

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **017710**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2013.02.28

(21) Номер заявки
200870072

(22) Дата подачи заявки
2006.12.20

(51) Int. Cl. **C07K 16/24** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(54) ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ dAb

(31) **2005907124; 60/817,272**

(32) **2005.12.20; 2006.06.28**

(33) **AU; US**

(43) **2009.04.28**

(86) **PCT/AU2006/001940**

(87) **WO 2007/070948 2007.06.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**СЕФАЛОН АВСТРАЛИЯ ПТИ ЛТД.
(AU)**

(72) Изобретатель:
**Вулвен Бенджамин П., Томлинсон
Ян М., Ли Дженнифер А. (GB), Дойл
Энтони Джерард, Дженнингз Филип
Энтони (AU)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **US-A1-20050271663**

US-A1-20050118643

WO-A2-2003085089

HOLT L. J. et al., "Domain antibodies: proteins for therapy", Trends in Biotechnology, vol. 21, No. 11, November 2003, p 484-490

QIN W. et al., "A novel domain antibody rationally designed against TNF- α using variable region of human chain antibody as scaffolds to display antagonistic peptides", Molecular Immunology, vol. 44(9), 2007, p. 2355-2361

(57) Настоящее изобретение относится к рекомбинантному доменному антителу (dAb), связывающемуся с TNF- α человека, где dAb содержит вариабельный домен тяжелой или легкой цепи иммуноглобулина, где указанный вариабельный домен содержит по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), имеющую последовательность, полученную от примата Нового Света, где CDR выбрана из группы, где группа состоит из YAATKLQS (SEQ ID № 1), YEASSLQS (SEQ ID № 2), YEASKLQS (SEQ ID № 3), YSASNLET (SEQ ID № 4). Рекомбинантное доменное антитело используют для определения TNF- α человека в образце и для лечения нарушения, характеризующегося активностью TNF- α человека.

B1**017710****017710****B1**

Область изобретения

Изобретение относится к рекомбинантным доменным антителам (dAb), пригодным для лечения человека. Более конкретно, настоящее изобретение относится к доменному антителу (dAb), которое связывается с TNF- α человека, и к его использованию для лечения нарушений, характеризующихся активностью TNF- α человека.

Предпосылки изобретения

Фактор некроза опухоли альфа (TNF- α) представляет собой цитокин, который продуцируется многими типами клеток, включая моноциты и макрофаги, вовлеченный в опосредование шока и патофизиологию ряда заболеваний и нарушений человека, включая сепсис, инфекции, аутоиммунные заболевания, отторжение трансплантата и реакцию "трансплантат против хозяина".

С целью противодействия неблагоприятным эффектам, опосредуемым TNF- α человека, в качестве средства ингибирования активности TNF- α найдены антитела, которые связывают и нейтрализуют TNF- α человека. Некоторые из самых ранних антител к TNF- α человека представляли собой моноклональные антитела мышей, секретируемые гибридомными клеточными линиями, получаемыми из лимфоцитов, полученных от мышей, иммунизированных TNF- α человека. Хотя такие антитела были эффективными в отношении связывания и нейтрализации TNF- α человека, их применение в терапии *in vivo* было ограничено проблемами, связанными с введением людям антител мышей, в частности, с активацией нежелательного иммунного ответа у человека на антитело мыши, называемому реакциями антителами человека к антителам мыши (НАМА).

В попытках преодолеть эти проблемы антитела мыши к TNF- α человека генетически конструировали так, чтобы они были более похожими на антитела человека. Например, получали химерные антитела человека/мыши, где последовательности вариабельных областей антитела из генома мыши комбинировали с последовательностями константных областей антитела из генома человека. Химерные антитела проявляют характеристики связывания исходного антитела мыши и эффекторные функции, ассоциированные с константной областью человека. Хотя эти химерные антитела использовали для лечения человека, они все еще содержат некоторые последовательности мыши и, следовательно, могут активировать реакции против химерных антител у людей, особенно, когда их вводят в течение продолжительных периодов времени, что, таким образом, ограничивает их терапевтическое применение.

С применением способов гибридомы человека получены моноклональные антитела человека к TNF- α человека. Однако этот подход страдает от этических, клинических и иммунологических ограничений на иммунизацию людей.

Постулировано, что люди будут обладать толерантностью к антителам не являющихся человеком приматов, так как они структурно сходны с антителами человека (Ehrlich PH et al Human and primate monoclonal antibodies for *in vivo* therapy. Clin. Chem. 34:9 pg 1681-1688 (1988)). Кроме того, так как антитела человека неиммуногенны у макаков Резус (Ehrlich PH et al., Rhesus monkey responses to multiple injections of human monoclonal antibodies. Hybridoma 1987; 6:151-60), вероятно, что обратное тоже верно и антитела приматов не будут иммуногенными у людей.

Эволюционно далекие приматы, такие как приматы Нового Света, не только достаточно отличаются от людей, чтобы допускать образование антител к антигенам человека, но и достаточно сходны с людьми, чтобы иметь антитела, сходные с антителами человека до такой степени, что у хозяина не активируется иммунный ответ к антителам, когда людям вводят такие полученные от приматов антитела. Приматы Нового Света (подотряд Platyrrhini) включают по меньшей мере 53 вида, как правило, разделяемых на два семейства Callithricidae и Cebidae. Callithricidae состоит из игрунгов и тамаринов. Cebidae включает беличьих обезьян, прыгунов, паукообразных обезьян, шерстистых обезьян, капуцинов, ночных обезьян или трехполосных дурукули и ревунов.

В предшествующих исследованиях был охарактеризован спектр экспрессируемых тяжелых цепей иммуноглобулинов игрунки Callithrix jacchus (von Buding H-C et al., Characterization of the expressed immunoglobulin IGHV repertoire in the New World marmoset Callithrix jacchus. Immunogenetics 2001; 53:557-563). Идентифицировано шесть подгрупп IGHV, показавших высокую степень сходства последовательности с их аналогами IGHV человека. Каркасные области были более консервативными по сравнению с определяющими комплементарность областями (CDR). Степень сходства между последовательностями IGHV C. jacchus и человека была меньше, чем между приматами Старого Света и людьми.

Доменные антитела

Доменные антитела (dAb) представляют собой наименьшие функционирующие связывающие единицы антител и соответствуют вариабельным областям тяжелых (V_H) или легких (V_L) цепей антител. Молекулярная масса доменных антител составляет приблизительно 13 кДа или менее чем одну десятую часть полноразмерного антитела.

Легкие цепи иммуноглобулинов обозначают или как легкие цепи каппа, или как легкие цепи лямбда, а тяжелые цепи как гамма, мю, дельта, альфа или эпсилон. Вариабельная область придает антителу его специфичность. В каждой вариабельной области находятся области гипервариабельности, также известные как определяющие комплементарность области (CDR), фланкированные более консервативными областями, обозначаемыми как каркасные области. В каждой вариабельной области находятся три CDR

и четыре каркасные области.

В отличие от обычных антител доменные антитела хорошо экспрессируются в бактериальных, дрожжевых системах и системах млекопитающих. Их небольшой размер обеспечивает высокие молярные количества на грамм продукта, таким образом, обеспечивая значительное увеличение эффективности дозы, кроме того, доменные антитела можно использовать в качестве строительных блоков для получения терапевтических продуктов, таких как многоцелевые dAb, в которых конструкция, содержащая два или более переменных домена, связывается с двумя или более терапевтическими мишенями, или dAb, предназначенные для легочного или перорального введения.

Сущность изобретения

В первом аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному доменному антителу (dAb), которое связывается с TNF- α человека, где dAb содержит переменный домен тяжелой или легкой цепи иммуноглобулина, где указанный переменный домен содержит, по меньшей мере, одну определяющую комплементарность область (CDR), имеющую последовательность, происходящую от примата Нового Света, где CDR выбрана из группы, состоящей из AATKLQS (SEQ ID № 1), EASSLQS (SEQ ID № 2), EASKLQS (SEQ ID № 3), SASNLET (SEQ ID № 4).

Во втором аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество dAb по первому аспекту изобретения вместе с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к применению dAb по первому аспекту изобретения в диагностике для определения TNF- α человека.

В четвертом аспекте изобретение относится к способу лечения нарушения у человека, характеризующегося активностью TNF- α человека, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по второму аспекту изобретения.

В пятом аспекте изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей dAb по первому аспекту изобретения.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 приведены аминокислотная (SEQ ID № 6) и нуклеотидная последовательности (SEQ ID № 5) акцепторного dAb.

На фиг. 2 приведены нуклеотидные и аминокислотные последовательности генных сегментов V_K одиннадцати (11) игрунок и шести (6) трехполосных дурукули.

На фиг. 3 приведены аминокислотная (SEQ ID № 6) и нуклеотидная последовательности (обе цепи; SEQ ID № 5 и 53) акцепторного dAb. На фигуре указаны участки расщепления рестриктаз KpnI и SanDI, вырезающих область, содержащую CDR2. Вырезаемые остатки CDR2 указаны подчеркиванием.

На фиг. 4 показаны выравнивания последовательностей, демонстрирующие олигонуклеотиды, используемые при клонировании и подтверждении конечных последовательностей нуклеотидной (A; SEQ ID № 5, 36, 54-56, 37, 57-59, 14, 60-62, 15, 63-65, соответственно) и аминокислотной (B; SEQ ID № 6, 42, 66-68, 43, 69-71, 25, 72-74, 26, 75-77, соответственно) последовательностей, приведенных на фиг. 2.

На фиг. 5 показана способность dAb со вставленной CDR2 ингибировать связывание TNF с рекомбинантным рецептором TNF. Тестируемые dAb представляли собой следующее: dAb трехполосной дурукули 1 (CDR = AATKLQS; SEQ ID № 1), dAb трехполосной дурукули 2 (CDR = EASSLQS; SEQ ID № 2), dAb игрунки 1 (CDR = EASKLQS; SEQ ID № 3), dAb игрунки 2 (CDR = SASNLET; SEQ ID № 4) и акцепторное dAb (CDR = SASELQS; SEQ ID № 49).

На фиг. 6 показана улучшенная способность соединений 100 и 123 нейтрализовать цитотоксическую активность TNF на фибробласты L929 мышей относительно акцепторного dAb (соединение 145).

Подробное описание изобретения

В первом аспекте настоящее изобретение относится к рекомбинантному доменному антителу (dAb), которое связывается с TNF- α человека, где dAb содержит переменный домен тяжелой или легкой цепи иммуноглобулина, где указанный переменный домен содержит по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), имеющую последовательность, происходящую от примата Нового Света, где CDR выбран из группы, состоящей из AATKLQS (SEQ ID № 1), EASSLQS (SEQ ID № 2), EASKLQS (SEQ ID № 3), SASNLET (SEQ ID № 4).

Предпочтительно CDR представляет собой CDR2.

В предпочтительном варианте осуществления dAb содержит последовательность, выбранную из:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFGSGS
 GSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQVVRPFTFGQGTKVEIKR
 [Соединение 145; SEQ ID NO:7]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQAIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFGSGS
 GSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQVVRPFTFGQGTKVEIKR
 [Соединение 123; SEQ ID NO:8]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFGSGS
 GSGTDFLTITSSLLPEDFATYYCQQVVRPFTFGQGTKVEIKR
 [Соединение 100; SEQ ID NO:9]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQAIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFGSGS
 GSGTDFLTITSSLLPEDFATYYCQQVVRPFTFGQGTKVEIKR
 [Соединение 196; SEQ ID NO:10]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKPPKLLIYSASNLETGVPSRFGSGSG
 SGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQVVRPFTFGQGTKVEIKR
 [Соединение 134; SEQ ID NO:50]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFGSGR
 GSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQVVRPFTFGQGTKVEIKR
 [Соединение 137; SEQ ID NO:51]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFGSGS
 GSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQVVRPFTFGQGTKVEIKR
 [Соединение 121; SEQ ID NO:52]

В дополнительном аспекте изобретение относится к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей dAb по первому аспекту изобретения.

Как используют в настоящем документе, термин "связывается с" предназначен для обозначения связывания антигена вариабельной областью иммуноглобулина с константой диссоциации (K_d) 1 мкМ или менее, как измеряют посредством анализа поверхностного плазмонного резонанса, например, с применением системы поверхностного плазмонного резонанса BIAcore™ и программного обеспечения оценки кинетики BIAcore™ (например, версии 2.1). Аффинность или константа диссоциации (K_d) для конкретного взаимодействия связывания предпочтительно составляет приблизительно 500 нМ или менее, более предпочтительно приблизительно 300 нМ или менее и предпочтительно по меньшей мере от 300 нМ до 50 пМ, от 200 нМ до 50 пМ, а более предпочтительно по меньшей мере от 100 нМ до 50 пМ, от 75 нМ до 50 пМ, от 10 нМ до 50 пМ.

Как используют в настоящем документе, термин "вариабельный домен" означает свернутый полипептидный домен, содержащий последовательности, свойственные вариабельным доменам тяжелых или легких цепей иммуноглобулинов, и специфически связывающий антиген. А доменное антитело или dAb представляет собой эквивалент одному полипептиду вариабельного домена.

Специалистам в данной области понятно, что остаток последовательности вариабельного домена может происходить из последовательности вариабельного домена человека, примата Нового Света или примата Старого Света, которые, вследствие их эволюционной связи с людьми, обладают высокой степенью гомологии с последовательностью человека. Таким образом, например, CDR, выбранный из указанных выше последовательностей, можно вставлять в последовательность вариабельной области человека или примата с заменой CDR дикого типа.

Таким образом, изобретение дополнительно основано на способе амплификации генов вариабельных доменов иммуноглобулинов приматов Нового Света, например, посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) с нуклеиновой кислотой, выделенной из лимфоцитов приматов Нового Света с праймерами, специфичными для семейства генов вариабельных доменов тяжелых и легких цепей. Например, информацию о границах генов вариабельных доменов тяжелых и легких цепей (V_H и V_L , соответственно) можно использовать для конструирования праймеров ПЦР, амплифицирующих вариабельный домен из клонированной кодирующей последовательности тяжелой или легкой цепи, кодирующей антитело, для которого известно, что оно связывает данный антиген. Затем амплифицированный вариабельный домен вставляют отдельно или в виде слияния с другой полипептидной последовательностью в подходящий экспрессирующий вектор. Затем экспрессированный вариабельный домен испытывают на высокую аффинность связывания с желаемым антигеном.

Спектр доменов V_H и V_L может представлять собой природный спектр последовательностей иммуноглобулинов или синтетический спектр. Природный спектр представляет собой спектр, получаемый, например, из экспрессирующих иммуноглобулины клеток, полученных от одного или нескольких приматов. Такие спектры являются первичными, т.е., полученными из экспрессирующих иммуноглобулины клеток новорожденных или перегруппированными, т.е., полученными, например, из В-клеток взрослых приматов. При желании, клоны, идентифицированные из природного спектра, или любого спектра, связывающего антиген-мишень, затем подвергают мутагенезу и дальнейшему скринингу для получения и отбора вариантов с улучшенными характеристиками связывания.

Синтетические спектры одиночных вариабельных доменов иммуноглобулинов получают посредством искусственного внесения разнообразия в клонированный вариабельный домен.

Спектр доменов V_H и V_L можно скринировать на желаемую специфичность связывания и функциональное поведение, например, посредством фагового дисплея. Способы конструирования библиотек бактериофагового дисплея и экспрессионных библиотек фага лямбда хорошо известны в данной области. Способ фагового дисплея подробно описан в данной области, а примеры способов и соединений для получения и скрининга таких библиотек и созревания аффинности их продуктов можно найти, например, в Barbas et al. (1991) PNAS 88:7978-7982; Clarkson et al. (1991) Nature 352:624:628; Dower et al. PCT. 91/17271, патент США № 5427908, патент США № 5580717 и Европейский патент 527839; Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372; Garrad et al. (1991) Bio/Technology 9:1373:1377; Garrad et al. PCT WO 92/09690; Gram et al. (1992) PNAS 89:357 6-3580; Griffiths et al. (1993) EMBO J. 12:725:734; Griffiths et al. патент США № 5885793 и Европейский патент 589877; Hawkins et al. (1992) J. Mol. Biol. 226:889-896; Hay et al. (1992) Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85; Hoogenboom et al. (1991) Nuc. Acid. Res. 19:4133-4137; Husc et al. (1989) Science 246:1275-1281; Knappik et al. (2000) J. Mol. Biol. 296:57-86; Knappik et al. PCT WO 97/08320; Ladner et al. патенты США № 5223409, № 5403484, № 5571698, № 5837500 и Европейский патент 436597; McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-554; McCafferty et al. PCT. WO 92/01047, патент США № 5969108 и Европейский патент 589877; Salfeld et al. PCT WO 97/29131, предварительная заявка США № 60/126603 и Winter et al. PCT WO 92/20791 и Европейский патент 368684.

Рекомбинантные библиотеки, экспрессирующие спектр доменов V_H и V_L , можно экспрессировать на поверхности микроорганизмов, например дрожжей или бактерий (см. публикации PCT WO 99/36569 и 98/49286).

Способ, основанный на антителах, полученных из отобранных лимфоцитов, или SLAM, как его обозначают в уровне техники, представляет собой другой способ быстрого получения высокоаффинных антител. В отличие от подходов фагового дисплея все антитела являются полностью бивалентными. Для получения антител приматов Нового Света, приматов Нового Света иммунизируют антигеном человека, например, полипептидом TNF- α . После иммунизации выделяют клетки и селективно размножают в индивидуальных микролунках. Из лунок извлекают супернатанты и тестируют на связывание и функцию. Для последующих манипуляций, например, гуманизирования, получения фрагментов Fab, scFv или dAb, можно выделять генные последовательности. Таким образом, другим примером является получение антитела или видов антител по изобретению посредством SLAM и его производных (Babcock, J.S. et al. 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 93; 7843-7848, патент США 5627052 и публикация PCT WO92/02551). Адаптации SLAM, такие как использование альтернатив для тестирования супернатантов, таких как пэннинг, также входят в объем данного изобретения.

В одной из экспрессионных систем библиотека рекомбинантных пептидов/белков представлена на рибосомах (для примеров см. Roberts, RW and Szostak, J.W. 1997. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94:12297-123202 и публикация PCT № WO98/31700). Таким образом, другой пример включает получение и транскрипцию *in vitro* библиотеки ДНК (например, антител или производных, предпочтительно полученных из иммунизированных клеток, но не ограничено этим), трансляцию библиотеки так, что белок и "иммунизированная" мРНК остаются на рибосоме, отбор по аффинности (например, посредством связывания с RSP), выделение мРНК, обратную трансляцию и последующую амплификацию (например, посредством полимеразной цепной реакции или родственного способа). Дополнительные циклы отбора и амплификации можно по мере необходимости сочетать с созреванием аффинности посредством внесения в эту систему соматических мутаций или посредством других способов созревания аффинности, как известно на существующем уровне техники.

Другой пример представляет собой использование для получения доменных антител по изобретению способа эмульсионной компартментализации. В эмульсионной компартментализации, способы сортировки *in vitro* и оптической сортировки сочетают с совместной компартментализацией транслированного белка и его нуклеотидной кодирующей последовательностью в водной фазе внутри масляной капли в эмульсии (смотри публикации PCT №№ WO 99/026711 и WO 00/40712). Основные элементы для получения и отбора антител, по существу, сходны со способом рибосомного дисплея *in vitro*.

Последовательности CDR можно получать из нескольких источников, например баз данных, например базы данных белков и нуклеотидов The National Centre for Biotechnology Information, The Rabat Database of Sequences of Proteins of Immunological Interest. Альтернативно, области CDR можно предсказывать из спектра доменов V_H и V_L (см., например, Kabat EA and Wu TT. Attempts to locate complementarity determining residues in the variable positions of light and heavy chains. Ann. NY Acad. Sci. 190:382-93 (1971)). Последовательность CDR может представлять собой геномную ДНК или кДНК.

Существует ряд способов, в которых в последовательность вариабельного домена можно встраивать замещающий CDR, и такие способы известны специалистам в данной области.

Предпочтительный способ по настоящему изобретению включает замену CDR2 в домене вариабельной области посредством направляемого праймерами мутагенеза. Этот способ состоит из отжига синтетического олигонуклеотида, кодирующего желаемые мутации, с областью матрицы, где он служит в качестве праймера для инициации синтеза ДНК *in vitro*; удлинения олигонуклеотида ДНК-полимеразой

с получением двухцепочечной ДНК, которая несет желаемые мутации; и лигирования, и клонирования последовательности в подходящий экспрессирующий вектор.

Предпочтительно доменное антитело по изобретению обладает низкой иммуногенностью у людей.

При указании термина "низкая иммуногенность" подразумевают, что доменное антитело не индуцирует у человека образование антител в достаточной степени, чтобы снизить эффективность непрерывного введения антитела в течение достаточного периода времени для достижения терапевтической эффективности.

Предпочтительно последовательность вариабельной области, в которую встраивают CDR представляет собой "последовательность акцепторного dAb" (обозначенную, как соединение 128) представленную на фиг. 1.

Последовательность акцепторного dAb состоит из аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID № 5:

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASELQSG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR
(SEQ ID №:6).

Эта последовательность кодируется нуклеотидной последовательностью, приведенной в SEQ ID № 5:

GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCT CTG TCT CCA TCT GTA GGA GAC CGT GTC ACC
ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT GAT AGT TAT TTA CAT TCG TAC CAG CAG AAA CCA
GAG AAA GCC CCT AAG CTC CTG ATC TTT AGT GCA TCC GAG TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA
CGT TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGT CTG CAA CCT
GAA GAT TTT GCT ACG TAC TAC TGT CAA CAG GGT GTG TGG CGT CCT TTT ACG TTC GGC CAA
GGG ACC AAG GTG CAA ATC AAA CGG

В одном из предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения последовательность CDR игрушки SASNTLET (SEQ ID № 4) встраивают в последовательность акцепторного dAb так, чтобы заменить последовательность CDR2 (SASELQS; SEQ ID № 49) последовательности акцепторного dAb с получением следующего dAb (обозначаемого, как соединение 145):

Соединение 145

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID
№:7)

Таким образом, в одном из предпочтительных вариантов осуществления dAb, которое связывается с TNF-α человека, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID № 7.

В объем настоящего изобретения входит, что последовательность dAb можно дополнительно подвергать созреванию аффинности для улучшения ее характеристик связывания антигена. Это может требовать модификации некоторых аминокислотных остатков в CDR1 и CDR3.

Например, dAb со встроенным CDR игрушки, приведенное в SEQ ID № 7 подвергали аффинному созреванию, как указано в разделе "материалы и методы", и тестировали на связывание TNF. В дополнительном предпочтительном варианте осуществления dAb, которое связывается с TNF-α человека, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID № 8 или SEQ ID № 9. Они обозначены как соединение 123 и соединение 100, соответственно, и их последовательности представлены ниже:

Соединение 123

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQAIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLET
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR (SEQ
ID №:8)

Соединение 100

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETG
VPSRFSGSGSGTDFTLTISLLPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID
№:9)

В особенно предпочтительном варианте осуществления dAb, которое связывается с TNF-α человека, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID № 10. Его обозначили как соединение 196, а его последовательность представлена ниже:

Соединение 196

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQAIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLET
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLLPEDFATYYCQQVWVRPFTFGQGTKVEIKR (SEQ
ID №:10)

DAb по изобретению может дополнительно содержать связанную с ним константную область (Fc-область) иммуноглобулина. Последовательность константной области можно получать из последовательностей человека или примата. Последовательность примата может представлять собой последова-

тельность примата Нового Света или примата Старого Света. Подходящие приматы Старого Света включают шимпанзе или других человекообразных обезьян, например горилл или орангутангов, у которых вследствие их непосредственной филогенетической близости с людьми существует большая степень гомологии с последовательностью константной области человека.

DAb (с соединенной с ним константной областью или без нее) можно дериватизировать или связывать с другой функциональной молекулой. Например, dAb посредством химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным способом может быть функционально связан с одной или несколькими другими молекулами, такими как другое антитело, детектируемое средство, цитотоксическое средство, фармацевтическое средство и/или белок или пептид, которые могут опосредовать ассоциацию антитела с другой молекулой (такой как основная область стрептавицина или полигистидиновая метка).

Подходящие детектируемые средства, которыми можно дериватизировать dAb включают флуоресцентные соединения. Иллюстративные флуоресцентные детектируемые средства включают флуоресцеин, флуоресцеинизотиоцианат, родамин, 5-диметиламин-1-нафталинсульфонилхлорид, фикоэритрин и т.п. DAb также можно дериватизировать детектируемыми ферментами, такими как щелочная фосфатаза, пероксидаза хрена, глюкозооксидаза и т.п. Когда dAb дериватизировано детектируемым ферментом, его детектируют посредством добавления дополнительных реагентов, которые фермент использует для образования детектируемого продукта реакции. DAb также можно дериватизировать биотином и детектировать посредством непрямого измерения связывания авидина или стрептавицина.

Настоящее изобретение также относится к пегилированным dAb (с соединенной с ними константной областью или без нее), которые обеспечивают более продолжительное время полужизни и увеличенную устойчивость к разрушению без потери активности (например, аффинности связывания) относительно неpegилированных полипептидов антител.

DAb с использованием известных в данной области способов можно связывать с полимерными молекулами (предпочтительно ПЭГ), пригодными для обеспечения свойств более продолжительного времени полужизни и увеличенной устойчивости к разрушению. Полимерные молекулы, которые можно использовать по изобретению могут быть синтетическими или природными и включать в качестве неограничивающих примеров полиалкилен с разветвленной или неразветвленной цепью, полиалкениленовые или полиоксиалкениленовые полимеры или разветвленный или неразветвленный полисахарид, такой как гомо- или гетерополисахарид. Предпочтительные примеры синтетических полимеров, которые можно использовать по изобретению, включают полиэтиленгликоль с разветвленной или неразветвленной цепью (ПЭГ), полипропиленгликоль или поливиниловый спирт и их производные или замещенные формы. Особенно предпочтительные замещенные полимеры для связывания с dAb включают замещенный ПЭГ, включая метокси(полиэтиленгликоль). Природные полимерные молекулы, которые можно использовать в дополнение к ПЭГ или вместо него включают лактозу, амилозу, декстран или гликоген, а также их производные, которые известны специалистам в данной области.

Дериватизированные формы молекул полимеров включают, например, производные, которые содержат дополнительные функциональные или реакционно-способные группы, находящиеся на них для обеспечения взаимодействия с аминокислотными остатками полипептидов доменных антител, описываемых в настоящем документе. Такие производные включают активные сложные эфиры N-гидроксилсукцинимиды (NHS), полимеры сукцинимидилпропионата и сульфгидрил-селективные реактивные средства, такие как имид малеиновой кислоты, винилсульфон и тиол. ПЭГ полимеры, пригодные по данному изобретению, могут представлять собой линейные молекулы или могут быть разветвленными, где в одном полимере присутствует несколько групп ПЭГ.

Реакционно-способную группу (например, MAL, NHS, SPA, VS или тиол) можно присоединять непосредственно к ПЭГ полимеру или ее можно присоединять к ПЭГ посредством линкерной молекулы.

Размер полимеров, пригодных по данному изобретению, может находиться в диапазоне от 500 до 60 кДа, например, от 1000 до 60 кДа, от 10 до 60 кДа, от 20 до 60 кДа, от 30 до 60 кДа, от 40 до 60 кДа и до размеров от 50 до 60 кДа. Полимеры, используемые по изобретению, особенно ПЭГ, могут представлять собой полимеры с неразветвленной цепью или могут обладать разветвленной конформацией.

Молекулы полимеров (ПЭГ), пригодные по данному изобретению, можно присоединять к доменному антителу хорошо известными в данной области способами. Первый этап в присоединении ПЭГ или других полимерных молекул к полипептидному мономеру или полимеру антитела по изобретению представляет собой замещение гидроксильных концевых групп ПЭГ полимера содержащими электрофилы функциональными группами. В частности ПЭГ полимеры присоединяют к цистеиновым или лизиновым остаткам, находящимся в доменном антителе. Цистеиновые и лизиновые остатки могут быть природными или они могут быть сконструированы в молекуле полипептида антитела. Например, цистеиновые остатки можно рекомбинантными способами сконструировать на С-конце полипептида dAb или цистеином или лизином можно замещать остатки в конкретных доступных растворителю положениях на dAb или другом полипептиде антитела.

DAb по изобретению могут быть связаны с одной или несколькими молекулами, которые могут увеличивать время ее полужизни *in vivo*. Эти молекулы можно связывать посредством линкера так, что

они не являются препятствием/пространственным затруднением для антигенсвязывающего участка. Альтернативно их можно связывать с константной областью. Как правило, такие молекулы представляют собой полипептиды, которые встречаются в природе *in vivo* и которые препятствуют разрушению или удалению посредством эндогенных механизмов. Молекулы, которые продлевают время полужизни можно выбирать из следующего:

- (a) белки из внеклеточного матрикса, например коллаген, ламинин, интегрин и фибронектин;
- (b) белки, находящиеся в крови, например фибрин α -2 макроглобулин, сывороточный альбумин, фибриноген А, фибриноген В, сывороточный амилоидный белок А, гептаглобин, белок, убиквитин, утероглобулин, β -2 микроглобулин, плазминоген, лизоцим, цистатин С, альфа-1-антитрипсин и панкреатический ингибитор кинина;
- (c) иммунные сывороточные белки, например IgE, IgG, IgM;
- (d) транспортные белки, например ретинолсвязывающий белок, α -1 микроглобулин;
- (e) дефензины, например бета-дефензин 1, нейтрофильные дефензины 1, 2 и 3;
- (f) белки, находящиеся на гематоэнцефалическом барьере или в нервных тканях, например рецептор меланокортина, миелин, транспортер аскорбиновой кислоты;
- (g) слитные белки специфичного для рецептора трансферрина лиганда и нейрофармацевтического средства (смотри US5977307); рецептор эндотелиальных клеток капилляров головного мозга, трансферрин, рецептор трансферрина, инсулин, рецептор инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1), рецептор инсулиноподобного фактора роста 2 (IGF2), рецептор инсулина;
- (h) белки, локализующиеся в почках, например полицистин, коллаген IV типа, транспортер органических анионов K1, антиген Нейманна;
- (i) белки, локализующиеся в печени, например алкогольдегидрогеназа, G250;
- (j) фактор свертывания крови X;
- (k) α -1 антитрипсин;
- (l) HNF 1 α ;
- (m) белки, локализующиеся в легких, например секреторный компонент (связывает IgA);
- (n) белки, локализующиеся в сердце, например HSP27;
- (o) белки, локализующиеся в коже, например кератин;
- (p) специфичные для костей белки, такие как морфогенетические белки кости (BMP), например BMP-2, -4, -5, -6, -7 (также обозначаемый как остеогенный белок (OP-1)) и -8 (OP-2);
- (q) опухолеспецифичные белки, например трофобластный антиген человека, рецептор герцептина, рецептор эстрогена, катепсины, например, катепсин В (находящийся в печени и селезенке);
- (r) белки, специфичные для заболеваний, например антигены, экспрессируемые только на активированных Т-клетках, включая LAG-3 (гена активации лимфоцитов); лиганд остеопротегерина (OPGL), смотри Nature 402, 304-309, 1999; OX40 (представитель семейства рецепторов TNF, экспрессируемый на активированных Т-клетках, и для которого известно, что только костимулирующая молекула Т-клеток специфически стимулируется в клетках, продуцирующих вирус Т-клеточной лейкемии типа I человека (HTLV-I), см. J. Immunol. 2000 Jul. 1; 165(1): 263-70; металлопротеазы (ассоциированные с артритом/злокачественными опухолями), включая CG6512 Drosophila, параплегия человека, FtsH человека, AFG3L2 человека, ftsH мышей; ангиогенные факторы роста, включая кислый фактор роста фибробластов (FGF-1), основной фактор роста фибробластов (FGF-2), фактор роста сосудистого эндотелия/фактор проницаемости сосудов (VEGF/VPF), трансформирующий фактор роста- α (TGF- α), фактор некроза опухоли-альфа (TNF- α), ангиогенин, интерлейкин-3 (IL-3), интерлейкин-8 (IL-8), тромбоцитарный эндотелиальный фактор роста (PD-ECGF), плацентарный фактор роста (PlGF), мидкин тромбоцитарный фактор роста-BB (PDGF), фракталкин;
- (s) стрессовые белки (белки теплового шока);
- (t) белки, вовлеченные в транспорт Fc; и
- (u) антитела, фрагменты или производные, направленные к эндогенным белкам, например сывороточному альбумину.

В дополнительном варианте осуществления настоящего изобретения dAb по первому аспекту можно мультимеризовать, например, в качестве гетеро- или гомодимеров, гетеро- или гомотримеров, гетеро- или гомотетрамеров или гетеро- или гомомультимеров более высокого порядка. Мультимеризация может увеличить силу связывания антигена, где сила связывания относится к сумме аффинностей связывания участков множественного связывания.

Таким образом, изобретение относится к доменному антителу по первому аспекту, где доменное антитело связано по меньшей мере с одним дополнительным доменным антителом. Каждое dAb может связывать тот же или другой антиген.

Мультимеры dAb могут дополнительно содержать одно или несколько dAb, которые являются связанными и где каждое dAb связывает различный антиген, полиспецифичные лиганды, включающие так называемые "лиганды с двойной специфичностью". Например, лиганды с двойной специфичностью могут содержать пару доменов V_H или пару доменов V_L . Такие лиганды с двойной специфичностью описа-

ны в WO 2004/003019 (PCT/GB2003/002804) на имя Domantis Ltd.

Во втором аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей эффективное количество dAb по первому аспекту по изобретению, вместе с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем.

"Фармацевтически приемлемый носитель" включает любой и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, противобактериальные и противогрибковые средства, средства придания изотоничности и задержки всасывания и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают одно или несколько из воды, физиологического раствора, фосфатно-солевого буфера, декстрозы, глицерина, этанола и т.п., а также их сочетания. Во многих случаях предпочтительным является включать в композицию средства придания изотоничности, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия. Фармацевтически приемлемые вещества, такие как увлажнители или незначительные количества вспомогательных веществ, таких как увлажняющие или эмульгирующие средства, консерванты или буферы.

Композиция может находиться во множестве форм, включая жидкую, полутвердую и твердую лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, инъеклируемые и инфузируемые растворы), дисперсии или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, липосомы и суппозитории. Предпочтительно, композиция находится в форме инъеклируемого раствора для иммунизации. Введение может быть внутривенным, подкожным, интраперитонеальным, внутримышечным, трансдермальным, интратекальным и внутриартериальным.

Как правило, терапевтические композиции должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Композиции можно составлять в виде раствора, микроэмульсии, дисперсии, липосомы или других упорядоченных структур, подходящих для высокой концентрации лекарственного средства. Стерильные инъеклируемые растворы можно получать посредством введения активного соединения (т.е. dAb) в необходимое количество подходящего растворителя с одним или сочетанием ингредиентов, перечисленных выше, с последующей стерилизацией фильтрованием.

Композицию также можно составлять в виде стерильного порошка для приготовления стерильных инъеклируемых растворов. Должную текучесть раствора можно поддерживать, например, применением покрытия, такого как лецитин и/или поверхностно-активные вещества,

В определенных вариантах осуществления активное соединение можно получать с носителем, который будет защищать соединение от быстрого высвобождения, в таком виде как состав с контролируемым высвобождением, включая имплантаты, трансдермальные пластыри и микроинкапсулированные системы доставки. Можно использовать совместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота.

Композицию также можно составлять для перорального введения. В этом варианте осуществления dAb можно помещать в желатиновую капсулу с твердой или мягкой оболочкой, прессовать в таблетки или непосредственно вводить в диету субъекта.

Композицию также можно составлять для ректального введения.

В композицию также можно вводить дополнительные активные соединения. Доменное антитело можно составлять совместно и/или вводить совместно с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, например, противовоспалительными соединениями, растворимым рецептором TNF- α или химическим средством, которое ингибирует продукцию TNF- α , или антителами, которые связывают другие мишени, такие как цитокины или молекулы клеточной поверхности. Альтернативно, его можно вводить совместно с растворимым иммунохимическим реагентом, таким как белок A, C, G или L.

Эффективное количество может включать терапевтически эффективное количество или профилактически эффективное количество dAb по изобретению. Терапевтически эффективное количество относится к количеству, эффективному при дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. Профилактически эффективное количество относится к количеству, эффективному при дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого профилактического результата.

В предпочтительном варианте осуществления композицию вводят млекопитающим, предпочтительно людям или приматам.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к применению dAb по первому аспекту изобретения в диагностическом приложении для определения TNF- α человека.

Например, dAb к TNF- α человека по изобретению можно использовать для выявления TNF- α человека, например, в биологическом образце, таком как сыворотка или плазма с применением общепринятого иммунологического анализа, такого как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунологический анализ (RIA) или тканевая иммуногистохимия. DAb к TNF- α человека по изобретению можно анализировать в биологических жидкостях посредством конкурентного иммунологического анализа с применением стандартов рекомбинантного TNF- α человека, меченных детектируемым веществом и немеченого антитела к TNF- α человека.

DAb к TNF- α человека по изобретению также можно использовать для определения TNF- α видов, отличных от человека, например шимпанзе, игрунка, резус, мышь, свинья.

DAb к TNF- α человека по изобретению также можно использовать в приложениях для клеточных культур, где желательно ингибировать активность TNF- α .

В четвертом аспекте, изобретение относится к способу лечения нарушения у человека, характеризующегося активностью TNF- α человека, включающему введение субъекту фармацевтической композиции по второму аспекту изобретения.

Нарушение, характеризующееся активностью TNF- α человека, включает заболевания и другие нарушения, при которых присутствие TNF- α у субъекта, страдающего от нарушения, обнаруживается или подозревается в качестве отвечающего за патофизиологию нарушения или в качестве фактора, способствующего прогрессированию нарушения. Предпочтительно нарушение, характеризующее активностью TNF- α человека, выбрано из группы, состоящей из воспаления, воспалительных заболеваний, сепсиса, включая септический шок, эндотоксический шок, сепсиса из-за грамотрицательных бактерий и синдром токсического шока; аутоиммунного заболевания, включая ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилоартрит, остеоартрит и подагрический артрит, аллергию, рассеянный склероз, аутоиммунный диабет, аутоиммунный увеит и нефротический синдром; инфекционного заболевания, включая лихорадку и миалгию вследствие инфекции и вторичную относительно инфекции кахексию; реакции трансплантат против хозяина; роста опухолей или метастаз; легочных нарушений, включая синдром расстройства дыхания у взрослых, шоковое легкое, хроническое легочное воспалительное заболевание, легочный саркоидоз, легочный фиброз и силикоз; воспалительных нарушений толстой кишки, включая болезнь Крона и язвенный колит; нарушений сердечной деятельности; воспалительных нарушений костей, гепатита, нарушений свертывания, ожогов, реперфузионного повреждения, келоидного образования и формирования рубцовой ткани.

На всем протяжении данной спецификации слово "содержать" или такие вариации, как "содержит" или "содержащий", следует понимать как подразумевающее включение указанного элемента, числа или стадии, или группы элементов, чисел или стадий, но не исключение любого другого элемента, числа или стадии, или группы элементов, чисел или стадий.

Все указанные в данной спецификации публикации включены в настоящий документ в качестве ссылки. Любое обсуждение документов, актов, материалов, устройств, статей и т.п., которое может быть включено в настоящем описании, приведено исключительно с целью определения контекста настоящего изобретения. Это не следует рассматривать как допущение, что любой или все из этих материалов составляют часть предшествующего уровня техники или общего уровня знания в области, относящейся к настоящему изобретению, как это имеет место в Австралии или в другом месте перед датой приоритета каждого пункта формулы изобретения данной заявки.

Для того чтобы можно было яснее понять сущность настоящего изобретения, предпочтительные его формы будут в настоящий момент описаны на основании следующих далее неограничивающих примеров.

Пример 1.

Материалы и методы **Выделение генов VL приматов Нового Света**

Геномную ДНК игрунки (род *Callithrix*, вид неизвестен) и трехполосной дурукули (*Aotus trivirgatus*) получали из European Collection of Cell Cultures (ECACC), каталожные номера 85011419 и 90110510, соответственно. ДНК игрунки получали из клеточной линии B95-8, тогда как ДНК трехполосной дурукули ДНК получали из клеточной линии ОМК 637-69.

Вырожденные праймеры на основе лидирующих последовательностей VK человека и сигнальных последовательностей рекомбинации (RSS) получали на основании Walter and Tomlinson, *Antibody Engineering: A Practical Approach* (1996). Используемые для амплификации ДНК VK зародышевой линии праймеры представляли собой следующее:

Праймер VK1BL

ААТСКСАГГТКССАГАТГ (SEQ ID № 11)

Праймер VK1BL35a

ГТТΥRGГТККГТААСАСТ (SQ ID №: 12)

Праймер VK1BL35b

АТГМСТТГТWАСАСТGTG (SEQ ID № 13)

Геномную ПЦР (30 циклов) проводили с использованием полимеразы Taq с одной из пар праймеров VK1BL×VK1BL35a или VK1BL×VK1BL35b. Между клонированными последовательностями существовало перекрытие и использовали два набора праймеров.

Продукты ПЦР клонировали в набор для клонирования TOPO TA Invitrogen (каталожный № K4500-01) и секвенировали с прямым M13 и обратным pUC праймерами. Последовательность подтверждали в

прямом и обратном направлениях для дополнительного подтверждения того, что ключевые последовательности не содержат ошибок ПЦР, ПЦР и процесс клонирования для последовательностей игрунки повторяли дважды. Нуклеотидные (SEQ ID №№ 14-24 и SEQ ID №№ 36-41) и аминокислотные (SEQ ID №№ 25-35 и SEQ ID №№ 42-47) последовательности приведены на фиг. 2. Последовательности игрунки 1, 2 и 3 были подтвержденными. Последовательности 4, 5, 6, 7 и 8 присутствовали только в исходной ПЦР. Последовательности 9, 10 и 11 присутствовали только в повторных (т.е. вторых) ПЦР и клонировании.

Синтез олигонуклеотидов и клонирование в акцепторную последовательность

Как указано, из аминокислотных последовательностей, представленных на фиг. 2 выбрали четыре последовательности CDR, а именно AATKLQS (SEQ ID № 1) из последовательности 1 трехполосной дурукули (SEQ ID № 42), EASSLQS (SEQ ID № 2) из последовательности 2 трехполосной дурукули (SEQ ID № 43), EASKLQS (SEQ ID № 3) из последовательности 1 игрунки (SEQ ID № 25) и SASNLET (SEQ ID № 4) из последовательности 2 игрунки (SEQ ID № 26). Обнаружено, что последовательность 5 из трехполосной дурукули, YASSLQS (SEQ ID № 48), является идентичной последовательности кДНК GI6176295 *Aotus nancymae* (ночная обезьяна Ма), все остальные последовательности являлись уникальными.

Вариабельную область акцепторной последовательности (доменное антитело к TNF) в экспрессирующем векторе (патентованный вектор Domantis) последовательно расщепляли (25 мкг) KpnI и SanD1, которые вырезали большинство FR2, а также CDR2, как показано на рестрикционной карте. Затем вектор очищали на геле для удаления вырезанных последовательностей FR2 и CDR2 дикого типа.

Отжиг олигонуклеотидов проводили посредством инкубации пар олигонуклеотидов (500 пмоль каждого, как показано на фиг. 4А и 4В) при 95°C в течение 5 мин с последующими 65°C в течение 5 мин, а затем оставляли медленно остывать до комнатной температуры в нагревательном блоке. Затем перекрывания достраивали посредством реакции Кленова в присутствии dNTP.

Созревание аффинности

Соединение 145 со встроенной CDR игрунки (SEQ ID № 7) подвергали созреванию аффинности посредством конструирования 14 отдельных библиотек, где каждая отличалась от последовательности SEQ ID № 7 по одному аминокислотному остатку. Выбранные остатки показаны ниже заштрихованными.

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTTCRASQ~~W~~WYQOKFGK~~Q~~PKLLIYSASNLETG
VPSRPSG~~G~~GSC~~T~~FTLTSS~~I~~EPEDFATY~~Y~~COQ~~Q~~PTFGQGTKEIKR

Отбор основывался на остатках в CDR1 и CDR3, которые, как известно, являются разнообразными в спектре зрелых Ig человека, и каркасных остатках, для которых наблюдали, что они дают функциональные белки после мутагенеза в родственных dAb. Для каждого из выбранных остатков сконструирована пара комплементарных прямого и обратного праймеров для ПЦР с вырожденностью NKK и проводили две исходных реакции ПЦР, каждую с одним мутагенным праймером и фланкирующим праймером. После очистки два продукта ПЦР отжигали, а затем амплифицировали с использованием только фланкирующих праймеров (сплайсинг посредством достройки перекрывания посредством ПЦР; Lowman H.L. & Clackson T. (eds), *Phage Display: A practical approach*, Oxford University Press, Oxford, UK). Сначала клоны подвергали скринингу посредством ELISA с использованием TNF на твердой фазе и положительные клоны секвенировали. Белок dAb очищали от лучших клонов и оценивали на эффективность в анализах связывания рецептора и анализах цитотоксичности для L929. Выявлено, что соединения 100 (SEQ ID № 9) и 123 (SEQ ID № 8) обладают улучшенной способностью к нейтрализации TNF относительно исходного соединения dAb 145 (SEQ ID № 7).

Сочетание усиливающих аффинность замен соединений 100 (SEQ ID № 9) и 123 (SEQ ID № 8), давало dAb к TNF с дополнительно улучшенной эффективностью в анализе цитотоксичности для L929 (соединение 196; SEQ ID № 10).

Результаты

Эффективность клонов dAb к TNF в анализе связывания рецептора (RBA) и в анализе цитотоксичности

Способность dAb к TNF ингибировать связывание TNF с его рецептором и нейтрализовать опосредованную TNF цитотоксичность для клеток L929 проводили следующим образом:

Анализ связывания рецептора

DAb, отличающиеся по 14 выбранным положениям, тестировали на способность ингибировать связывание TNF с рекомбинантным рецептором TNF 1 (p55). В кратком изложении планшеты Maxisorp инкубировали в течение ночи с 30 мкг/мл моноклональным антителом мыши к Fc человека (Zymed, San Francisco, USA). Лунки перед инкубацией со 100 нг/мл слитного белка рецептора TNF 1 и Fc (R&D Systems, Minneapolis, USA) промывали фосфатно-солевым буфером (PBS), содержащим 0,05% Tween-20, а затем блокировали 1% BSA в PBS. Каждое dAb смешивали с TNF, который добавляли к отмытым лункам в конечной концентрации 10 нг/мл. Связывание TNF выявляли с использованием 0,2 мкг/мл биотинилированного антитела к TNF (HyCult biotechnology, Uben, Netherlands) с последующим разведением 1 в 500 меченным пероксидазой хрена стрептавидином (Amersham Biosciences, UK), а затем инкубировали с суб-

стратом TMB (KPL, Gaithersburg, USA). Реакцию останавливали добавлением HCl, а поглощение определяли при 450 нм. Активность dAb в отношении TNF приводила к уменьшению связывания TNF и, таким образом, снижала поглощение по сравнению с контролем в виде одного TNF (фиг. 5).

Анализ цитотоксичности для L929

DAb к TNF, идентифицированные посредством подхода с отличающимися минибibliothеками, включая соединения 100 (SEQ ID № 9) и 123 (SEQ ID № 8), также тестировали на способность нейтрализовать цитотоксическую активность TNF в отношении фибробластов L929 мыши (Evans, T. (2000) Molecular Biotechnology 15, 243-248). В кратком изложении клетки L929 помещенные на планшеты для микротитрования инкубировали в течение ночи с dAb к TNF, 100 пг/мл TNF и 1 мг/мл актиномицина D (Sigma, Poole, UK). Жизнеспособность клеток измеряли посредством определения поглощения при 490 нм после инкубации с [3-(4,5-диметилтиазол-2-ид)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфопенил)-2Н-тетразолом (Promega, Madison, USA). Активность dAb к TNF приводила к снижению цитотоксичности TNF и, таким образом, увеличению поглощения по сравнению с контролем в виде одного TNF. Результаты в сравнении с исходным соединением dAb 145 (SEQ ID № 7) представлены на фиг. 6.

Специалистам в данной области понятно, что в отношении изобретения можно осуществлять многочисленные вариации и/или модификации без отклонения от сущности или объема изобретения в широком описании, как показано в конкретных вариантах осуществления. Таким образом, настоящие варианты изобретения во всех отношениях следует считать иллюстративными, а не ограничительными.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Рекомбинантное доменное антитело (dAb), связывающееся с TNF- α человека, где dAb имеет последовательность, выбранную из последовательностей, состоящих из:

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVWRPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID № 8);

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISLLPEDFATYYCQQVWRPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID № 9);

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISLLPEDFATYYCQQVWRPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID № 10);

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKPPKLLIYSASNLETGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVWRPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID № 50);

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFS
GRGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQVWRPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID № 51); и

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISLVPEDFATYYCQQVWRPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID № 52).

2. Рекомбинантное dAb по п.1, где dAb имеет последовательность

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQAIDSYLHWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISLLPEDFATYYCQQVWRPFTFGQGTKVEIKR (SEQ ID № 10).

3. Рекомбинантное dAb по п.1 или 2, где CDR1 и/или CDR3 модифицированы для улучшения связывания антигена.

4. Рекомбинантное dAb по любому из пп.1-3, где dAb обладает низкой иммуногенностью у людей.

5. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая dAb по любому из пп.1-4.

6. Фармацевтическая композиция, содержащая эффективное количество рекомбинантного доменного антитела (dAb) по пп.1-4, совместно с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем.

7. Способ определения TNF- α человека в образце, включающий контактирование образца с эффективным количеством рекомбинантного dAb по любому из пп.1-4 и определения количества связанного dAb.

8. Способ по п.7, где образец представляет собой биологический образец.

9. Способ лечения нарушения у человека, характеризующегося активностью TNF- α человека, включающий введение субъекту эффективного количества фармацевтической композиции по п.6.

10. Способ по п.9, где нарушение, характеризующееся активностью TNF- α человека, выбрано из группы, состоящей из воспаления, воспалительных заболеваний, сепсиса, включая септический шок, эндотоксический шок, сепсис из-за грамотрицательных бактерий и синдром токсического шока; аутоиммунного заболевания, включая ревматоидный артрит, анкилозирующий спондилоартрит, остеоартрит и подагрический артрит, аллергию, рассеянный склероз, аутоиммунный диабет, аутоиммунный увеит и нефротический синдром; инфекционного заболевания, включая лихорадку и миалгию вследствие инфекции и вторичную относительно инфекции кахексию; реакции трансплантат против хозяина; роста

опухолей или метастаз; легочных нарушений, включая синдром расстройства дыхания у взрослых, шоковое легкое, хроническое легочное воспалительное заболевание, легочный саркоидоз, легочный фиброз и силикоз; воспалительных нарушений толстой кишки, включая болезнь Крона и язвенный колит; нарушений сердечной деятельности; воспалительных нарушений костей, гепатита, нарушений свертывания, ожогов, реперфузионного повреждения, келоидного образования и формирования рубцовой ткани.

Список последовательностей

<110> WOOLVEN, Bengamin P.
 TOMLINSON, Ian M.
 LEE, Jennifer A.
 DOYLE, Anthony G.
 JENNINGS, Philip A.

<120> ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ dAB

<130> 229752004000

<140> US 11/659,009
 <141> 2006-12-20

<150> PCT/AU2006/001940
 <151> 2006-12-20

<150> US 60/187,272
 <151> 2006-06-28

<150> AU 2005907124
 <151> 2005-12-20

<160> 77

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Aotus trivirgatus

<400> 1
 Ala Ala Thr Lys Leu Gln Ser
 1 5

<210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Aotus trivirgatus

<400> 2

Glu Ala Ser Ser Leu Gln Ser

1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 3

Glu Ala Ser Lys Leu Gln Ser

1 5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 4

Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr

1 5

<210> 5

<211> 324

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная конструкция

<400> 5

gacatccaga tgaccagtc tccatcctct ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattgat agttatttac attggtacca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatagt gcatccgagt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag gttgtgtggc gtccttttac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaatcaa acgg 324

<210> 6

<211> 108

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная конструкция

<400> 6

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Tyr
          20           25           30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45
Tyr Ser Ala Ser Glu Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro Phe
          85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          100          105

```

<210> 7

<211> 108

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная конструкция

<400> 7

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Tyr
          20           25           30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45
Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro Phe
          85           90           95

```

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная конструкция

<400> 8

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Ile Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro Phe
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 9

<211> 108

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная конструкция

<400> 9

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

017710

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

<210> 10
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтезированная конструкция

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

<210> 11
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтезированная конструкция

<400> 11
 aatckcaggt kccagatg 18

<210> 12
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтезированная конструкция

<400> 12
 gtttyrgggtk gtaaacact 18

<210> 13
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтезированная конструкция

<400> 13
 atgmcttggtw aactgtg 18

<210> 14
 <211> 267
 <212> ДНК
 <213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 14
 gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc ctgactgcat ctgtaggagg caaagtcacc 60
 atcacttgcc gggcgagtca ggacattaac aagtgggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggacagtcc ctaagcccct gatctatgag gcatccaaat tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacatat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatgctg caacttatta ctgtcag 267

<210> 15
 <211> 267
 <212> ДНК
 <213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 15

gacatccaga tgatccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgct gggcaagtca ggggtattagc cactgggtag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatagt gcatcaaatt tagaaacagg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gaagtggatc caggacagat tttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatattg caacatatta ctgtcaa 267

<210> 16

<211> 267

<212> ДНК

<213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 16

gacatccaga tgacccagac tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca ggggtattagc agctgggtag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatggg gcatcaaatt tggaaacagg ggtcccatca 180
 agattcagcg gaagtggatc tgggacagat tttactctca ccatcagcag tctgcagcct 240
 gaagatattg caacatatta ctgtcaa 267

<210> 17

<211> 267

<212> ДНК

<213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 17

gacatccaga tgatccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgct gggcaagtca ggggtattagc cactgggtag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatagt gcatcaaatt taggaacagg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gaagtggatc caggacagat tttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatattg caacatatta ctgtcaa 267

<210> 18

<211> 267

<212> ДНК

<213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 18

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc ctgactgcat ctgtaggagg caaagtcacc 60
 atcacttgcc gggcgtgtca ggacattaac aagtgggtag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggacagtcc ctaagccctc gatctatgag gcatccaaat tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacatat tttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatgctg caacttatta ctgtcag 267

<210> 19
 <211> 267
 <212> ДНК
 <213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 19
 gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagttacc 60
 atcacttgcc gggcgagtc ggacattagc aattatttag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaaactc ctaggctcct gatctatgct gcatccagtt taaaaactgg gattccctct 180
 cggttcagcg gcagtggatc tgggacagac tacactctca ccatcagcag cctgcagctc 240
 gaagatgttg caatttatta ctgtcaa 267

<210> 20
 <211> 267
 <212> ДНК
 <213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 20
 gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc ctgactgcat ctgtaggagg caaagtcacc 60
 atcacttgcc gggcgagtc ggacattaac aagtggtagc cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggacagtcc ctaagcccct gatctatgag gcatccaaat tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggctcagcg gcagtggatc tgggacatat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatgctg caacttatta ctgtcag 267

<210> 21
 <211> 267
 <212> ДНК
 <213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 21
 gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc ctgactgcat ctgtaggagg caaagtcacc 60
 atcacttgcc gggcgagtc ggacattaac aagtggtagc cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggacagtcc ctaagcccct gatctatgag gcatccaaat tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacatat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatgctg caacttatta ctgtcag 267

<210> 22
 <211> 267
 <212> ДНК
 <213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 22
 gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc ctgactgcat ctgtaggagg caaagtcacc 60

gtcacttgcc gggcgagtc ggacattaac aagtggtag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggacagtcc ctaagcccct gatctatgag gcatccaaat tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacatat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatgctg caacttatta ctgtcag 267

<210> 23

<211> 267

<212> ДНК

<213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 23

gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc ctgactgcat ctgtaggagg caaagtcacc 60
 atcacttgcc gggcgagtc ggacattaac aagtggtag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggacagtcc ttaagcccct gatctatgag gcatccaaat tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacatat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatgctg caacttatta ctgtcag 267

<210> 24

<211> 267

<212> ДНК

<213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 24

gacatccaga tgaccagtc tccatcttcc ctgactgcat ctgtaggagg caaagtcacc 60
 atcacttgcc gggcgagtc ggacattaac aagtggtag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggacagtcc ctaagcccct gatctatgag gcatccaaat tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacatat ttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatgctg caacttatta ctgtcag 267

<210> 25

<211> 89

<212> PRT

<213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 25

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Val Pro Lys Pro Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 85

<210> 26

<211> 89

<212> PRT

<213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 26

Asp Ile Gln Met Ile Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Ala Ser Gln Gly Ile Ser His Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 85

<210> 27

<211> 89

<212> PRT

<213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 27

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser 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 Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln

85

<210> 28

<211> 89

<212> PRT

<213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 28

```

Asp Ile Gln Met Ile Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Ala Ser Gln Gly Ile Ser His Trp
          20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45
Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Gly Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
          85

```

<210> 29

<211> 89

<212> PRT

<213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 29

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Cys Gln Asp Ile Asn Lys Trp
          20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Val Pro Lys Pro Leu Ile
          35           40           45
Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
          85

```

<210> 30

<211> 89

<212> PRT

<213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 30

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr
          20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Pro Arg Leu Leu Ile
        35           40           45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
        50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65           70           75           80
Glu Asp Val Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln
          85

```

<210> 31

<211> 89

<212> PRT

<213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 31

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Trp
          20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Val Pro Lys Pro Leu Ile
        35           40           45
Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Leu Ser Gly
        50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
          85

```

<210> 32

<211> 89

<212> PRT

<213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 32

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Ala Ser Val Gly
 1             5             10             15
Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Trp
             20             25             30
Ser Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Val Pro Lys Pro Leu Ile
             35             40             45
Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
             50             55             60
Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65             70             75             80
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
             85

```

<210> 33

<211> 89

<212> PRT

<213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 33

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Ala Ser Val Gly
 1             5             10             15
Gly Lys Val Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Trp
             20             25             30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Val Pro Lys Pro Leu Ile
             35             40             45
Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
             50             55             60
Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65             70             75             80
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
             85

```

<210> 34

<211> 89

<212> PRT

<213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 34

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Val Leu Lys Pro Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 85

<210> 35

<211> 89

<212> PRT

<213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 35

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Val Pro Lys Pro Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Gln Ser Gly Val Pro Leu Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Tyr Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 85

<210> 36

<211> 267

<212> ДНК

<213> Aotus trivirgatus

<400> 36

gacatccaga tgaccagtc tccatccttc ctgtctgcat ctgcaggaga cagagtcacc 60
 atcacctgcc aggtgagtca gggaattagc agtgaattac tctggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctatgctctt gatctatgct gcaaccaaat tgcagtcggg aatcccattct 180

cggttcagtg gccatggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gatgattttg ctacttatta ctgtcaa 267

<210> 37

<211> 267

<212> ДНК

<213> Aotus trivirgatus

<400> 37

gacatccaga tgaccagtc tgcattctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 attacttgcc aggcgagtc gggcattacc agtgatttag cctgggtatca gcaaaagcca 120
 gggaaagcct ctaagctcct gatctatgag gcattccagtt taaaaagcga ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggagagat tttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg taacttatta ctgtcaa 267

<210> 38

<211> 267

<212> ДНК

<213> Aotus trivirgatus

<400> 38

gacatccaga tgaccagac tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcgagtc agacatttac aattatttag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaaactc ctaggctcct gatctatgct gcattccagtt tgcaaaactgg gattccctct 180
 cggttcagtg gcagtggatc tgggacagac tacactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gatgattttg ccacttatta ctgtcaa 267

<210> 39

<211> 267

<212> ДНК

<213> Aotus trivirgatus

<400> 39

gacatccaga tgaccagac tccatcctcc ctgcctgcat ctgtaggaga caaagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtc gggatttagc agctgggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatccataag gcattcaaatt tggaaacagg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat tttactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatatcg caacatatta ctgtcaa 267

<210> 40

<211> 267

<212> ДНК

<213> Aotus trivirgatus

<400> 40

gacatccaga tgacccagtc tccatcttcc ctgactgcat ctgtaggaga caaagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattagc aataatttag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagcccct gatctattat gcatccagtt tgcaaagcgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tggggcagat tacactctca ccaccagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaa 267

<210> 41

<211> 267

<212> ДНК

<213> Aotus trivirgatus

<400> 41

gacaaccaga tgatccagtc tccatcttcc ctgactgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gagccagtc gagtattagc agctgggttag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gggacagtcc ctaagcctct gatctatgac gcatccaaat tgctaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagtg gctgtggatc tgggacagat tttactctca ccaccagcag cctgcagcct 240
 gaagattttg caacttatta ctgtcaa 267

<210> 42

<211> 89

<212> PRT

<213> Aotus trivirgatus

<400> 42

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Ala Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Val Ser Gln Gly Ile Ser Ser Glu
 20 25 30
 Leu Leu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Met Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Thr Lys Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 His Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 85

<210> 43

<211> 89

<212> PRT

<213> Aotus trivirgatus

<400> 43

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Ala Phe Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Gly Ile Thr Ser Asp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ala Ser Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Glu Ala Ser Ser Leu Gln Ser Glu Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Arg Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Val Thr Tyr Tyr Cys Gln
 85

<210> 44

<211> 89

<212> PRT

<213> Aotus trivirgatus

<400> 44

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Tyr Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Thr Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
 85

<210> 45

<211> 89

<212> PRT

<213> Aotus trivirgatus

<400> 45

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Leu Pro Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
          20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45
His Lys Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser 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 Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
          85

```

```

<210> 46
<211> 89
<212> PRT
<213> Aotus trivirgatus

```

```

<400> 46
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Lys Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Asn
          20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Leu Ile
          35           40           45
Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Thr Leu Thr Thr Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
          85

```

```

<210> 47
<211> 89
<212> PRT
<213> Aotus trivirgatus

```

```

<400> 47
Asp Asn Gln Met Ile Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp

```

017710

	20		25		30	
Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys
						Pro
						Gly
						Thr
						Val
						Pro
						Lys
						Pro
						Leu
						Ile

	35		40		45	
Tyr	Asp	Ala	Ser	Lys	Leu	Leu
						Ser
						Gly
						Val
						Pro
						Ser
						Arg
						Phe
						Ser
						Gly

	50		55		60	
Cys	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
						Thr
						Leu
						Thr
						Ile
						Ser
						Ser
						Leu
						Gln
						Pro

	65		70		75	
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr
						Cys
						Gln

	85
--	----

<210> 48
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Aotus trivirgatus

<400> 48
 Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 49
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтезированная конструкция

<400> 49
 Ser Ala Ser Glu Leu Gln Ser
 1 5

<210> 50
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> Синтезированная конструкция

<400> 50

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Tyr
          20           25           30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45
Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro Phe
          85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          100          105

```

<210> 51

<211> 108

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная конструкция

<400> 51

```

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

```

<210> 52

<211> 108

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная конструкция

<400> 52

```

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

```

<210> 53

<211> 324

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Синтезированная конструкция

<400> 53

```

ccgtttgatt tccaccttgg tcccttggcc gaacgtaaaa ggacgccaca caacctgttg 60
acagtagtac gtagcaaaat cttcagggttg cagactgctg atggtgagag tgaaatctgt 120
cccagatcca ctgccactga aacgtgatgg gaccccactt tgcaactcgg atgcactata 180
gatcaggagc ttaggggctt tccctggttt ctgctgggtac caatgtaaat aactatcaat 240
gctctgactt gcccggcaag tgatgggtgac acggtctcct acagatgcag acagagagga 300
tggagactgg gtcattctgga tgtc                                     324

```

<210> 54

<211> 68

<212> ДНК

<213> Aotus trivirgatus

<400> 54

tttacattgg taccagcaga aaccagggaa agcccctaag ctctgatct atgctgcaac 60
 caaattgc 68

<210> 55

<211> 45

<212> ДНК

<213> Aotus trivirgatus

<400> 55

cctgatctat gctgcaacca aattgcagtc ggggggccca tcacg 45

<210> 56

<211> 324

<212> ДНК

<213> Aotus trivirgatus

<400> 56

gacatccaga tgacccagtc tccatctctc ctgtctgcat ctgtaggaga cctgtgcacc 60
 atcaattgcc gggcaagtca gacattgat agttatttac attggtacca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcaaccaaat tgcagtcggg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag gttgtgtggc gtccttttac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaatcaa acgg 324

<210> 57

<211> 68

<212> ДНК

<213> Aotus trivirgatus

<400> 57

tttacattgg taccagcaga aaccagggaa agcccctaag ctctgatct atgaggcatc 60
 cagtttac 68

<210> 58

<211> 45

<212> ДНК

<213> Aotus trivirgatus

<400> 58

cctgatctat gaggcacca gtttacaag cgggggccca tcacg 45

<210> 59

<211> 324

<212> ДНК

<213> Aotus trivirgatus

<400> 59

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattgat agttatttac attggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgag gcatccagtt tacaaagcgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag gttgtgtggc gtccttttac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg                                     324
```

<210> 60

<211> 68

<212> ДНК

<213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 60

```
tttacattgg taccagcaga aaccagggaa agcccctaag ctctgatct atgaggcatc 60
caaattgc                                     68
```

<210> 61

<211> 45

<212> ДНК

<213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 61

```
cctgatctat gaggcacca aattgcaaag tggggtccca tcacg                                     45
```

<210> 62

<211> 324

<212> ДНК

<213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 62

```
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gagcattgat agttatttac attggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatctatgag gcatccaaat tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag gttgtgtggc gtccttttac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg                                     324
```

<210> 63
 <211> 68
 <212> ДНК
 <213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 63
 ttacattgg taccagcaga aaccagggaa agccctaag ctctgatct atagtgcac 60
 aaatttag 68

<210> 64
 <211> 45
 <212> ДНК
 <213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 64
 cctgatctat agtgcacaa atttagaac aggggtccca tcacg 45

<210> 65
 <211> 324
 <212> ДНК
 <213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 65
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattgat agttatttac attggtacca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatagt gcatcaaatt tagaaacagg ggtcccatca 180
 cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag gttgtgtggc gtccttttac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa acgg 324

<210> 66
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Aotus trivirgatus

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> 1
 <223> Хаа = Любая аминокислота

<400> 66
 Хаа Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
 1 5 10 15

Ile Tyr Ala Ala Thr Lys Leu
20

<210> 67
<211> 15
<212> PRT
<213> Aotus trivirgatus

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 1
<223> Хаа = Любая аминокислота

<400> 67
Xaa Leu Ile Tyr Ala Ala Thr Lys Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
1 5 10 15

<210> 68
<211> 108
<212> PRT
<213> Aotus trivirgatus

<400> 68
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Tyr
20 25 30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Thr Lys Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 69
<211> 23

<212> PRT

<213> Aotus trivirgatus

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 1

<223> Хаа = Любая аминокислота

<400> 69

Хаа Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu

1

5

10

15

Ile Tyr Glu Ala Ser Ser Leu

20

<210> 70

<211> 15

<212> PRT

<213> Aotus trivirgatus

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 1

<223> Хаа = Любая аминокислота

<400> 70

Хаа Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser

1

5

10

15

<210> 71

<211> 108

<212> PRT

<213> Aotus trivirgatus

<400> 71

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1

5

10

15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Tyr

20

25

30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Glu Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

017710

50		55		60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro				
65		70		75
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro Phe				80
	85		90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg				
100		105		

<210> 72
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Callithrix, вид неизвестен

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> 1
 <223> Хаа = Любая аминокислота

<400> 72
Хаа Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
1 5 10 15
Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu
20

<210> 73
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Callithrix, вид неизвестен

<220>
 <221> ВАРИАНТ
 <222> 1
 <223> Хаа = Любая аминокислота

<400> 73
Хаа Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
1 5 10 15

<210> 74
 <211> 108

<212> PRT

<213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 74

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1             5             10             15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Tyr
          20             25             30
Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35             40             45
Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro Phe
          85             90             95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
          100             105

```

<210> 75

<211> 24

<212> PRT

<213> Callithrix, вид неизвестен

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 1

<223> Хаа = Любая аминокислота

<400> 75

```

Хаа Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu
 1             5             10             15
Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Leu
          20

```

<210> 76

<211> 16

<212> PRT

<213> Callithrix, вид неизвестен

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 1, 16

<223> Xaa = Любая аминокислота

<400> 76

Xaa Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Xaa

1 5 10 15

<210> 77

<211> 108

<212> PRT

<213> Callithrix, вид неизвестен

<400> 77

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp Ser Tyr

20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Val Trp Arg Pro Phe

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

100 105

1 GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCA TCC TCT CTG TCT GCA TCT GTA 45
 1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val 15
 46 GGA GAC CGT GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG AGC ATT GAT 90
 16 Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Asp 30
 91 AGT TAT TTA CAT TGG TAC CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCC CCT AAG 135
 31 Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys 45
 136 CTC CTG ATC TAT AGT GCA TCC GAG TTG CAA AGT GGG GTC CCA TCA 180
 46 Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Glu Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser 60
 181 CGT TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC 225
 61 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile 75
 226 AGC AGT CTG CAA CCT GAA GAT TTT GCT ACG TAC TAC TGT CAA CAG 270
 76 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln 90
 271 GTT GTG TGG CGT CCT TTT ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA 315
 91 Val Val Trp Arg Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu 105
 316 ATC AAA CGG 324
 106 Ile Lys Arg

Фиг. 1

Последовательности игрунок

Нуклеотидная последовательность игрушки 1 (SEQ ID № 14)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGGCAAAGTCACCATC
 ACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTAACAAGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGACA
 GTCCCTAAGCCCTGATCTATGAGGCATCCAAATTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGC
 GGCAGTGGATCTGGGACATATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGCTGCA
 ACTTATTACTGTCAG

Нуклеотидная последовательность игрушки 2 (SEQ ID № 15)

GACATCCAGATGATCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATC
 ACTTGCTGGGCAAGTCAGGGTATTAGCCACTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA
 GCCCCAAGCTCCTGATCTATAGTGCATCAAATTTAGAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAGT
 GGAAGTGGATCCAGGACAGATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCA
 ACATATTACTGTCAA

Нуклеотидная последовательность игрушки 3 (SEQ ID № 16)

GACATCCAGATGACCCAGACTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATC
 ACTTGCCGGGCAAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA
 GCCCCAAGCTCCTGATCTATGGGGCATCAAATTTGGAACAGGGGTCCCATCAAGATTCAGC
 GGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTCTCACCATCAGCAGCTGCAGCCTGAAGATATTGCA
 ACATATTACTGTCAA

Нуклеотидная последовательность игрушки 4 (SEQ ID № 17)

GACATCCAGATGATCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATC
 ACTTGCTGGGCAAGTCAGGGTATTAGCCACTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA
 GCCCCAAGCTCCTGATCTATAGTGCATCAAATTTAGGAACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAGT
 GGAAGTGGATCCAGGACAGATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATTGCA
 ACATATTACTGTCAA

Нуклеотидная последовательность игрушки 5 (SEQ ID № 18)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGGCAAAGTCACCATC
 ACTTGCCGGGCGTGTGAGGACATTAACAAGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGACA
 GTCCCTAAGCCCTGATCTATGAGGCATCCAAATTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGC
 GGCAGTGGATCTGGGACATATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGCTGCA
 ACTTATTACTGTCAG

Нуклеотидная последовательность игрушки 6 (SEQ ID № 19)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTTACCATC
ACTTGCCGGGCGAGTCAGGGCATTAGTAATTATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA
ACTCCTAGGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTACAACTGGGATTCCTCTCGGTTGAGC
GGCAGTGGATCTGGGACAGACTACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATGTTGCA
ATTTATTACTGTCAA

Нуклеотидная последовательность игрушки 7 (SEQ ID № 20)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGGCAAAGTCACCATC
ACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTAACAAGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGACA
GTCCCTAAGCCCTGATCTATGAGGCATCCAAATTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGCTCAGC
GGCAGTGGATCTGGGACATATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGCTGCA
ACTTATTACTGTGTCAG

Нуклеотидная последовательность игрушки 8 (SEQ ID № 21)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGGCAAAGTCACCATC
ACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTAACAAGTGGTCAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGACA
GTCCCTAAGCCCTGATCTATGAGGCATCCAAATTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTGAGC
GGCAGTGGATCTGGGACATATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGCTGCA
ACTTATTACTGTGTCAG

Нуклеотидная последовательность игрушки 9 (SEQ ID № 22)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGGCAAAGTCACCGTC
ACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTAACAAGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGACA
GTCCCTAAGCCCTGATCTATGAGGCATCCAAATTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTGAGC
GGCAGTGGATCTGGGACATATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGCTGCA
ACTTATTACTGTGTCAG

Нуклеотидная последовательность игрушки 10 (SEQ ID № 23)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGGCAAAGTCACCATC
ACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTAACAAGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGACA
GTCCCTAAGCCCTGATCTATGAGGCATCCAAATTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTGAGC
GGCAGTGGATCTGGGACATATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGCTGCA
ACTTATTACTGTGTCAG

Нуклеотидная последовательность игрушки 11 (SEQ ID № 24)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGGCAAAGTCACCATC
ACTTGCCGGGCGAGTCAGGACATTAACAAGTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGACA
GTCCCTAAGCCCTGATCTATGAGGCATCCAAATTGCAAAGTGGGGTCCCATTAAGGTTGAGC
GGCAGTGGATCTGGGACATATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGCTGCA
ACTTATTACTGTGTCAG

Аминокислотная последовательность игрушки 1 (SEQ ID № 25)

DIQMTQSPSSLTASVGGKVTITCRASQDINKWLAWYQQKPGTVPKPLIYEASKLQSGVPSRFS
GSGSGTYFTLTISSLQPEDAATYYCQ

Аминокислотная последовательность игрушки 2 (SEQ ID № 26)

DIQMIQSPSSLSASVGDVRTITCWASQGISHWLAWYQQKPGKAPKLLIYSASNLETGVPSRFS
GSGSRTDFTLTISSLQPEDIATYYCQ

Аминокислотная последовательность игрушки 3 (SEQ ID № 27)

DIQMTQTPSSLSASVGDVRTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYGASNLETGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSLQPEDIATYYCQ

Аминокислотная последовательность игрушки 4 (SEQ ID № 28)

DIQMIQSPSSLSASVGDVRTITCWASQGISHWLAWYQQKPGKAPKLLIYSASNLGTGVPSRFS
GSGSRTDFTLTISSLQPEDIATYYCQ

Аминокислотная последовательность игрушки 5 (SEQ ID № 29)

DIQMTQSPSSLTASVGGKVTITCRACQDINKWLAWYQQKPGTVPKPLIYEASKLQSGVPSRFS
GSGSGTYFTLTISSLQPEDAATYYCQ

Аминокислотная последовательность игрушки 6 (SEQ ID № 30)

DIQMTQSPSSLSASVGDVRTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKTPRLLIYAASSLQTGIPSRFS
GSGSGTDYTLTISSLQSEDVAIYYCQ

Аминокислотная последовательность игрушки 7 (SEQ ID № 31)

DIQMTQSPSSLTASVGGKVTITCRASQDINKWLAWYQQKPGTVPKPLIYEASKLQSGVPSRFS
GSGSGTYFTLTISSLQPEDAATYYCQ

Аминокислотная последовательность игрушки 8 (SEQ ID № 32)

DIQMTQSPSSLTASVGGKVTITCRASQDINKWSAWYQQKPGTVPKPLIYEASKLQSGVPSRFS
GSGSGTYFTLTISSLQPEDAATYYCQ

Аминокислотная последовательность игрушки 9 (SEQ ID № 33)

DIQMTQSPSSLTASVGGKVTITCRASQDINKWLAWYQQKPGTVPKPLIYEASKLQSGVPSRFS
GSGSGTYFTLTISSLQPEDAATYYCQ

Аминокислотная последовательность игрушки 10 (SEQ ID № 34)

DIQMTQSPSSLTASVGGKVTITCRASQDINKWLAWYQQKPGTVLKPLIYEASKLQSGVPSRFS
GSGSGTYFTLTISSLQPEDAATYYCQ

Аминокислотная последовательность игрушки 11 (SEQ ID No:35)

DIQMTQSPSSLTASVGGKVITICRASQDINKWLAWYQQKPGTVPKPLIYEASKLQSGVPLRFS
GSGSGTYFTLTISLQPEDAATYYCQ

Последовательности трехполосной дурукули

Нуклеотидная последовательность трехполосной дурукули 1 (SEQ ID № 36)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTTCCCTGTCTGCATCTGCAGGAGACAGAGTCACCATC
ACCTGCCAGGTGAGTCAGGGAATTAGCAGTGAATTACTCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA
GCCCCATATGCTCTTGATCTATGCTGCAACCAATTGCAGTCGGGAATCCCATCTCGGTTCACT
GGCCATGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCT
ACTTATTACTGTCAA

Нуклеотидная последовательность трехполосной дурукули 2 (SEQ ID № 37)

GACATCCAGATGACCCAGTCTGCATTCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATC
ACTTGCCAGGCGAGTCAGGGCATTACCACTGATTTAGCCTGGTATCAGCAAAAGCCAGGGAAC
GCCTCTAAGCTCCTGATCTATGAGGCATCCAGTTTACAAAGCGAGGTCCCATCAAGGTTCACT
GGCAGTGGATCTGGGAGAGATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGTA
ACTTATTACTGTCAA

Нуклеотидная последовательность трехполосной дурукули 3 (SEQ ID № 38)

GACATCCAGATGACCCAGACTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATC
ACTTGCCGGGCGAGTCAAGACATTTACAATTATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA
ACTCCTAGGCTCTTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGATTCCTCTCGGTTCACT
GGCAGTGGATCTGGGACAGACTACACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCC
ACTTATTACTGTCAA

Нуклеотидная последовательность трехполосной дурукули 4 (SEQ ID No:39)

GACATCCAGATGACCCAGACTCCATCCTCCCTGCCTGCATCTGTAGGAGACAAAGTCACCATC
ACTTGCCGGGCAAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA
GCCCCTAAGCTCCTGATCCATAAGGCATCAAATTTGGAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTCACT
GGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATATCGCA
ACATATTACTGTCAA

Нуклеотидная последовательность трехполосной дурукули 5 (SEQ ID No:40)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGACAAAGTCACCATC
ACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAATAATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAA
GCCCCTAAGCCCCCTGATCTATTATGCATCCAGTTTGCAAAGCGGGGTCCCATCAAGGTTCACT
GGCAGTGGATCTGGGGCAGATTACACTCTCACCACCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCA
ACTTATTACTGTCAA

Нуклеотидная последовательность трехполосной дурукули 6 (SEQ ID № 41)

GACAACCAGATGATCCAGTCTCCATCTTCCCTGACTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATC
ACTTGCCGAGCCAGTCAGAGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGACA
GTCCCTAAGCCTCTGATCTATGACGCATCCAAATTGCTAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGT
GGCTGTGGATCTGGGACAGATTTTACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCA
ACTTATTACTGTCAA

Аминокислотная последовательность трехполосной дурукули 1 (SEQ ID № 42)

DIQMTQSPSFLSASAGDRVITTCQVSQGISSELLWYQQKPGKAPMLLIYAATKLQSGIPSRFS
GHGSGTDFTLTISSLQPDDFATYYCQ

Аминокислотная последовательность трехполосной дурукули 2 (SEQ ID № 43)

DIQMTQSAFSLSASVGDRTITCQASQGITSDLAWYQQKPGNASKLLIYEASSLQSEVPSRFS
GSGSGRDTLTISSLQPEDFVTYYCQ

Аминокислотная последовательность трехполосной дурукули 3 (SEQ ID № 44)

DIQMTQTPSSLSASVGDRTITCRASQDIYNYLAWYQQKPGKTPRLLIYAASSLQTGIPSRFS
GSGSGTDYTLTISSLQPDDFATYYCQ

Аминокислотная последовательность трехполосной дурукули 4 (SEQ ID № 45)

DIQMTQTPSSLPASVGDKVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIHKASNLETGVPSRFS
GSGSGTDFTLTISSLQPEDIAATYYCQ

Аминокислотная последовательность трехполосной дурукули 5 (SEQ ID № 46)

DIQMTQSPSSLTASVGDKVTITCRASQGISNNLAWYQQKPGKAPKPLIYYASSLQSGVPSRFS
GSGSGADYTLTTSSSLQPEDFATYYCQ

Аминокислотная последовательность трехполосной дурукули 6 (SEQ ID № 47)

DNQMIQSPSSLTASVGDRVITTCRASQSISSWLAWYQQKPGTVPKPLIYDASKLLSGVPSRFS
GCGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQ

Фиг. 2

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q
 1 GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCTCTGTGTCATCTGTAGGAGACCGTGTCCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCA 80
 1 CTGTAGGTCTACTGGGTCAGAGGTAGGAGAGACAGACGTAGACATCCTCTGGCACAGTGGTAGTGAACGGCCCGTTCAST 80

 S I D S Y L H W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S E
 81 GAGCATTGATAGTTATTTACATTGGTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATAGTGCATCCGAGT 160
 81 CTCGTAACATATCAATAAATGTAAACATGGTCGTCTTTGGTCCCTTTCGGGGATTTCGAGGACTAGATATCACGTAGGCTCA 160

 KpnI

L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
 161 TGCAAAAGTGGGCTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGCATCTGGCAGAGATTTCACCTCTCACCATCACCACTCTGCAACCT 240
 161 ACGTTTCACCCAGGGTAGTGCAAAAGTCACCGTCACCTAGACCCCTGTCTAAAGTGAGAGTGGTAGTCGTCAGACGTTGGA 240

 SanDI

 E D F A T Y Y C Q Q V V W R P F T F G Q G T K V E I K
 241 GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGGTTGTGTGGCGTCCTTTTACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAA 320
 241 CTCTTAAAACGATGCATGATGACAGTTGTCCACACACCGCAGGAAAATGCAAGCCGGTTCCTGGTTCCACCTTTAGTT 320

 R
 321 ACGG 324
 321 TGCC 324

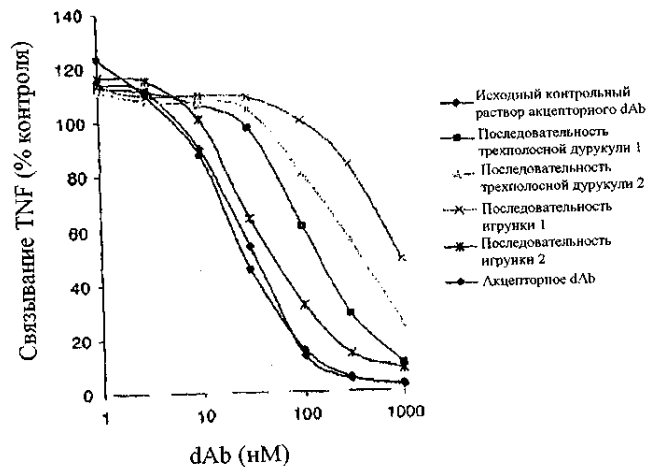
Фиг. 3

- 48 -

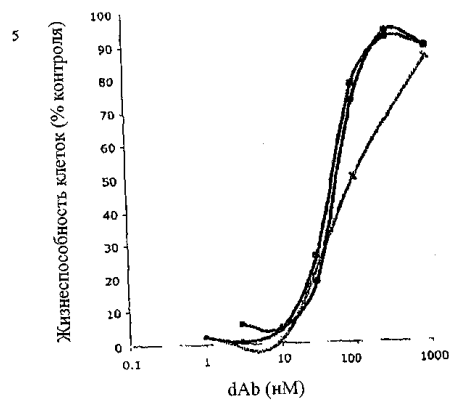
Последовательность пептидного dAb	DQMTQSPGSLGASVDRVTTTCRAQSISIDYLNHTQOKP-KAPKLLIYSAGELQSVFRRSSSGSTOTPTLTSSLP
Последовательность трепалосной дурукуи 1	E...A...QV...G...S...E...L...M...A...TK...I...H...
Генетическая последовательность трепалосной дурукуи 1	X...A...TK...
Обратная генетическая последовательность трепалосной дурукуи 1	X...A...TK...
Последовательность трепалосной дурукуи 2	...T...D...A...M...S...E...R...
Генетическая последовательность трепалосной дурукуи 2	X...E...S...
Обратная генетическая последовательность трепалосной дурукуи 2	X...E...S...
Последовательность ивруки 1	...G...K...D...M...A...TV...P...E...K...Y...
Генетическая последовательность ивруки 1	X...E...K...
Обратная генетическая последовательность ивруки 1	X...E...K...
Последовательность ивруки 2	...I...M...H...S...H...A...N...E...T...R...
Генетическая последовательность ивруки 2	X...N...E...T...
Обратная генетическая последовательность ивруки 2	X...N...E...T...
Последовательность остатков у ивруки	X...N...E...T...

Последовательность пептидного dAb	EDPATTTICQGVNRPFTFGQTEKVEIKR
Последовательность трепалосной дурукуи 1	D...
Генетическая последовательность трепалосной дурукуи 1	
Обратная генетическая последовательность трепалосной дурукуи 1	
Последовательность трепалосной дурукуи 2	V...
Генетическая последовательность трепалосной дурукуи 2	
Обратная генетическая последовательность трепалосной дурукуи 2	
Последовательность ивруки 1	
Генетическая последовательность ивруки 1	
Обратная генетическая последовательность ивруки 1	
Последовательность остатков у ивруки 1	
Последовательность ивруки 2	
Генетическая последовательность ивруки 2	
Обратная генетическая последовательность ивруки 2	
Последовательность остатков у ивруки 2	

Фиг. 4В



Фиг. 5



Фиг. 6

