Asp Thr Glu Ile Thr Cys
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 76:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 76:

```
Arg Arg Thr Asp Lys Asp Thr Glu Ile Thr Cys Ser Glu
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 77:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 77:

```
Thr Asp Lys Asp Thr Glu Ile Thr Cys Ser Glu Arg Val
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 78:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 78:

```
Lys Asp Thr Glu Ile Thr Cys Ser Glu Arg Val Arg Thr
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 79:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 79:

```
Thr Glu Ile Thr Cys Ser Glu Arg Val Arg Thr Tyr Trp
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 80:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 80:

```
Ile Thr Cys Ser Glu Arg Val Arg Thr Tyr Trp Ile Ile
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 81:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 81:

```
Cys Ser Glu Arg Val Arg Thr Tyr Trp Ile Ile Ile Glu
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 82:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 82:

```
Glu Arg Val Arg Thr Tyr Trp Ile Ile Ile Glu Leu Lys
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 83:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 83:

```
Val Arg Thr Tyr Trp Ile Ile Ile Glu Leu Lys His Lys
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 84:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 84:

```
Thr Tyr Trp Ile Ile Ile Glu Leu Lys His Lys Ala Arg
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 85:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 85:

```
Trp Ile Ile Ile Glu Leu Lys His Lys Ala Arg Glu Lys
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 86:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 86:

```
Ile Ile Glu Leu Lys His Lys Ala Arg Glu Lys Pro Tyr
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 87:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 87:

```
Glu Leu Lys His Lys Ala Arg Glu Lys Pro Tyr Asp Ser
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 88:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 88:

```
Lys His Lys Ala Arg Glu Lys Pro Tyr Asp Ser Lys Ser
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 89:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 89:

```
Lys Ala Arg Glu Lys Pro Tyr Asp Ser Lys Ser Leu Arg
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 90:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 90:

```
Arg Glu Lys Pro Tyr Asp Ser Lys Ser Leu Arg Thr Ala
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 91:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 91:

```
Lys Pro Tyr Asp Ser Lys Ser Leu Arg Thr Ala Leu Gln
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 92:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 92:

```
Tyr Asp Ser Lys Ser Leu Arg Thr Ala Leu Gln Lys Glu
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 93:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 93:

```
Ser Lys Ser Leu Arg Thr Ala Leu Gln Lys Glu Ile Thr
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 94:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 94:

```
Ser Leu Arg Thr Ala Leu Gln Lys Glu Ile Thr Thr Arg
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 95:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 95:

```
Arg Thr Ala Leu Gln Lys Glu Ile Thr Thr Arg Tyr Gln
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 96:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 96:

```
Ala Leu Gln Lys Glu Ile Thr Thr Arg Tyr Gln Leu Asp
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 97:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 97:

```
Gln Lys Glu Ile Thr Thr Arg Tyr Gln Leu Asp Pro Lys
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 98:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 98:

```
Glu Ile Thr Thr Arg Tyr Gln Leu Asp Pro Lys Phe Ile
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 99:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 99:

```
Thr Thr Arg Tyr Gln Leu Asp Pro Lys Phe Ile Thr Ser
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 100:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 100:

```
Arg Tyr Gln Leu Asp Pro Lys Phe Ile Thr Ser Ile Leu
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 101:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 101:

```
Gln Leu Asp Pro Lys Phe Ile Thr Ser Ile Leu Tyr Glu
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 102:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 102:

```
Asp Pro Lys Phe Ile Thr Ser Ile Leu Tyr Glu Asn Asn
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 103:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 103:

```
Lys Phe Ile Thr Ser Ile Leu Tyr Glu Asn Asn Val Ile
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 104:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 104:

```
Ile Thr Ser Ile Leu Tyr Glu Asn Asn Val Ile Thr Ile
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 105:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 105:

```
Ser Ile Leu Tyr Glu Asn Asn Val Ile Thr Ile Asp Leu
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 106:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 106:

```
Leu Tyr Glu Asn Asn Val Ile Thr Ile Asp Leu Val Gln
1               5                  10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 107:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 107:

```
Glu Asn Asn Val Ile Thr Ile Asp Leu Val Gln Asn Ser
1               5                  10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 108:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 108:

```
Asn Val Ile Thr Ile Asp Leu Val Gln Asn Ser Ser Gln
1               5                  10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 109:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 109:

```
Ile Thr Ile Asp Leu Val Gln Asn Ser Ser Gln Lys Thr
1               5                  10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 110:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 110:

```
Ile Asp Leu Val Gln Asn Ser Ser Gln Lys Thr Gln Asn
1               5                  10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 111:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 111:

```
Leu Val Gln Asn Ser Ser Gln Lys Thr Gln Asn Asp Val
1               5                  10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 112:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 112:

```
Gln Asn Ser Ser Gln Lys Thr Gln Asn Asp Val Asp Ile
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 113:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 113:

```
Ser Ser Gln Lys Thr Gln Asn Asp Val Asp Ile Ala Asp
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 114:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 114:

```
Gln Lys Thr Gln Asn Asp Val Asp Ile Ala Asp Val Ala
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 115:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 115:

```
Thr Gln Asn Asp Val Asp Ile Ala Asp Val Ala Tyr Tyr
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 116:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 116:

```
Asn Asp Val Asp Ile Ala Asp Val Ala Tyr Tyr Phe Glu
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 117:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 117:

```
Val Asp Ile Ala Asp Val Ala Tyr Tyr Phe Glu Lys Asp
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 118:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 118:

```
Ile Ala Asp Val Ala Tyr Tyr Phe Glu Lys Asp Val Lys
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 119:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 119:

```
Asp Val Ala Tyr Tyr Phe Glu Lys Asp Val Lys Gly Glu
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 120:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 120:

```
Ala Tyr Tyr Phe Glu Lys Asp Val Lys Gly Glu Ser Leu
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 121:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 121:

```
Tyr Phe Glu Lys Asp Val Lys Gly Glu Ser Leu Phe His
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 122:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 122:

```
Glu Lys Asp Val Lys Gly Glu Ser Leu Phe His Ser Lys
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 123:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 123:

```
Asp Val Lys Gly Glu Ser Leu Phe His Ser Lys Lys Met
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 124:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 124:

```
Lys Gly Glu Ser Leu Phe His Ser Lys Lys Met Asp Leu
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 125:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 125:

```
Glu Ser Leu Phe His Ser Lys Lys Met Asp Leu Thr Val
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 126:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 126:

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

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 127:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 127:

```
His Ser Lys Lys Met Asp Leu Thr Val Asn Gly Glu Gln
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 128:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 128:

```
Lys Lys Met Asp Leu Thr Val Asn Gly Glu Gln Leu Asp
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 129:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 129:

```
Met Asp Leu Thr Val Asn Gly Glu Gln Leu Asp Leu Asp
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 130:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 130:

```
Leu Thr Val Asn Gly Glu Gln Leu Asp Leu Asp Pro Gly
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 131:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 131:

```
Val Asn Gly Glu Gln Leu Asp Leu Asp Pro Gly Gln Thr
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 132:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 132:

```
Gly Glu Gln Leu Asp Leu Asp Pro Gly Gln Thr Leu Ile
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 133:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 133:

```
Gln Leu Asp Leu Asp Pro Gly Gln Thr Leu Ile Tyr Tyr
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 134:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 134:

```
Asp Leu Asp Pro Gly Gln Thr Leu Ile Tyr Tyr Val Asp
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 135:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 135:

```
Asp Pro Gly Gln Thr Leu Ile Tyr Tyr Val Asp Glu Lys
1               5                   10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 136:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 136:

```
Gly Gln Thr Leu Ile Tyr Tyr Val Asp Glu Lys Ala Pro
1               5                  10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 137:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 137:

```
Thr Leu Ile Tyr Tyr Val Asp Glu Lys Ala Pro Glu Phe
1               5                  10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 138:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 138:

```
Ile Tyr Tyr Val Asp Glu Lys Ala Pro Glu Phe Ser Met
1               5                  10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 139:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 139:

```
Tyr Val Asp Glu Lys Ala Pro Glu Phe Ser Met Gln Gly
1               5                  10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 140:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 13 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(C) количество нитей: однонитевая

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: пептид

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 140:

```
Asp Glu Lys Ala Pro Glu Phe Ser Met Gln Gly Leu Lys
1               5                  10
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 141:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 321 пара оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

(C) количество нитей: двунитевая

(D) топология: линейная

(ix) признак:

(A) название/ключ: CDS

(B) локализация: 1...321

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 141:

```
GAG CTC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCT TCT GTG GGA      48
Glu Leu Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1               5                  10                  15

GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGT CGG ACA AGT CAG AGC ATT AGC AGC TAT      96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
             20                  25                  30
```

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

```
TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGA CAG CCT CCT AAG CTG CTC ATT      144
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
         35                  40                  45

TAC TGG GCA TCT ACC CGG GAA TCC GGG GTC CCT GAC CGA TTC AGT GGC      192
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
     50                  55                  60

AGC GGG TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTA CAA CCT      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65                  70                  75                  80

GAA GAT TCT GCA ACT TAC TAC TGT CAG CAG AGT TAC GAC ATC CCG TAC      288
Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Asp Ile Pro Tyr
                 85                  90                  95

ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA                         321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 142:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 107 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: белок

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 142:

```
Glu Leu Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 143:

(i) характеристики последовательности:

RU 2224766 C2

(A) длина: 414 пар оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

(C) количество нитей: двунитевая

(D) топология: линейная

(ix) признак:

(A) название/ключ: CDS

(B) локализация: 1...414

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 143:

```
GAG GTG CAG CTG CTC GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG      48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
        110                 115                 120

TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT      96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
    125                 130                 135

GGC ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG     144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
140                 145                 150                 155

GCA GTT ATA TCA TAT GAT GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG     192
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
                160                 165                 170

AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT     240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
            175                 180                 185

CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT     288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
        190                 195                 200

GCG AAA GAT ATG GGG TGG GGC AGT GGC TGG AGA CCC TAC TAC TAC TAC     336
Ala Lys Asp Met Gly Trp Gly Ser Gly Trp Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr
    205                 210                 215

GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA GCA     384
Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
220                 225                 230                 235

CCC ACC AAG GCT CCG GAT GTG TTC CCT CTA                             414
Pro Thr Lys Ala Pro Asp Val Phe Pro Leu
                240                 245
```

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 144:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 138 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: белок

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 144:

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
  1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
             20                  25                  30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
     50                  55                  60

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

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

Ala Lys Asp Met Gly Trp Gly Ser Gly Trp Arg Pro Tyr Tyr Tyr Tyr
            100                 105                 110

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

Pro Thr Lys Ala Pro Asp Val Phe Pro Leu
    130                 135
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 145:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 372 пары оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

(C) количество нитей: двунитевая

(D) топология: линейная

(ix) признак:

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(A) название/ключ: CDS

(B) локализация: 1...372

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 145:

```
GAG GTG CAG CTG CTC GAG TCT GGG GGA GTC GTG GTA CAG CCT GGG GGG      48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Val Val Val Gln Pro Gly Gly
    140                 145                 150

TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT GAT GAT TAT      96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
155                 160                 165                 170

GCC ATG CAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG     144
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
                175                 180                 185

GCA GTT ATA TCA TAT GAT GGA AGT AAT AAA TAC TAT GCA GAC TCC GTG     192
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
            190                 195                 200

AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT     240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
        205                 210                 215

CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT     288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
    220                 225                 230

GCG AAA AAG GAA GGC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC     336
Ala Lys Lys Glu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
235                 240                 245                 250

TCA GCA CCC ACC AAG GCT CCG GAT GTG TTC CCT CTA
Ser Ala Pro Thr Lys Ala Pro Asp Val Phe Pro Leu
                255                 260
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 146:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 124 аминокислоты

(B) тип: аминокислота

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: белок

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 146:

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Val Val Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
            20                  25                  30

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60

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

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

Ala Lys Lys Glu Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
            100                 105                 110

Ser Ala Pro Thr Lys Ala Pro Asp Val Phe Pro Leu
        115                 120
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 147:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 321 пара оснований

(B) тип: нуклеиновая кислота

(C) количество нитей: двунитевая

(D) топология: линейная

(ix) признак:

(A) название/ключ: CDS

(B) локализация: 1...321

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 147:

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

```
GAG CTC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA          48
Glu Leu Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
125                 130                 135                 140

GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT AGC AGC TAT          96
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
                145                 150                 155

 TTA AAT TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGA CAG CCT CCT AAG CTG CTC ATT         144
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
            160                 165                 170

 TAC TGG GCA TCT ACC CGG GAA TCC GGG GTC CCT GAC CGA TTC AGC GGC         192
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
        175                 180                 185

 AGT GAA TCT GGG ACA AAT TAC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT         240
 Ser Glu Ser Gly Thr Asn Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
    190                 195                 200

 GAA GAT TTT GCT ACT TAC TTT TGT CAA CAG TCT GAC AGT TTG CCG ATC         288
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asp Ser Leu Pro Ile
 205                 210                 215                 220

 ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAC ATT CAA                             321
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Asp Ile Gln
                225                 230
```

(2) ИНФОРМАЦИЯ О SEQ ID NO: 148:

(i) характеристики последовательности:

(A) длина: 107 аминокислот

(B) тип: аминокислота

(D) топология: линейная

(ii) тип молекулы: белок

(xi) описание последовательности: SEQ ID NO: 148:

```
Glu Leu Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1               5                  10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

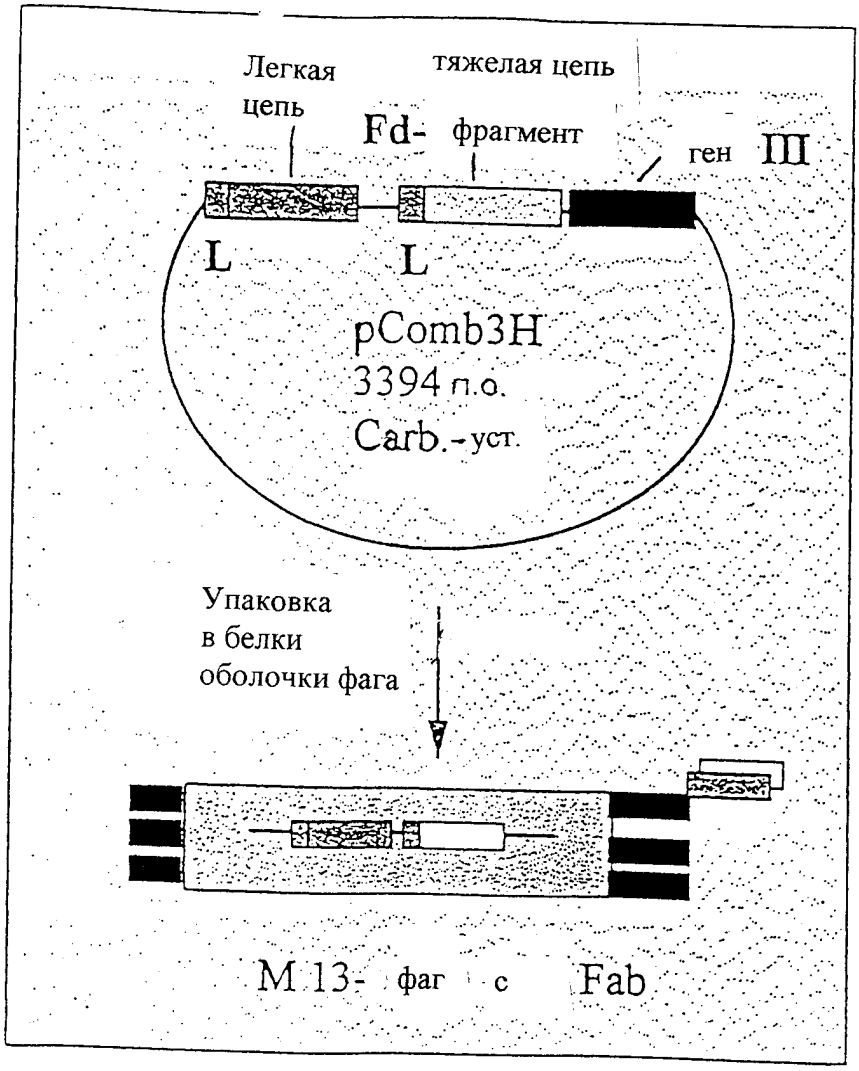
Ser Glu Ser Gly Thr Asn Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asp Ser Leu Pro Ile
                85                  90                  95

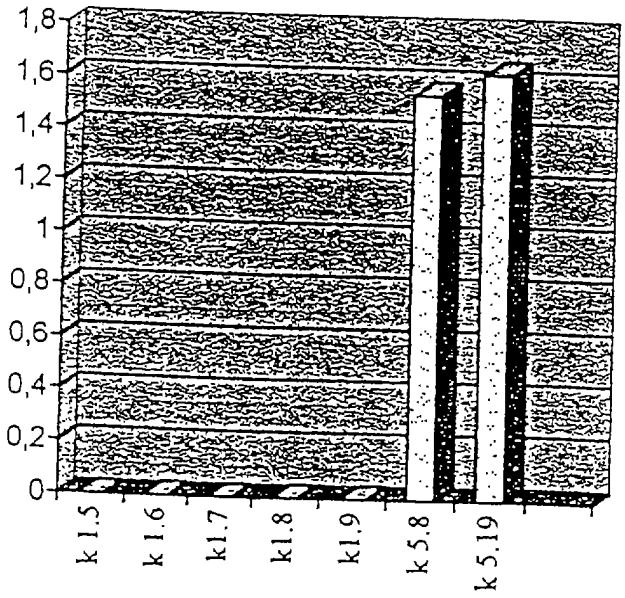
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Asp Ile Gln
            100                 105
```


RU 2224766 C2

RU 2224766 C2



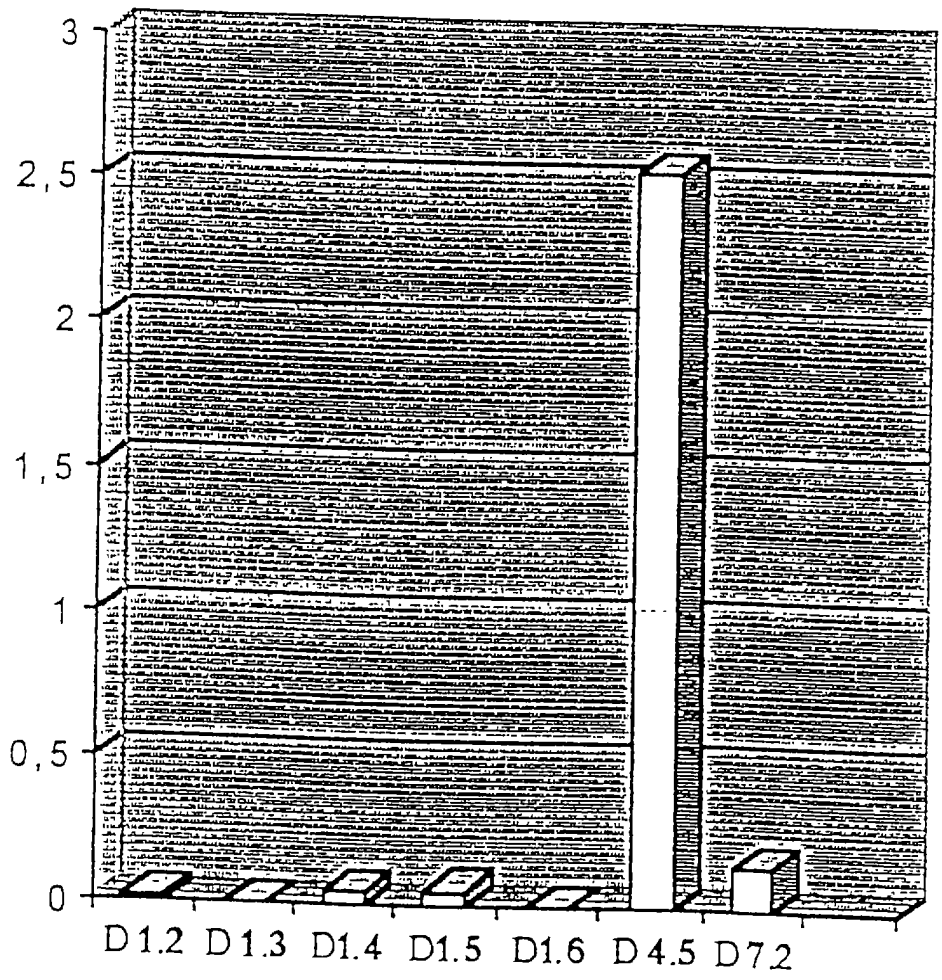
Фиг. 2



Фиг. 3

RU 2224766 C2

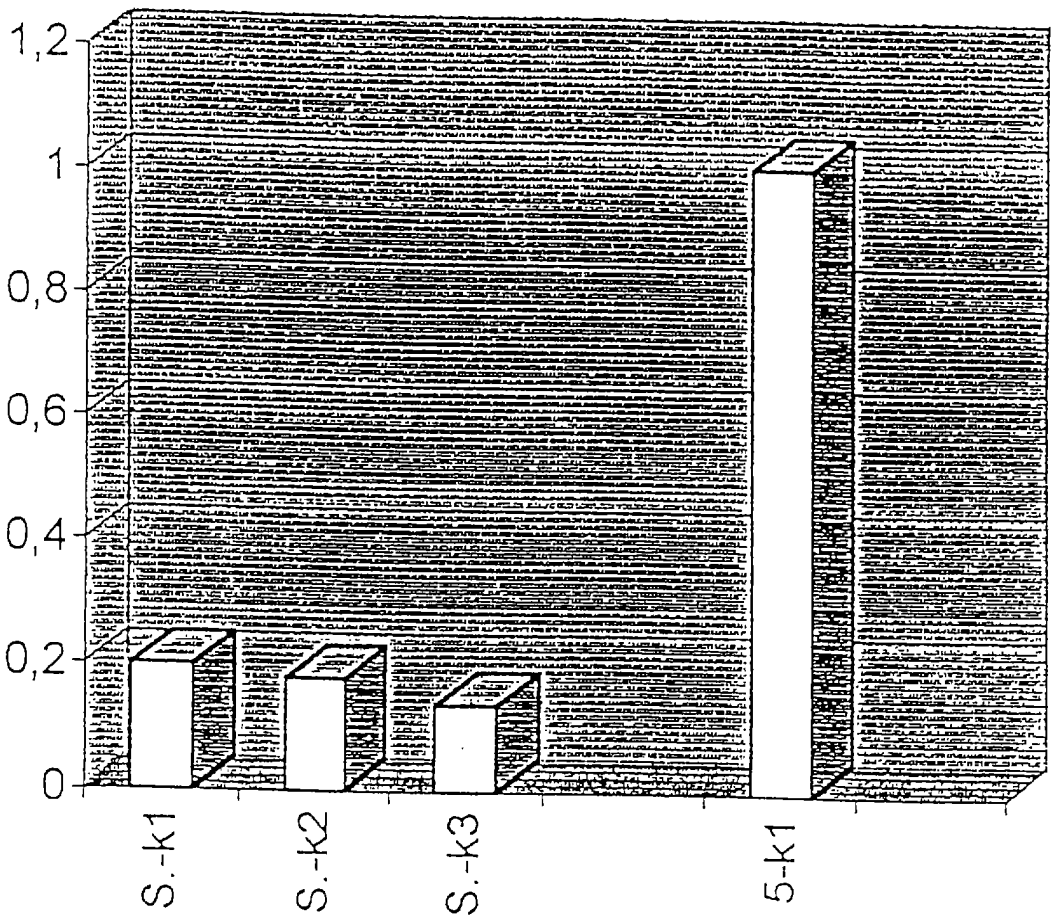
RU 2224766 C2



Фиг. 4

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2



Фиг. 5

```
5'  GAG CTC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCT TCT GTG GGA GAC AGA
---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
 E    L    Q    M    T    Q    S    P    S    S    L    S    A    S    V    G    D    R

GTC ACC ATC ACT TGT CGG ACA AGT CAG AGC ATT AGC AGC TAT TTA AAT TGG TAT
---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
 V    T    I    T    C    R    T    S    Q    S    I    S    S    Y    L    N    W    Y

CAG CAG AAA CCA GGA CAG CCT CCT AAG CTG CTC ATT TAC TGG GCA TCT ACC CGG
---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
 Q    Q    K    P    G    Q    P    P    K    L    L    I    Y    W    A    S    T    R

GAA TCC GGG GTC CCT GAC CGA TTC AGT GGC AGC GGG TCT GGG ACA GAT TTC ACT
---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
 E    S    G    V    P    D    R    F    S    G    S    G    S    G    T    D    F    T

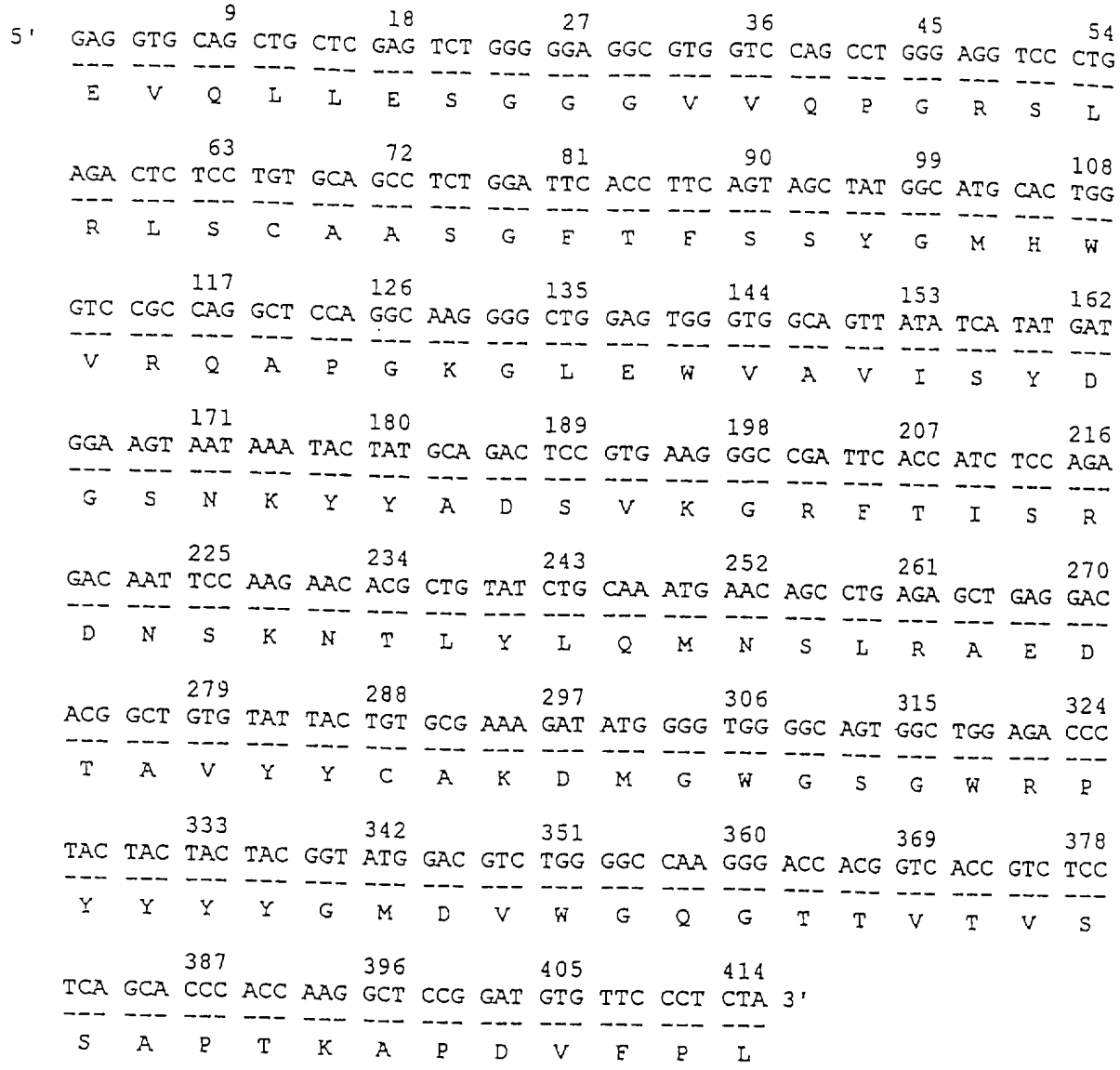
CTC ACC ATC AGC AGT CTA CAA CCT GAA GAT TCT GCA ACT TAC TAC TGT CAG CAG
---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
 L    T    I    S    S    L    Q    P    E    D    S    A    T    Y    Y    C    Q    Q

AGT TAC GAC ATC CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA 3'
---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
 S    Y    D    I    P    Y    T    F    G    Q    G    T    K    L    E    I    K
```

Фиг. 6

RU 2224766 C2

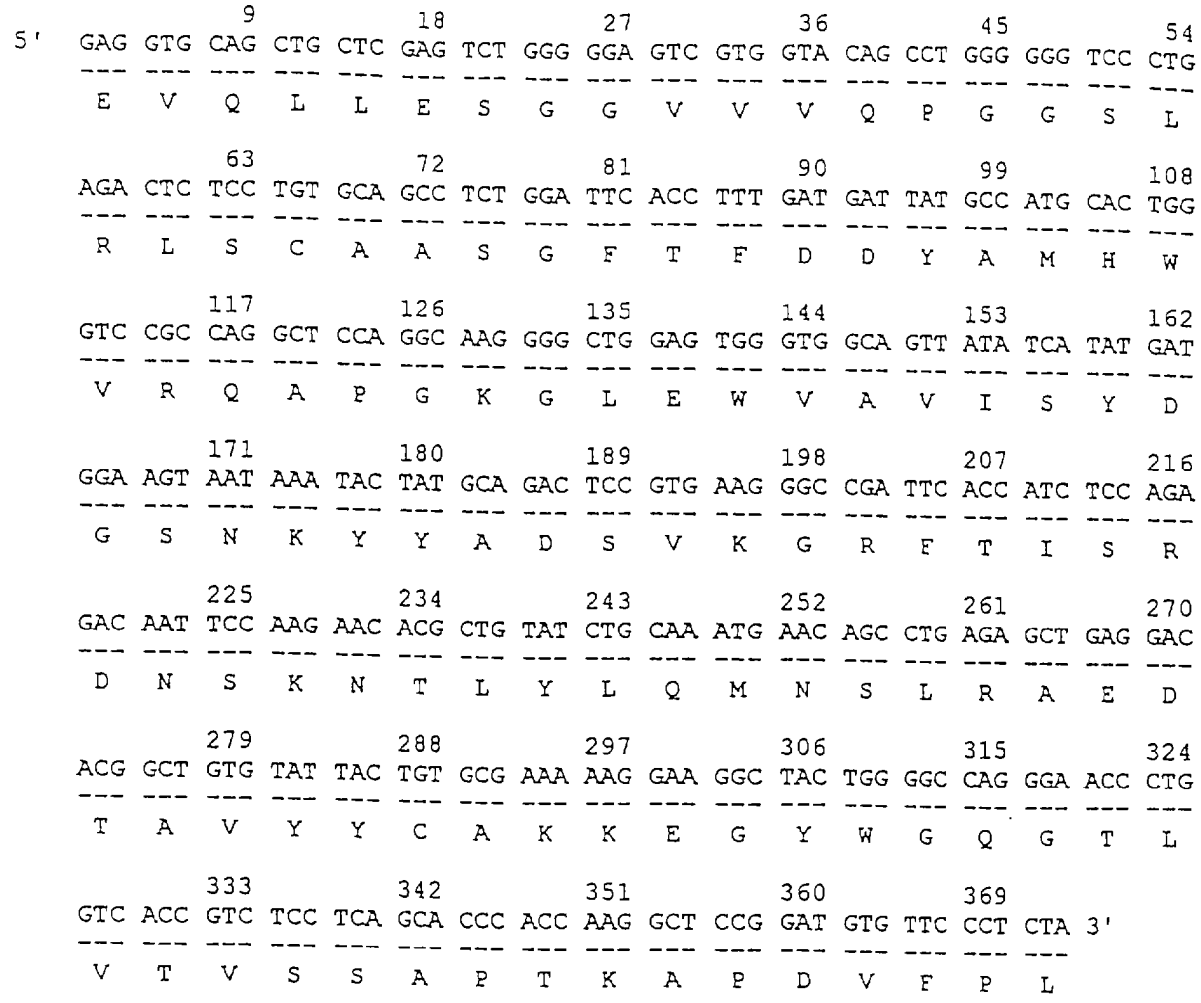
RU 2224766 C2



Фиг. 7

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2



Фиг. 8

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

```
                9                  18                  27                  36                  45                  54
5'  GAG CTC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     E   L   Q   M   T   Q   S   P   S   S   L   S   A   S   V   G   D   R

               63                  72                  81                  90                  99                 108
    GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT AGC AGC TAT TTA AAT TGG TAT
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     V   T   I   T   C   R   A   S   Q   S   I   S   S   Y   L   N   W   Y

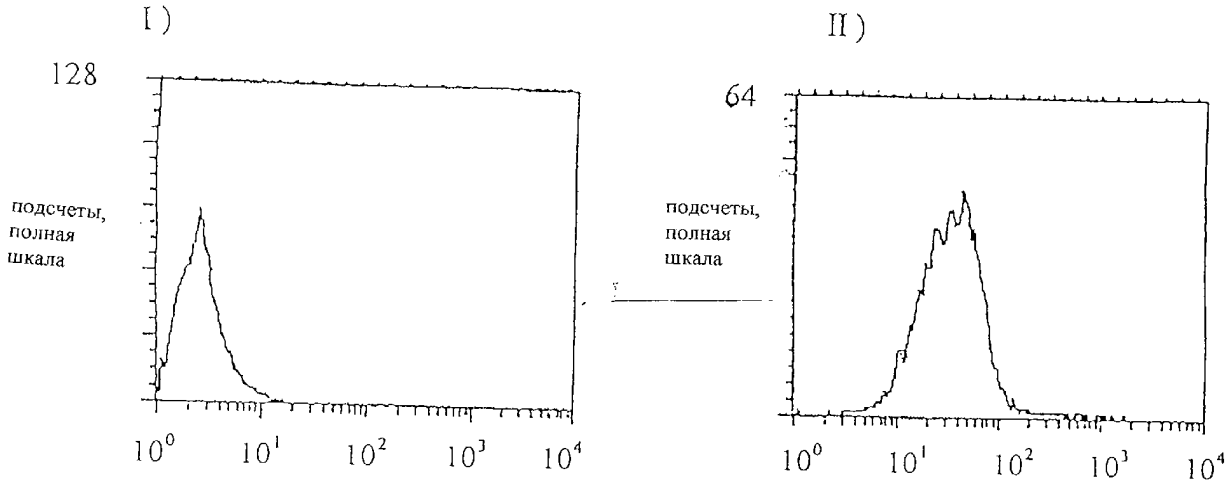
               117                 126                 135                 144                 153                 162
    CAG CAG AAA CCA GGA CAG CCT CCT AAG CTG CTC ATT TAC TGG GCA TCT ACC CGG
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     Q   Q   K   P   G   Q   P   P   K   L   L   I   Y   W   A   S   T   R

               171                 180                 189                 198                 207                 216
    GAA TCC GGG GTC CCT GAC CGA TTC AGC GGC AGT GAA TCT GGG ACA AAT TAC ACT
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     E   S   G   V   P   D   R   F   S   G   S   E   S   G   T   N   Y   T

               225                 234                 243                 252                 261                 270
    CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCT ACT TAC TTT TGT CAA CAG
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     L   T   I   S   S   L   Q   P   E   D   F   A   T   Y   F   C   Q   Q

               279                 288                 297                 306                 315                 324
    TCT GAC AGT TTG CCG ATC ACC TTC GGC CAA GGG ACA CGA CTG GAC ATT CAA 3'
    --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- --- ---
     S   D   S   L   P   I   T   F   G   Q   G   T   R   L   D   I   Q
```

Фиг. 9

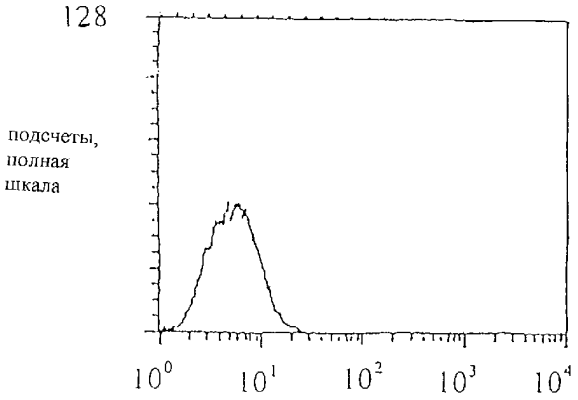


Фиг. 10

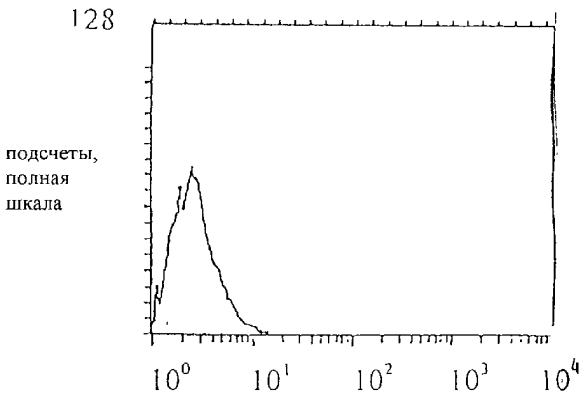
RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

III)

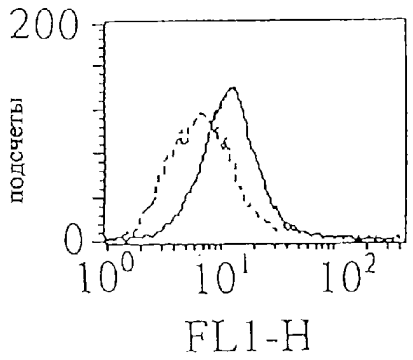


IV)

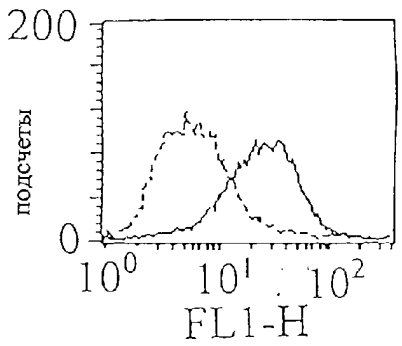


Фиг. 10(продолжение)

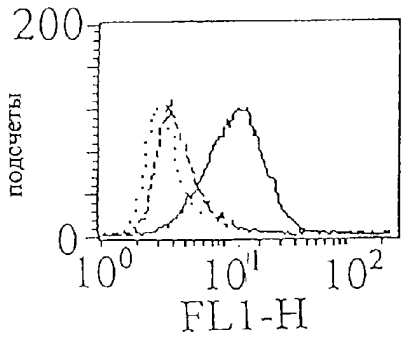
I)



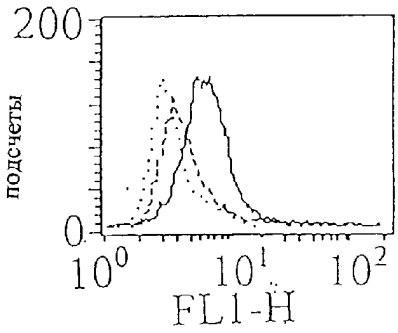
II)



III)



IV)

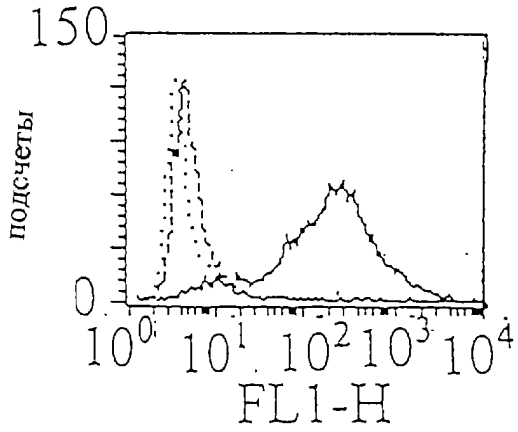


Фиг. 11

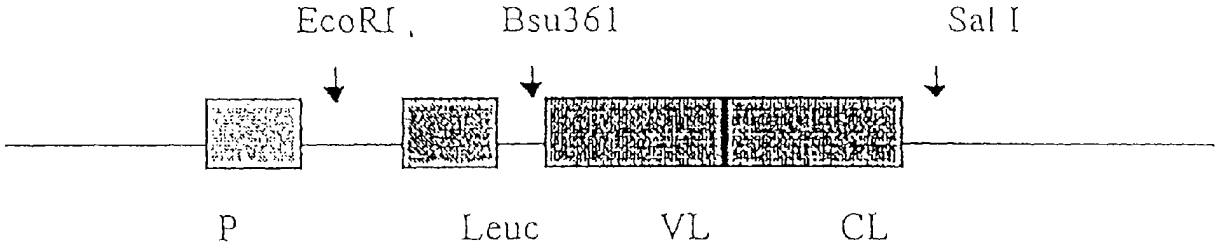
RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

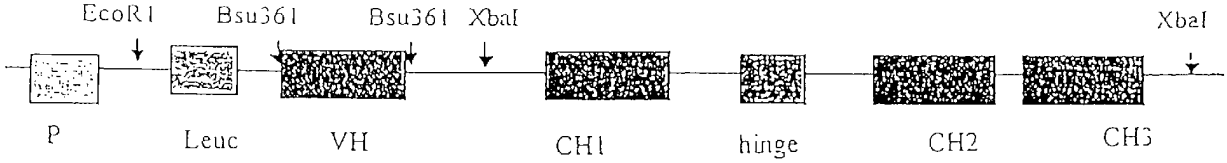
V)



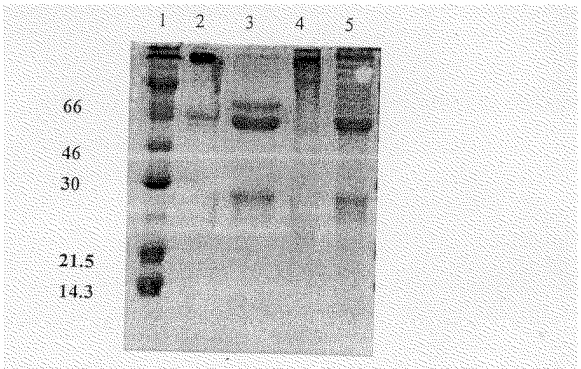
Фиг. 11(продолжение)



Фиг. 12



Фиг. 13

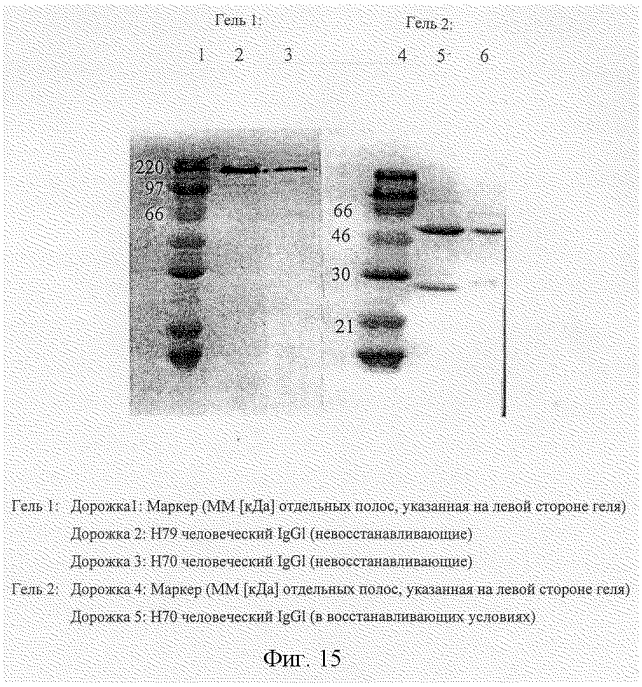


Дорожка1: Маркер (ММ [кДа] отдельных полос, указанная на левой стороне геля)
Дорожка 2: H79 человеческий IgG1 (невосстанавливающие)
Дорожка 3: H79 человеческий IgG1 (в восстанавливающих условиях)
Дорожка 4: H79 мышиный IgG1 (невосстанавливающие)
Дорожка 5: H79 мышиный IgG1 (в восстанавливающих условиях)

Фиг. 14

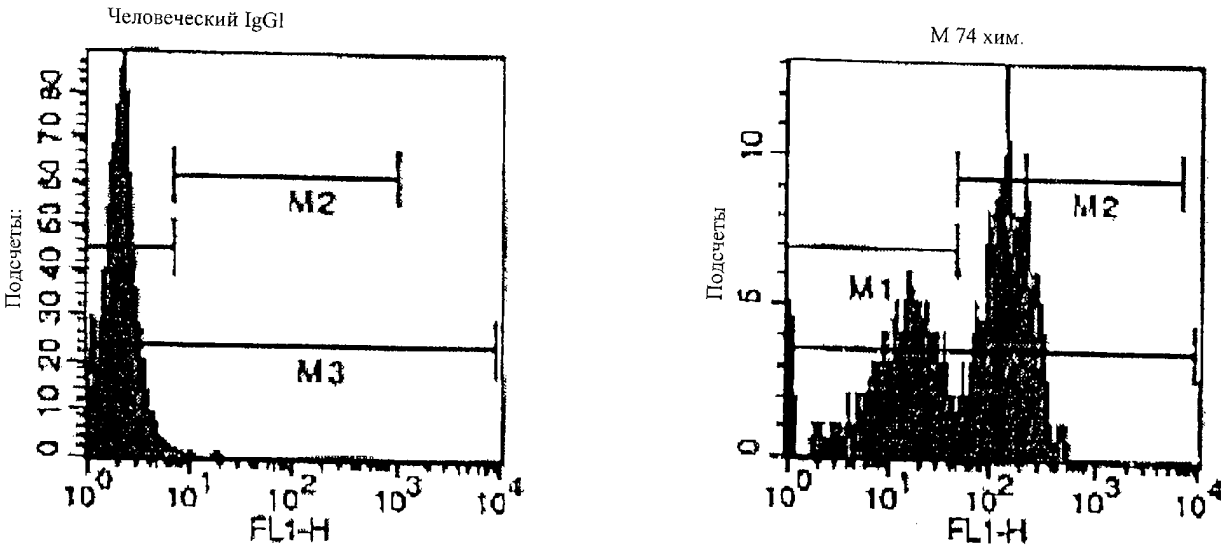
RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

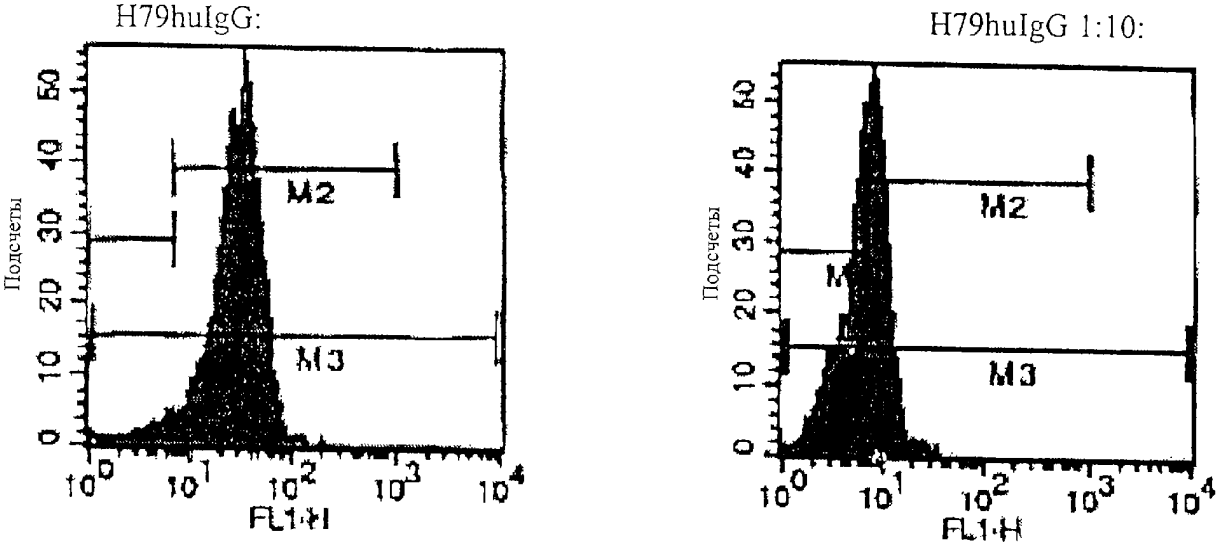


Гель 1: Дорожка1: Маркер (ММ [кДа] отдельных полос, указанная на левой стороне геля)
Дорожка 2: H79 человеческий IgG1 (невосстанавливающие)
Дорожка 3: H70 человеческий IgG1 (невосстанавливающие)
Гель 2: Дорожка 4: Маркер (ММ [кДа] отдельных полос, указанная на левой стороне геля)
Дорожка 5: H70 человеческий IgG1 (в восстанавливающих условиях)

Фиг. 15



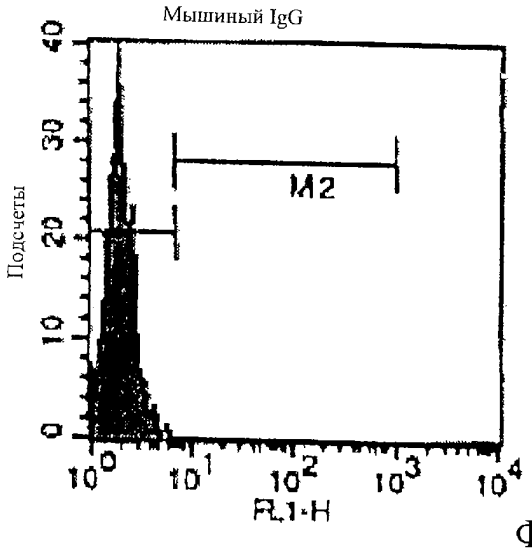
Фиг. 16

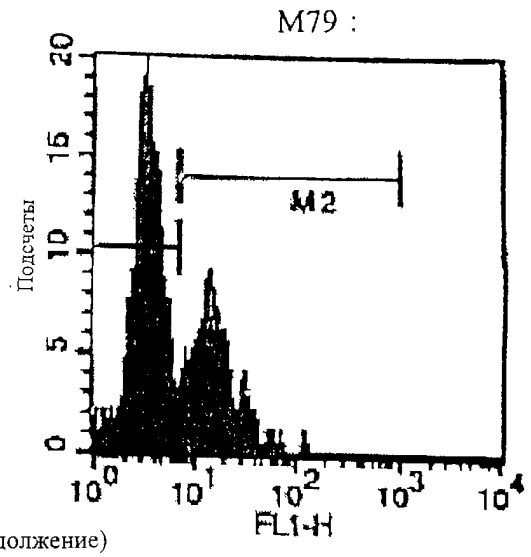


Фиг. 16(продолжение)

RU 2224766 C2

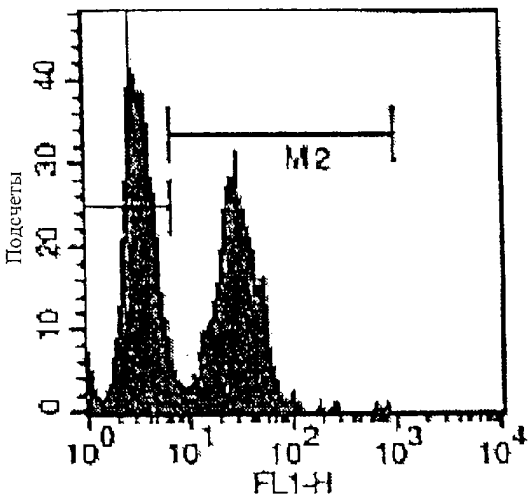
RU 2224766 C2



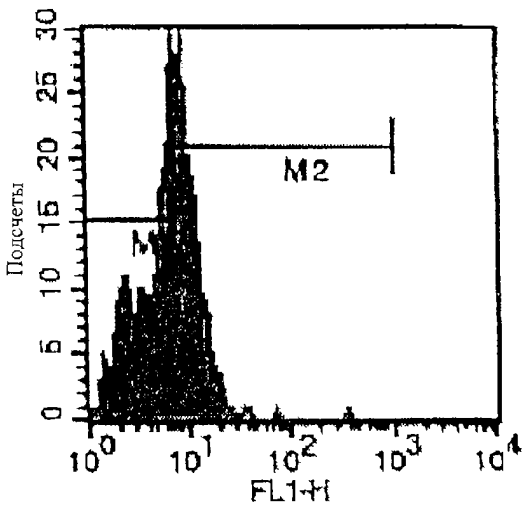


Фиг. 16(продолжение)

H79IgG1M:

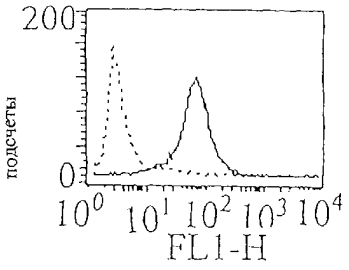


H79IgG1M (1:10):

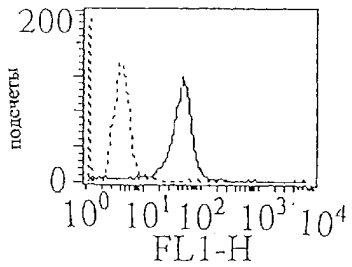


Фиг. 16(продолжение)

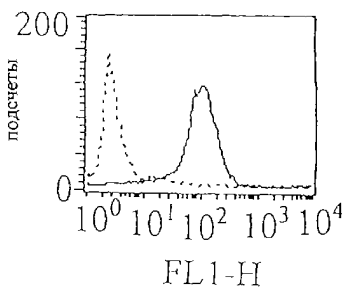
I)



II)



III)



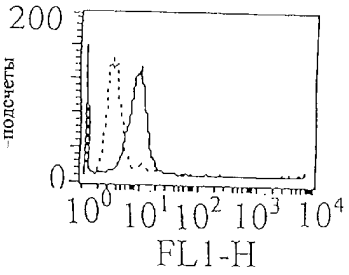
Фиг.17

FACS AK

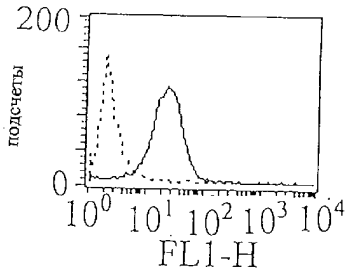
RU 2224766 C2

RU 2224766 C2

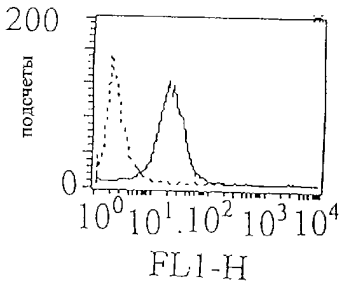
IV)



V)

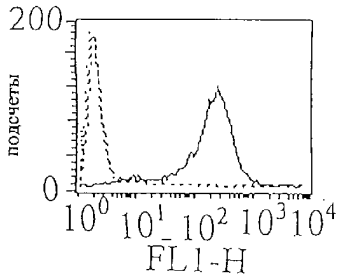


VI)

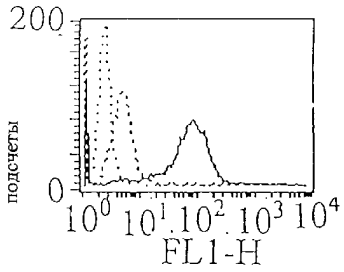


Фиг. 17(продолжение)

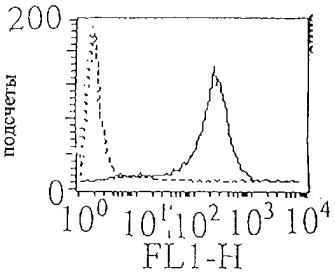
VII)



VIII)

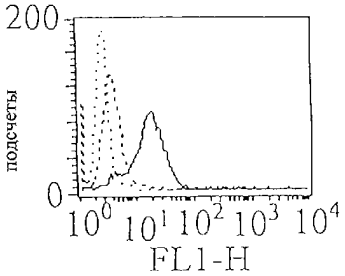


IX)

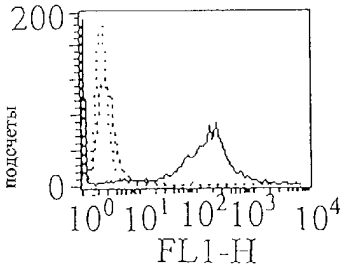


Фиг. 17(продолжение)

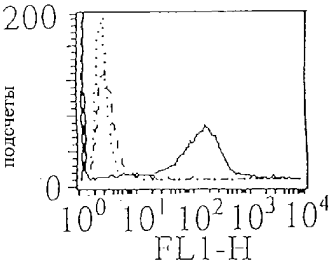
X)



XI)



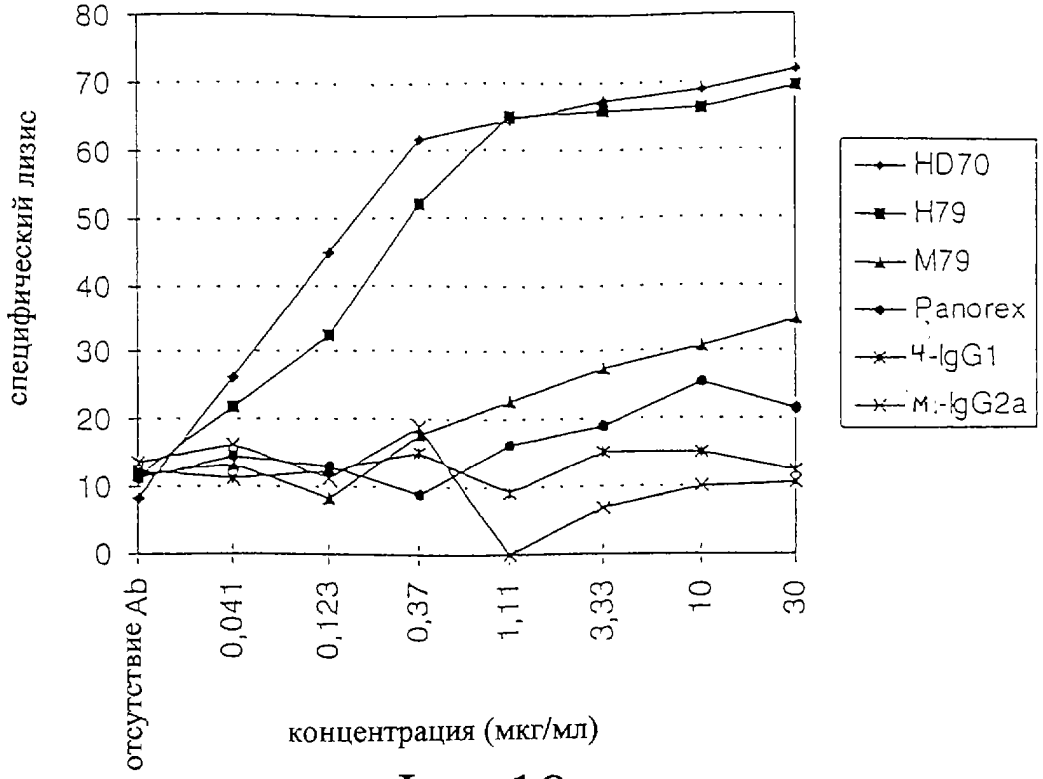
XII)



Фиг. 17(продолжение)

RU 2224766 C2

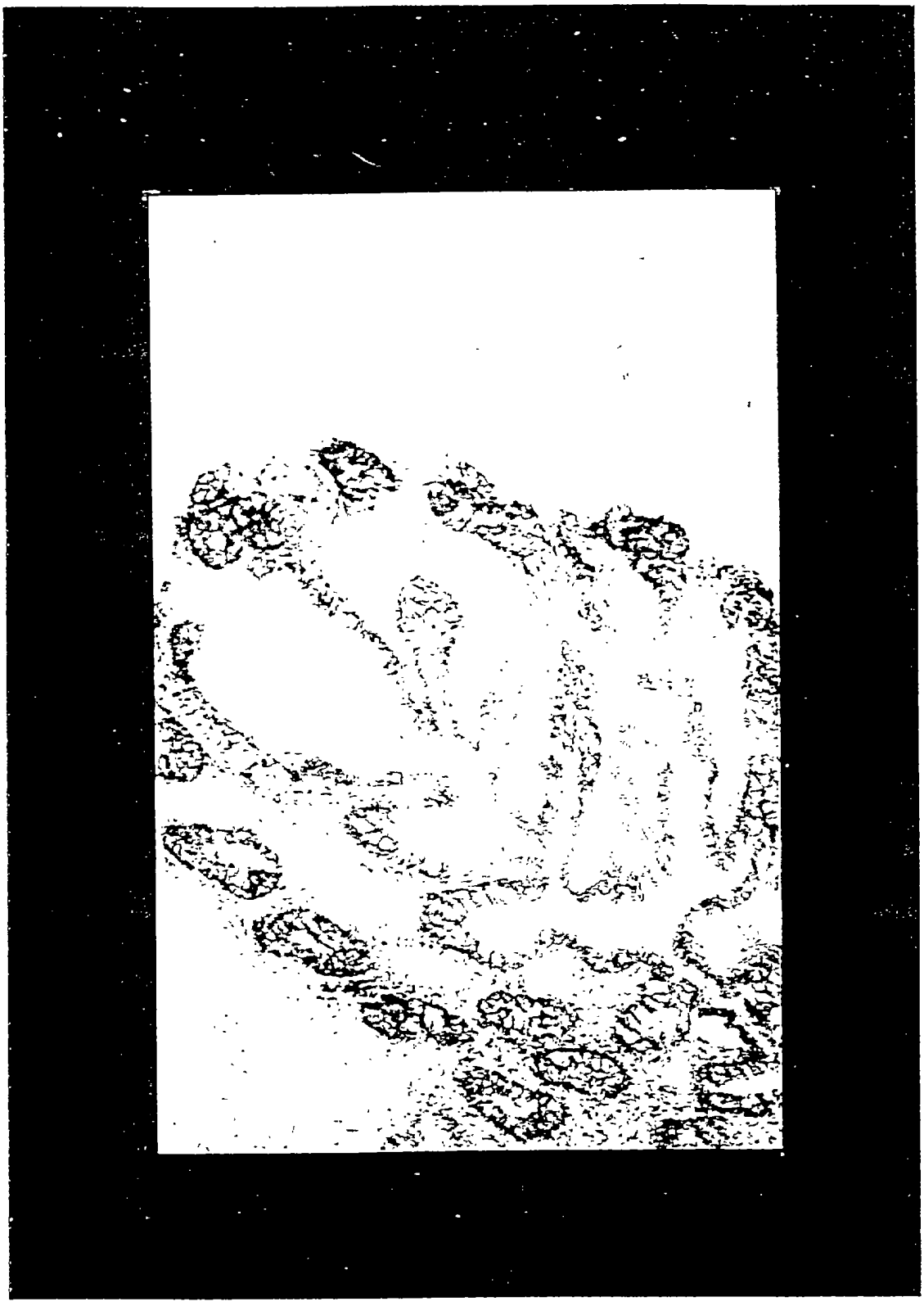
RU 2224766 C2



Фиг.18

RU 2224766 C2

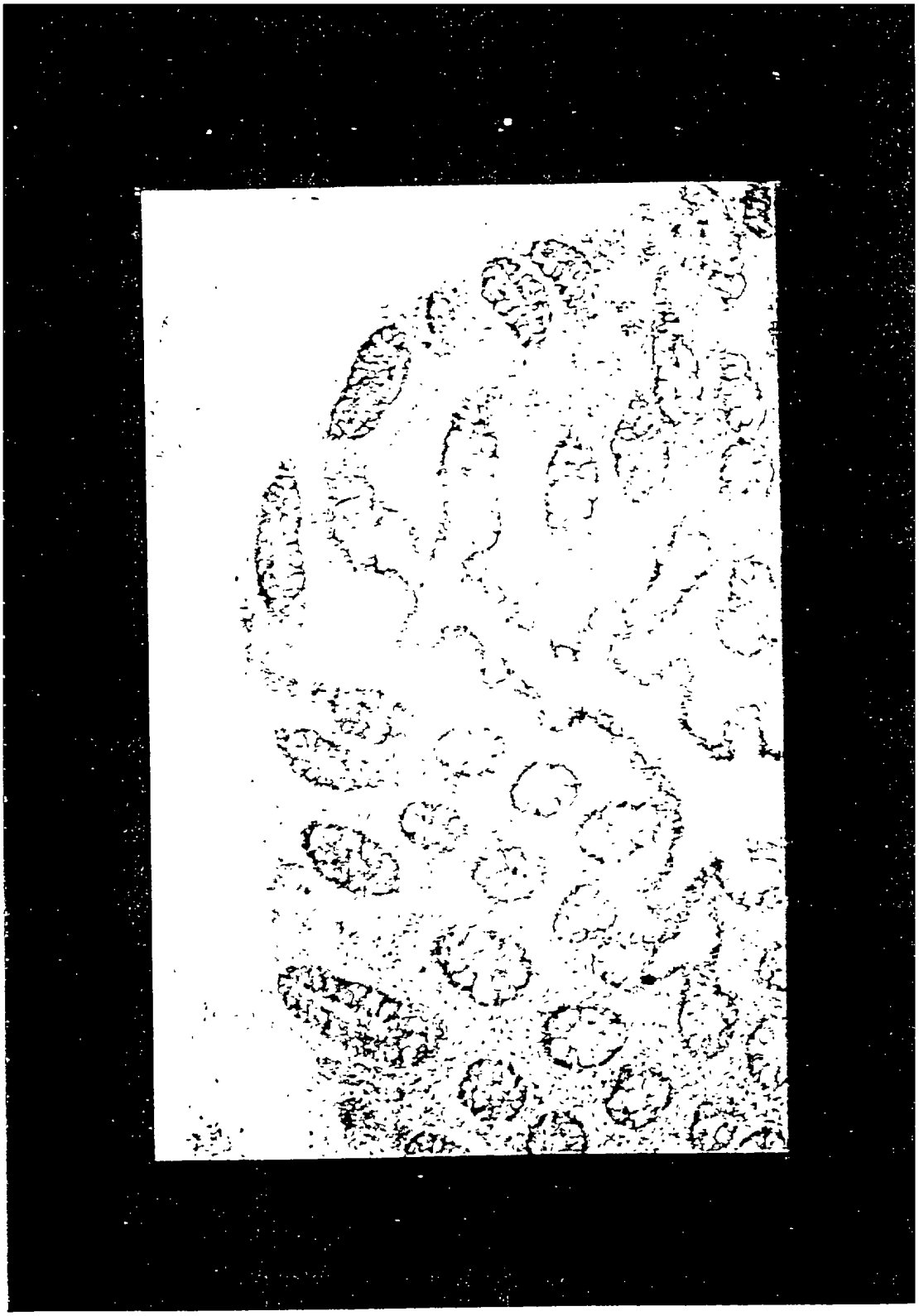
RU 2224766 C2



Фиг.19

RU 2224766 C2

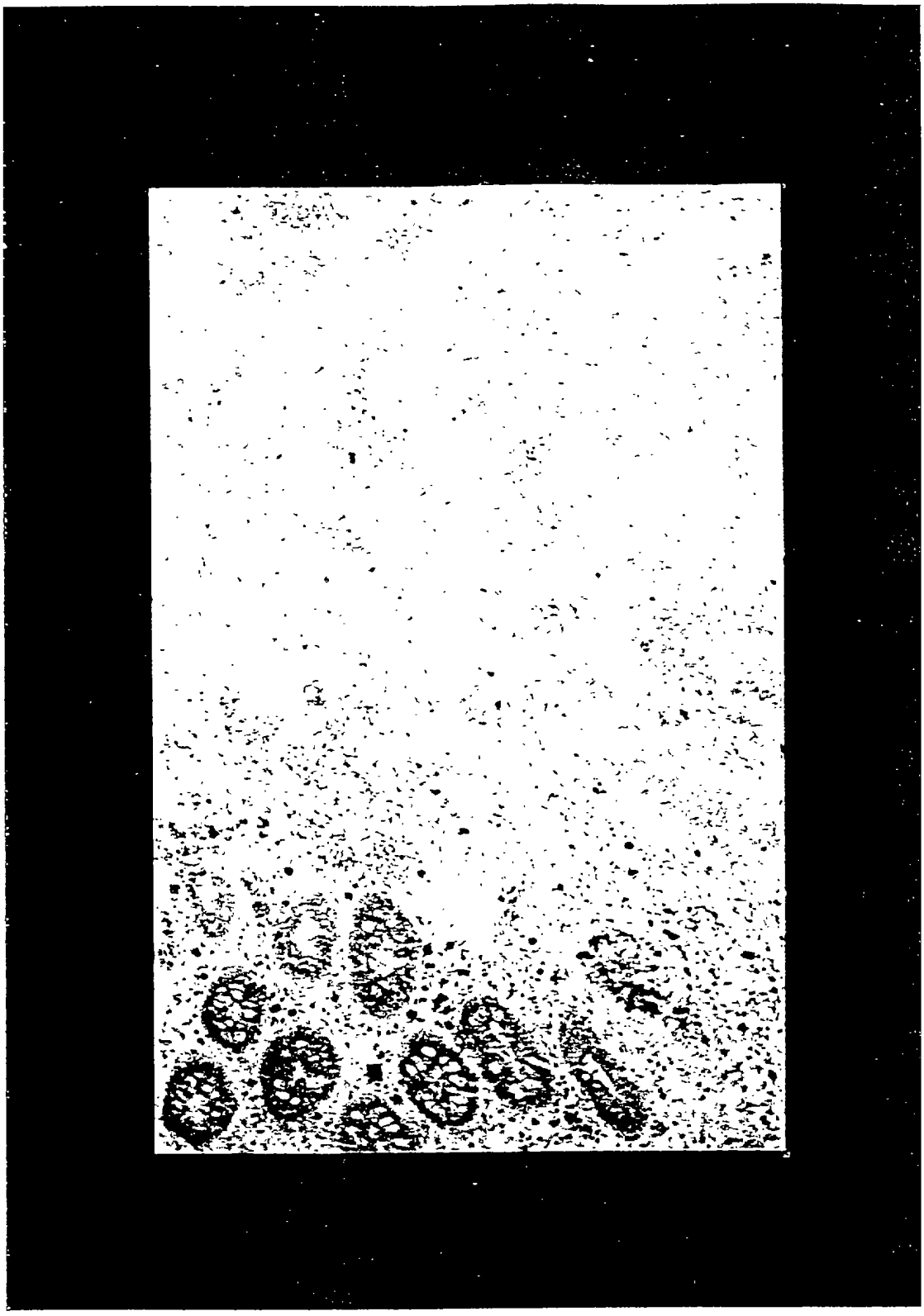
RU 2224766 C2



Фиг. 20

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2



Фиг. 21

RU 2224766 C2

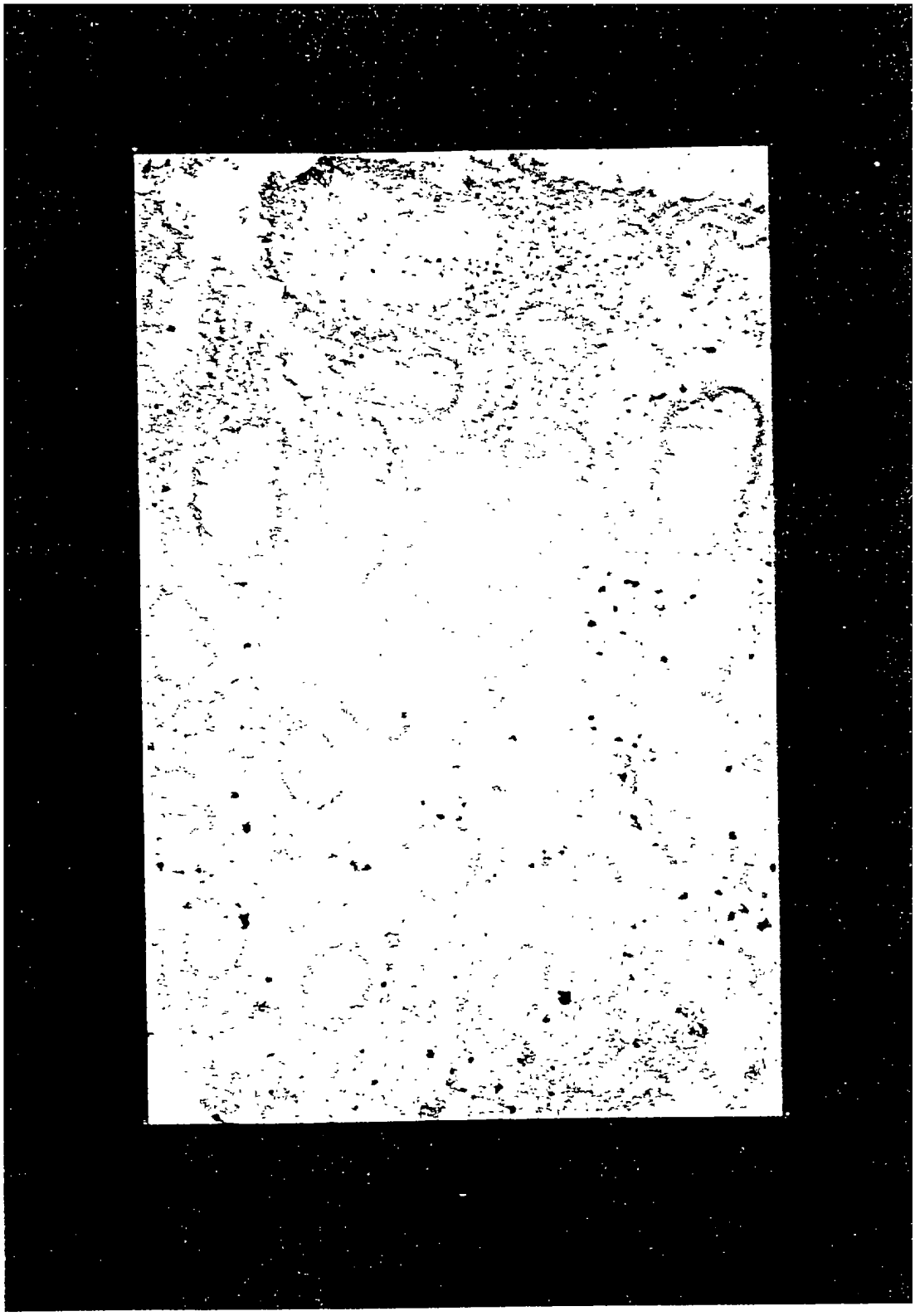
RU 2224766 C2



Фиг. 22

RU 2224766 C2

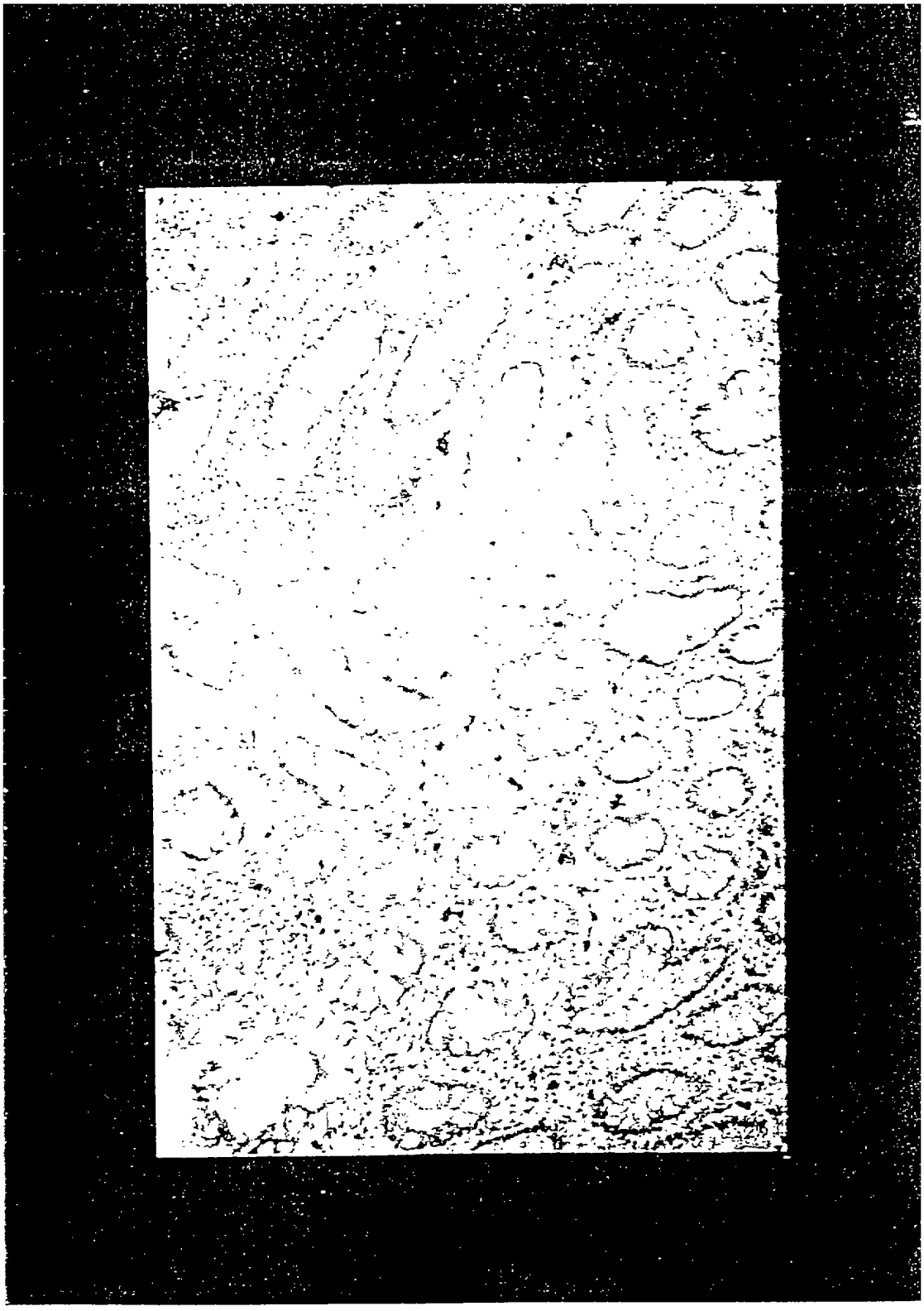
RU 2224766 C2



Фиг. 23

RU 2224766 C2

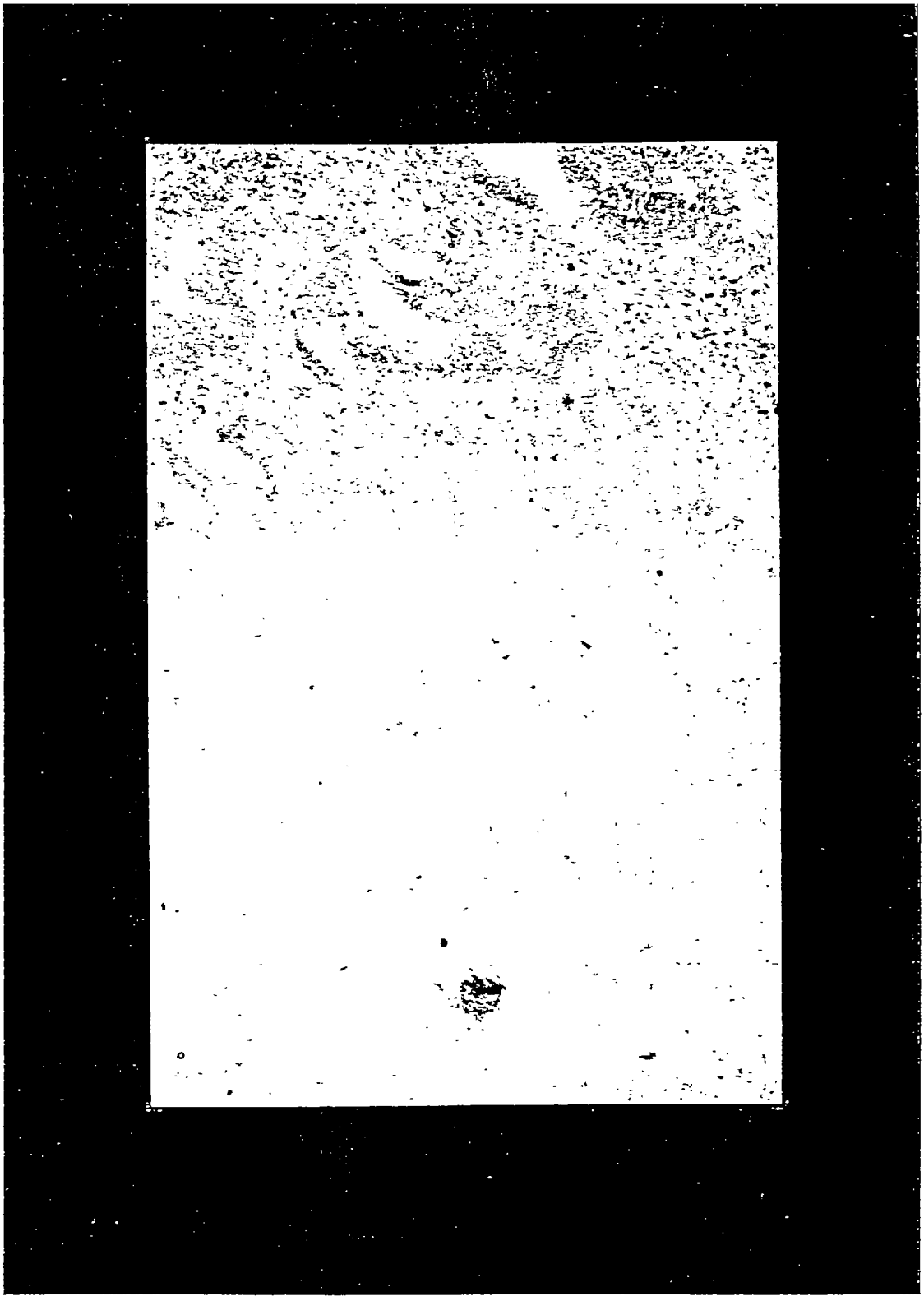
RU 2224766 C2



Фиг. 24

RU 2224766 C2

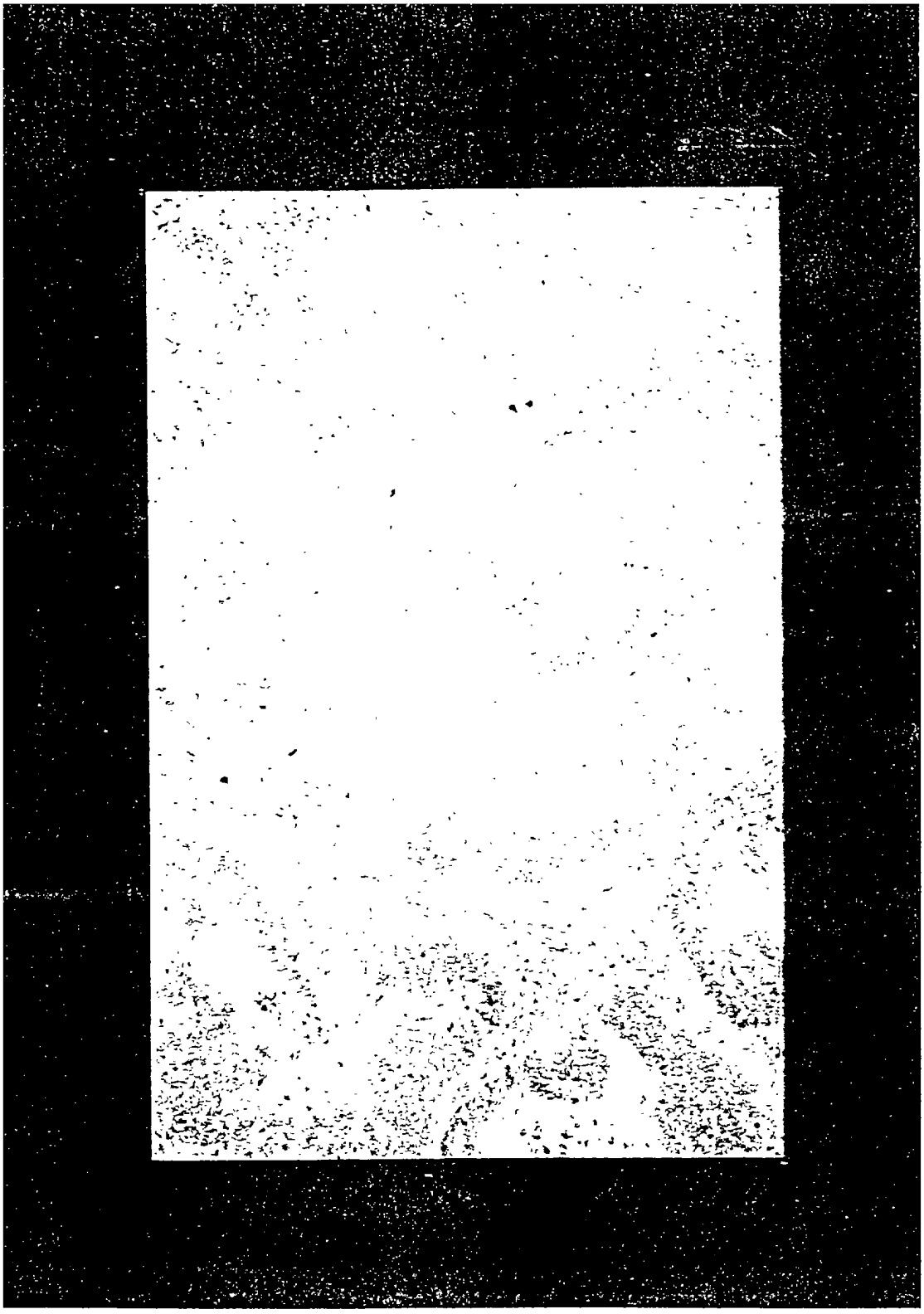
RU 2224766 C2



Фиг. 25

RU 2224766 C2

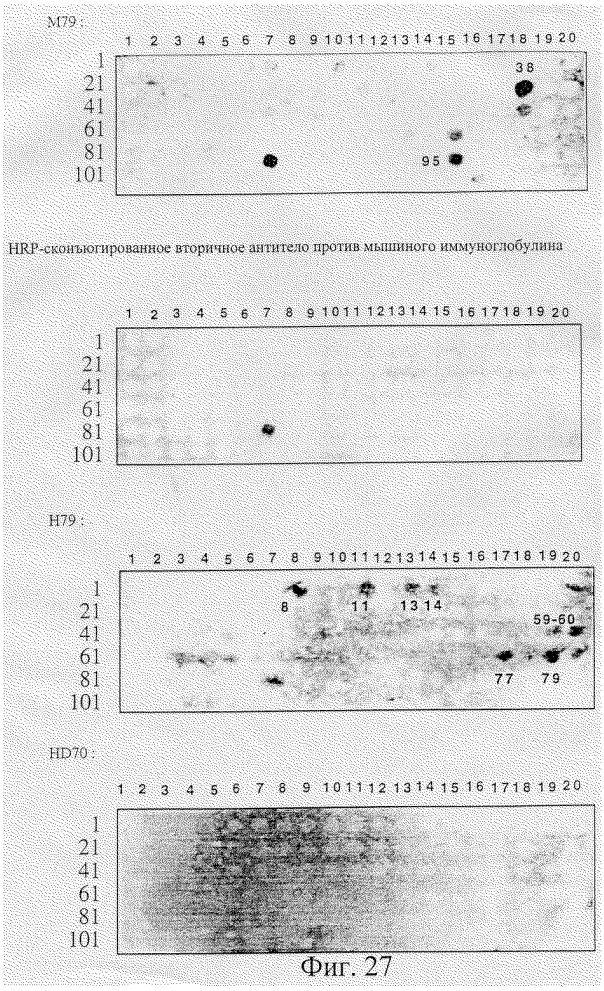
RU 2224766 C2



Фиг. 26

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2



Фиг. 27

RU 2224766 C2

RU 2224766 C2