



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/357 (2021.05); A61K 47/65 (2021.05); A61K 47/6803 (2021.05); A61K 47/6849 (2021.05); A61K 47/6889 (2021.05); A61P 35/00 (2021.05); C07K 16/28 (2021.05); C07K 16/30 (2021.05); C07K 16/32 (2021.05); C07K 2317/14 (2021.05); C07K 2317/40 (2021.05); C07K 2317/565 (2021.05); C07K 2317/77 (2021.05); C07K 2317/92 (2021.05)

(21)(22) Заявка: 2018134331, 02.03.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
02.03.2017Дата регистрации:
01.09.2021

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
02.03.2016 US 62/302,562

(43) Дата публикации заявки: 02.04.2020 Бюл. № 10

(45) Опубликовано: 01.09.2021 Бюл. № 25

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 02.10.2018(86) Заявка РСТ:
US 2017/020529 (02.03.2017)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2017/151979 (08.09.2017)Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ЭЛБОН Эрл Ф. (US),
ЧЭН Синь (US),
КАСТАР Даниэль В. (US),
ФУРУУТИ Кеидзи (US),
ЛИ Цзин (US),
МАДЖУМДЕР Утпал (US),
УЕНАКА Тосимицу (US)

(73) Патентообладатель(и):

ЭЙСАЙ Ар ЭНД Ди МЕНЕДЖМЕНТ КО.,
ЛТД. (JP)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2014089335 A2, 12.06.2014.
ZHENG W. et al. Macrocyclic ketone analogues
of halichondrin B, BIOORG. & MED. CHEM.
LETTERS, 2004, v. 14, n. 22, p. 5551-5554.
NARAYAN S. et al. Novel second generation
analogs of eribulin. Part II: Orally available and
active against resistant tumors in vivo, BIOORG.
& MED. CHEM. LETTERS, 2011, v. 21, n. 6, p.
(см. прод.)

(54) КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО НА ОСНОВЕ ЭРИБУЛИНА И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к области биотехнологии, а именно к конъюгату типа антитело-лекарственное средство, и может быть использовано в медицине. Изобретение позволяет получить конъюгат антитела (или его Fab-фрагмента) к рецептору фолиевой кислоты альфа с эрибулином — противоопухолевым агентом, ингибирующим фазу роста микротрубочек в ходе

митотического деления клеток. Фрагмент антитела в составе конъюгата по настоящему изобретению способствует направленной доставке терапевтического агента (эрибулина) к клеткам опухоли-мишени в организме пациента. Изобретение может быть применимо в качестве лекарственного средства в терапии злокачественных новообразований, клетки

которых сверхэкспрессируют рецептор фолиевой кислоты, например, при лечении рака яичников

или опухолей эпителиального происхождения. 8 н. и 36 з.п. ф-лы, 23 ил., 50 табл., 4 пр.

(56) (продолжение):

1634-1638. DIAMANTIS N. et al. Antibody-drug conjugates - an emerging class of cancer treatment, BRITISH JOURNAL OF CANCER, 2016, v. 114, n. 4, p. 362-367. RU 2576027 C2, 27.02.2016. RU 2487877 C2, 20.07.2013.

R U 2 7 5 4 3 6 9 C 2

R U 2 7 5 4 3 6 9 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 31/357 (2021.05); A61K 47/65 (2021.05); A61K 47/6803 (2021.05); A61K 47/6849 (2021.05); A61K 47/6889 (2021.05); A61P 35/00 (2021.05); C07K 16/28 (2021.05); C07K 16/30 (2021.05); C07K 16/32 (2021.05); C07K 2317/14 (2021.05); C07K 2317/40 (2021.05); C07K 2317/565 (2021.05); C07K 2317/77 (2021.05); C07K 2317/92 (2021.05)

(21)(22) Application: **2018134331, 02.03.2017**(24) Effective date for property rights:
02.03.2017Registration date:
01.09.2021

Priority:

(30) Convention priority:
02.03.2016 US 62/302,562(43) Application published: **02.04.2020 Bull. № 10**(45) Date of publication: **01.09.2021 Bull. № 25**(85) Commencement of national phase: **02.10.2018**(86) PCT application:
US 2017/020529 (02.03.2017)(87) PCT publication:
WO 2017/151979 (08.09.2017)Mail address:
**129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**ALBONE, Earl, F. (US),
CHENG, Xin (US),
CUSTAR, Daniel, W. (US),
FURUUCHI, Keiji (US),
LI, Jing (US),
MAJUMDER, Utpal (US),
UENAKA, Toshimitsu (US)**

(73) Proprietor(s):

EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (JP)(54) **ANTIBODY-DRUG CONJUGATES BASED ON ERIBULIN AND APPLICATION METHODS**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology; medicine.

SUBSTANCE: present invention relates to the field of biotechnology, namely to a conjugate of antibody-drug type, it can be used in medicine. The invention makes it possible to obtain a conjugate of an antibody (or its Fab fragment) to the folic acid alpha receptor with eribulin, an antitumor agent that inhibits the growth phase of microtubules during mitotic cell division. The antibody fragment in the composition of the conjugate

according to the present invention contributes to the targeted delivery of a therapeutic agent (eribulin) to the target tumor cells in the patient's body.

EFFECT: invention can be used as a drug in the treatment of malignant neoplasms which cells overexpress the folic acid receptor, for example, in the treatment of ovarian cancer or tumors of epithelial origin.

44 cl, 23 dwg, 50 tbl, 4 ex

[0001] Данная заявка заявляет преимущество приоритета предварительной патентной заявки США №62/302,562, поданной 2-го марта 2016 года, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

[0002] Данное изобретение относится к конъюгатам антитело-лекарственное средство (ADC), которые связывают онкологические антигенные цели (мишени) человека, такие как рецептор фолиевой кислоты альфа и/или обеспечивают активность антитубулинового лекарственного средства. Данное изобретение дополнительно относится к способам и композициям, полезным для лечения и диагностики злокачественных новообразований, которые экспрессируют рецептор фолиевой кислоты альфа и/или поддаются лечению путем разрушения тубулина.

[0003] Рак является одной из ведущих причин заболеваемости и смертности во всем мире, с, приблизительно, 14 миллионов новых случаев заболевания и 8,2 миллиона смертей связанных с раком в 2012 году. Наиболее распространенной причиной смерти от рака является рак: легких (1,59 миллиона смертей); печени (745000 смертей); желудка (723000 смертей); колоректальный рак (694000 смертей); груди (521000 смертей); и пищевода (400000 смертей). Ожидается, что в течение следующих двух десятилетий число новых случаев заболеваемости раком возрастет на около 70%, до около 22 миллионов новых случаев заболеваемости раком в год (World Cancer Report 2014 год).

[0004] Микротрубочки представляют собой динамические нитевидные цитоскелетные белки, которые участвуют в различных клеточных функциях, включая внутриклеточную миграцию и транспорт, клеточную сигнализацию и поддержание формы клеток. Микротрубочки также играют важную роль в делении митотических клеток, образуя митотическое веретено, необходимое для сегрегации хромосом на две дочерних клетки. Биологические функции микротрубочек во всех клетках в значительной степени регулируются их динамикой полимеризации, которая происходит путем обратимого нековалентного добавления димеров α и β тубулина на обоих концах микротрубочек. Такое динамическое поведение и получающийся в результате контроль над длиной микротрубочек имеют жизненно важное значение для правильного функционирования митотического веретена. Даже незначительное изменение динамики микротрубочек может запускать контрольную точку сборки веретена деления, блокировать прогрессию клеточного цикла при митозе и впоследствии привести к гибели клеток (Muhtar и соавт. (2014 год) Mol. Cancer Ther. 13:275-84). Из-за быстрого деления клеток раковые клетки обычно более чувствительны к соединениям, которые связываются с тубулином и нарушают его нормальную функцию по сравнению с нормальными клетками. По этой причине ингибиторы тубулина и другие агенты, нацеленные на микротрубочки, стали многообещающим классом лекарственных средств для лечения рака (Dumontet and Jordan (2010 год) Nat. Rev. Drug Discov. 9:790-803).

[0005] Рецептор фолиевой кислоты альфа (FRA) представляет собой гликофосфатидилинозитол (ГФИ)-связанный мембранный белок, который связывает фолат. В то время как роль FRA в биологии нормальной и раковой ткани еще не полностью понята, он сверхэкспрессируется в большом количестве злокачественных новообразований яичников эпителиального происхождения (O'Shannessy и соавт. (2013 год) Int. J. Gynecol. Pathol. 32(3):258-68), а также в определенном проценте немелкоклеточных карцином легких (Christoph и соавт. (2014 год) Clin. Lung Cancer 15 (5):320-30). FRA также обладает ограниченной экспрессией в нормальных тканях. Эти свойства делают FRA привлекательной целью для иммунотерапии рака.

[0006] Протоонкоген рецептора человеческого эпидермального фактора роста 2 типа (HER2) кодирует трансмембранный рецептор тирозинкиназы, который принадлежит

к семейству рецепторов человеческого эпидермального фактора роста (EGFR) (King и соавт. (1985 год) Science 229:974-6). Сверхэкспрессия HER2 обеспечивает конститутивную активацию сигнальных путей фактора роста, таких как путь PI3K-AKT-mTOR, и, таким образом, служит онкогенным фактором при нескольких видах рака, включая

5 приблизительно 20% инвазивных карцином молочной железы. (Slamon и соавт. (1989 год) Science 244:707-12; Gajria and Chandarlapaty (2011 год) Expert Rev. Anticancer Ther. 11:263-75). Учитывая, что амплификация HER2 опосредует трансформированный фенотип, HER2 является еще одной перспективной целью для лечения рака.

[0007] Данное изобретение, в частности, обеспечивает новые соединения с

10 биологической активностью против опухолевых клеток. Соединения могут ингибировать рост опухоли у млекопитающих и могут быть полезны для лечения пациентов, страдающих от рака.

[0008] Данное изобретение более конкретно относится к веществам конъюгат антитело-лекарственное средство, которые способны связывать, поглощать и убивать

15 опухолевые клетки (например, опухолевые клетки, экспрессирующие FRA). Описаны конъюгаты антитело-лекарственное средство, содержащие линкер, который прикрепляет лекарственный фрагмент к фрагменту антитела. Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) могут быть представлены Формулой I:



20 в которой Ab представляет собой интернализирующееся антитело или его интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент, который нацелен на опухолевую клетку;

D представляет собой эрибулин;

L представляет собой расщепляемый линкер, который ковалентно присоединяет Ab

25 к D; а также

p представляет собой целое число от 1 до 20.

[0009] В некоторых вариантах реализации изобретения линкер стабилен вне клетки, так что ADC остается интактным, в случае если он присутствует во внеклеточных

30 условиях, но способен расщепляться при интернализации в клетке, например, раковой клетке. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент лекарственного средства эрибулина отщепляется от фрагмента антитела, в случае если ADC входит в клетку, которая экспрессирует антиген, специфичный к фрагменту антитела ADC, и расщепление высвобождает немодифицированную форму эрибулина. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит расщепляемый фрагмент, который

35 расположен так, что часть линкера или фрагмента антитела не остается связанной с эрибулиновым фрагментом лекарственного средства при расщеплении.

[0010] В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент в линкере представляет собой расщепляемый пептидный фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения ADC, который содержит расщепляемый пептидный

40 фрагмент, демонстрирует более низкие уровни агрегации, улучшенное соотношение антитело:лекарственное средство, увеличение целевого уничтожения раковых клеток, уменьшение нецелевого уничтожения не раковых клеток и/или более высокое содержание лекарственного средства (p) относительно ADC, который содержит альтернативный расщепляемый фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения добавление

45 расщепляемого фрагмента увеличивает цитотоксичность и/или активность по сравнению с нерасщепляемым линкером. В некоторых вариантах реализации изобретения повышенная активность и/или цитотоксичность присутствует в раке, экспрессирующем умеренные уровни антигена, являющегося целью фрагмента антитела ADC (например,

умеренная экспрессия FRA). В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый пептидный фрагмент расщепляется ферментом, а линкер представляет собой расщепляемый ферментом линкер. В некоторых вариантах реализации изобретения фермент представляет собой катепсин, а линкер представляет собой расщепляемый катепсином линкер. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый ферментом линкер (например, расщепляемый катепсином линкер) проявляет одно или более улучшенных свойств, упомянутых выше, по сравнению с альтернативным механизмом расщепления.

[0011] В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый пептидный фрагмент в линкере содержит аминокислотную единицу. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная единица содержит валин-цитруллин (Val-Cit). В некоторых вариантах реализации изобретения ADC, который включает в себя Val-Cit, демонстрирует повышенную стабильность, уменьшение нецелевого уничтожения клеток, увеличение целевого уничтожения клеток, снижение уровней агрегации и/или более высокое содержание лекарственного средства по сравнению с ADC, который содержит альтернативную аминокислотную единицу или альтернативный расщепляемый фрагмент.

[0012] В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит, по меньшей мере, одну спейсерную единицу, соединяющую фрагмент антитела с отщепляемым фрагментом. В некоторых вариантах реализации изобретения спейсерная единица в линкере может содержать по меньшей мере один фрагмент полиэтиленгликоля (ПЭГ). ПЭГ-фрагмент может, например, содержать $-(\text{ПЭГ})_m-$, где m представляет собой целое число от 1 до 10. В некоторых вариантах реализации изобретения спейсерная единица в линкере содержит $(\text{ПЭГ})_2$. В некоторых вариантах реализации изобретения ADC, который содержит более короткую спейсерную единицу (например, $(\text{ПЭГ})_2$), демонстрирует более низкие уровни агрегации и/или более высокое содержание лекарственного средства по сравнению с ADC, который содержит более длинную спейсерную единицу (например, $(\text{ПЭГ})_8$), несмотря на более короткую длину линкера.

[0013] В некоторых вариантах реализации изобретения спейсерная единица в линкере присоединяется к фрагменту антитела ADC через малеимидный фрагмент (Mal). В некоторых вариантах реализации изобретения ADC, который содержит линкер, присоединенный к фрагменту антитела через Mal, демонстрирует более высокое содержание лекарственного средства по сравнению с ADC, который содержит линкер, присоединенный к фрагменту антитела через альтернативный фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения Mal в линкере реагирует с остатком цистеина на фрагменте антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения Mal в линкере соединен с фрагментом антитела через остаток цистеина. В некоторых вариантах реализации изобретения Mal-спейсерная единица содержит ПЭГ-фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит $\text{Mal}-(\text{ПЭГ})_m$, например, $\text{Mal}-(\text{ПЭГ})_2$. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит $\text{Mal}-(\text{ПЭГ})_2$. В некоторых вариантах реализации изобретения Mal-спейсерная единица прикрепляет фрагмент антитела к отщепляемому фрагменту в линкере. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент в линкере представляет собой расщепляемый пептидный фрагмент, например, аминокислотную единицу. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит $\text{Mal}-(\text{ПЭГ})_2$ -Val-Cit.

[0014] В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент в линкере непосредственно соединяется с эрибулиновым фрагментом лекарственного

средства ADC, и расщепляемый фрагмент либо непосредственно связан с фрагментом антитела, либо связан через спейсерную единицу. В некоторых вариантах реализации изобретения спейсерная единица также прикрепляет расщепляемый фрагмент в линкере к эрибулиновому фрагменту лекарственного средства. В некоторых вариантах реализации изобретения спейсерная единица, которая прикрепляет расщепляемый фрагмент в линкере к эрибулиновому фрагменту лекарственного средства, является саморасщепляющейся. В некоторых вариантах реализации изобретения саморасщепляющийся спейсер способен высвобождать немодифицированный эрибулин в целевой клетке. В некоторых вариантах реализации изобретения саморасщепляющаяся единица содержит п-аминобензиловый спирт. В некоторых вариантах реализации изобретения саморасщепляющаяся спейсерная единица содержит п-аминобензилоксикарбонил (pAB). pAB в линкере, в некоторых вариантах реализации изобретения, прикрепляет расщепляемый фрагмент к эрибулиновому фрагменту лекарственного средства. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент представляет собой расщепляемый пептидный фрагмент, например, аминокислотную единицу. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Val-Cit-pAB. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Val-Cit-pAB и спейсерную единицу ПЭГ, соединяющую линкер с фрагментом антитела через Mal.

[0015] В некоторых вариантах реализации изобретения r представляет собой целое число от 1 до 6, от 2 до 5 или, предпочтительно, от 3 до 4. В некоторых вариантах реализации изобретения r представляет собой 4. В некоторых вариантах реализации изобретения предоставляется пул ADC, а средний r в пуле составляет около 4 (например, 3,5-4,5, например, около 3,8). В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB, а r представляет собой 4. В некоторых вариантах реализации изобретения предоставляется пул ADC, при этом каждый ADC содержит линкер Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB, а средний r в пуле составляет около 4 (например, 3,5-4,5, например, около 3,8).

[0016] В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент (фрагмент Ab или Ab) ADC представляет собой антитело к рецептору фолиевой кислоты альфа (FRA) или интернализирующийся фрагмент антитела и может связывать опухолевые клетки, экспрессирующие FRA (то есть, ADC нацеливается на клетки, экспрессирующие FRA). В некоторых вариантах реализации изобретения ADC, содержащий фрагмент Ab к FRA и расщепляемый пептидный фрагмент, демонстрирует более низкие уровни агрегации, улучшенное соотношение антитело:лекарственное средство, увеличение целевого уничтожения раковых клеток, уменьшение нецелевого уничтожения не раковых клеток, более высокое содержание лекарственного средства (r), повышенную цитотоксичность и/или активность по отношению к нерасщепляемому линкеру или альтернативному механизму расщепления. В некоторых вариантах реализации изобретения повышенная активность и/или цитотоксичность присутствует в раке, экспрессирующем умеренные уровни антигена, являющегося целью фрагмента антитела ADC (например, умеренная экспрессия FRA). В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый пептидный фрагмент расщепляется ферментом, а линкер представляет собой расщепляемый ферментом линкер. В некоторых вариантах реализации изобретения фермент представляет собой катепсин, а линкер представляет собой расщепляемый

катепсином линкер. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый ферментом линкер (например, расщепляемый катепсином линкер) проявляет одно или более улучшенных свойств, упомянутых выше, по сравнению с альтернативным механизмом расщепления. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер

представляет собой Mal-(ПЭГ)_m-Val-Cit-pAB.

[0017] В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент связывается с рецептором фоллиевой кислоты альфа (FRA) и нацеливается на опухолевые клетки, экспрессирующие FRA. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент содержит три области, определяющие комплементарность (CDR) тяжелой цепи и три CDR легкой цепи, при этом CDR тяжелой цепи содержат CDR1 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 2, CDR2 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 3 и CDR3 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 4; и три CDR легкой цепи содержат CDR1 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 7, CDR2 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 8 и CDR3 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 9, как определено системой нумерации Кабата; или при этом CDR тяжелой цепи содержат CDR1 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 13, CDR2 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 14 и CDR3 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 15; и CDR легкой цепи содержат CDR1 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 16, CDR2 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 17 и CDR3 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 18, как определено системой нумерации IMGT. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные последовательности человека. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи из SEQ ID NO: 23 и переменный домен легкой цепи из SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент содержит константный домен тяжелой цепи IgG1 человека и константный домен легкой цепи каппа Ig. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент конкурирует за связывание и/или связывает тот же эпитоп, что и антитело, содержащее переменный домен тяжелой цепи из SEQ ID NO: 23 и переменный домен легкой цепи из SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом, содержащим аланин-гистидин-лизин-аспарагиновую кислоту (АНКД) (SEQ ID NO: 365) (O'Shannessy и соавт., (2011 год) Oncotarget 2:1227-43). В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом, содержащим NTSQEАНКДVSYL (SEQ ID NO: 366).

[0018] В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент является интернализирующимся антителом к FRA или интернализирующимся антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи, при этом CDR тяжелой цепи содержат CDR1 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 2, CDR2 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 3 и CDR3 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 4; и

три CDR легкой цепи содержат CDR1 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 7, CDR2 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 8 и CDR3 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 9, как определено системой нумерации Кабата; или при этом CDR тяжелой цепи содержат CDR1 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 13, CDR2 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 14 и CDR3 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 15; и CDR легкой цепи содержат CDR1 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 16, CDR2 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 17 и CDR3 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 18, как определено системой нумерации IMGT; линкер содержит Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB; и р представляет собой 4. В некоторых вариантах реализации изобретения предоставляется пул таких ADC b р составляет около 4 (например, около 3,8). В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи из SEQ ID NO: 23 и переменный домен легкой цепи из SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент содержит константный домен тяжелой цепи IgG1 человека и константный домен легкой цепи каппа Ig. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент конкурирует за связывание и/или связывает тот же эпитоп, что и антитело, содержащее переменный домен тяжелой цепи из SEQ ID NO: 23 и переменный домен легкой цепи из SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом, содержащим SEQ ID NO: 365. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом, содержащим SEQ ID NO: 366.

[0019] В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент связывается с рецептором человеческого эпидермального фактора роста 2 типа (her2) и нацеливается на клетки опухоли, экспрессирующие her2. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент содержит три области, определяющие комплементарность (CDR) тяжелой цепи и три CDR легкой цепи, при этом CDR тяжелой цепи содержат CDR1 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 71, CDR2 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 72 и CDR3 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 73; и три CDR легкой цепи содержат CDR1 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 74, CDR2 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 75 и CDR3 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 76, как определено системой нумерации Кабата; или при этом CDR тяжелой цепи содержат CDR1 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 191, CDR2 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 192 и CDR3 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 193; и CDR легкой цепи содержат CDR1 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 194, CDR2 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 195 и CDR3 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 196, как определено системой нумерации IMGT. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные последовательности человека. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи из SEQ ID NO: 27 и переменный домен легкой цепи из SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий

фрагмент содержит константный домен тяжелой цепи IgG1 человека и константный домен легкой цепи каппа Ig. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующееся связывание антигена конкурирует за связывание и/или связывает тот же эпитоп, что и антитело, содержащее

5 вариабельный домен тяжелой цепи из SEQ ID NO: 27 и вариабельный домен легкой цепи из SEQ ID NO: 28.

[0020] В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент является интернализирующимся антителом к her2 или интернализирующимся

10 антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи, при этом CDR тяжелой цепи содержат CDR1 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 71, CDR2 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 72 и CDR3 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 73;

15 и три CDR легкой цепи содержат CDR1 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 74, CDR2 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 75 и CDR3 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 76, как определено системой нумерации Кабата; или при этом CDR тяжелой цепи содержат CDR1 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 191, CDR2 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 192 и CDR3 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 193; и

20 CDR легкой цепи содержат CDR1 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 194, CDR2 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 195 и CDR3 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 196, как определено системой нумерации IMGT; линкер содержит Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB; и р представляет собой 4. В некоторых вариантах реализации изобретения предоставляется пул таких ADC b р составляет около 4 (например, около 3,8). В

25 некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельный домен тяжелой цепи из SEQ ID NO: 27 и вариабельный домен легкой цепи из SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент содержит константный домен

30 тяжелой цепи IgG1 человека и константный домен легкой цепи каппа Ig. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующееся связывание антигена конкурирует за связывание и/или связывает тот же эпитоп, что и антитело, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи из SEQ ID NO: 27 и вариабельный домен легкой цепи из SEQ ID NO: 28.

35 [0021] В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент связывается с мезотелином (MSLN) и нацеливается на опухолевые клетки, экспрессирующие MSLN. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент содержит три области,

40 определяющие комплементарность (CDR) тяжелой цепи и три CDR легкой цепи, при этом CDR тяжелой цепи содержат CDR1 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 65, CDR2 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 66 и CDR3 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 67; и три CDR легкой цепи содержат CDR1 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 68, CDR2 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 69 и CDR3 легкой цепи,

45 состоящий из SEQ ID NO: 70, как определено системой нумерации Кабата; или при этом CDR тяжелой цепи содержат CDR1 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 185, CDR2 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 186 и CDR3 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 187; и CDR легкой цепи содержат CDR1 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO:

188, CDR2 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 189 и CDR3 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 190, как определено системой нумерации IMGT. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи из SEQ ID NO: 25 и переменный домен легкой цепи из SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент содержит константный домен тяжелой цепи IgG1 человека и константный домен легкой цепи каппа Ig. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующееся связывание антигена конкурирует за связывание и/или связывает тот же эпитоп, что и антитело, содержащее переменный домен тяжелой цепи из SEQ ID NO: 25 и переменный домен легкой цепи из SEQ ID NO: 26.

[0022] В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент является интернализирующимся антителом к MSLN или интернализирующимся антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи, при этом CDR тяжелой цепи содержат CDR1 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 65, CDR2 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 66 и CDR3 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 67; и три CDR легкой цепи содержат CDR1 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 68, CDR2 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 69 и CDR3 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 70, как определено системой нумерации Кабата; или при этом CDR тяжелой цепи содержат CDR1 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 185, CDR2 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 186 и CDR3 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 187; и CDR легкой цепи содержат CDR1 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 188, CDR2 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 189 и CDR3 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 190, как определено системой нумерации IMGT; линкер содержит Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB; и р представляет собой 4. В некоторых вариантах реализации изобретения предоставляется пул таких ADC b р составляет около 4 (например, около 3,8). В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи из SEQ ID NO: 25 и переменный домен легкой цепи из SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент содержит константный домен тяжелой цепи IgG1 человека и константный домен легкой цепи каппа Ig. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или интернализирующееся связывание антигена конкурирует за связывание и/или связывает тот же эпитоп, что и антитело, содержащее переменный домен тяжелой цепи из SEQ ID NO: 25 и переменный домен легкой цепи из SEQ ID NO: 26.

[0023] Также в данном документе представлены композиции, содержащие множественные копии любого из описанных ADC, при этом среднее содержание лекарственного средства (среднее р) ADC в композиции составляет от около 3 до 4 или от около 3,5 до около 4,5, или около 4. В некоторых вариантах реализации изобретения среднее р находится между около 3,2 и 3,8. В некоторых вариантах реализации изобретения среднее р находится между около 3,6 и 4,4.

[0024] Также в данном документе представлены композиции, содержащие -L-D, при этом D представляет собой эрибулин; а L представляет собой расщепляемый линкер,

ковалентно прикрепленный к D. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый линкер ковалентно присоединяется к амину C-35 на эрибулине. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый линкер содержит Val-Cit. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый линкер содержит
 5 спейсерную единицу ПЭГ. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый линкер содержит Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB.

[0025] Далее в данном документе представлены фармацевтические композиции, содержащие ADC и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель и/или
 10 вспомогательное вещество.

[0026] Другой аспект данного изобретения включает терапевтическое и
 15 диагностическое применение описанных соединений и композиций ADC, например, при лечении рака. Другой аспект включает способы лечения рака, который экспрессирует антиген, являющийся целью фрагмента антитела ADC, такой как FRA. В различных вариантах реализации изобретения предлагаются способы уничтожения или
 20 ингибирования пролиферации опухолевых клеток или раковых клеток путем введения терапевтически эффективного количества и/или применения курса лечения любого из описанных ADC. Другой аспект включает способы обнаружения опухолевых клеток или раковых клеток, которые экспрессируют FRA с применением описанных ADC, и
 25 способы скрининга пациентов, страдающих на рак, которые будут реагировать на лечение описанными ADC. В некоторых вариантах реализации изобретения рак представляет собой рак желудка, серозный рак яичников, светлоклеточный рак яичника, немелкоклеточный рак легкого, колоректальный рак, трижды негативный рак молочной железы, рак эндометрия, серозную карциному эндометрия, карциноид легких или
 30 остеосаркому. Способы получения описанных ADC также раскрыты.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0027] На Фиг. 1 изображена одна из методик, применяемых для получения ADC MORAb-003, как описано в некоторых вариантах реализации изобретения. В этом подходе неспаренные цистеины образуются путем частичного восстановления с
 35 ограниченными молярными эквивалентами восстанавливающего агента TCEP, не содержащего тиол. Этот подход предпочтительно уменьшает межцепочечные дисульфидные связи, связывающие легкую цепь и тяжелую цепь (по одной паре на спаривание H-L) и две тяжелые цепи в шарнирной области (две пары на спаривание H-H в случае IgG1 человека), оставляя внутрицепочечные дисульфидные связи
 40 интактными.

[0028] На Фиг. 2 изображен способ синтеза малеимид-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB-эрибулина (mal-(ПЭГ)₂-VCP-эрибулина), как описано в некоторых вариантах реализации
 45 изобретения.

[0029] На Фиг. 3 изображен анализ условий восстановления для MORAb-003 с применением ДСН-ПААГ-электрофореза. Дорожки указаны справа от фигуры. Дорожка М соответствует стандарту белка; дорожка 1 соответствует необработанному MORAb-003; дорожка 2 соответствует 5,3 мг/мл, восстановленному в 70,6 мкМ TCEP; дорожка 3 соответствует MORAb-003 5,3 мг/мл, восстановленному в 141,2 мкМ TCEP; дорожка 4 соответствует MORAb-003 1,5 мг/мл, восстановленному в 20 мкМ TCEP; и дорожка
 50 5 соответствует MORAb-003 1,5 мг/мл, восстановленному в 40 мкМ TCEP. Идентичности каждой полосы указаны на нижнем правом геле. "H" обозначает тяжелую цепь. "L" обозначает легкую цепь.

[0030] На Фиг. 4 изображен анализ условий восстановления для MORAb-003 с

применением ДСН-ПААГ-электрофореза. Дорожка 1 соответствует стандарту белка; дорожка 2 соответствует необработанному MORAb-003; дорожка 3 соответствует MORAb-003, обработанному в соотношении MORAb-003:TCEP 1:1; дорожка 4 соответствует MORAb-003, обработанному в соотношении MORAb-003:TCEP 1:2; дорожка 5 соответствует MORAb-003, обработанному в отношении MORAb-003:TCEP 1:3; и дорожка 6 соответствует MORAb-003, обработанному в соотношении MORAb-003:TCEP 1:4.

[0031] На Фиг. 5 изображен анализ в невосстанавливающем ДСН-ПААГ электрофорезе выбранных ADC MORAb-003, включая М-ММАЕ (дорожка 2), М-DM1 (дорожка 3), М-0026 (дорожка 4), М-0260 (дорожка 5), М-0267 (дорожка 6), М-0272 (дорожка 7), М-0285 (дорожка 8), М-0292 (дорожка 9), М-027-0381 (дорожка 10) и М-0284 (дорожка 11).

[0032] На Фиг. 6А изображены результаты независимого исследования анализа цитотоксичности MORAb-003-малеимидо-ПЭГ2-Val-Cit-pAB-эрибулина (МЗ-VCP-эрибулина или "MORAb-202"). На Фиг. 6В изображены результаты независимого исследования анализа цитотоксичности MORAb-003-малеимидо-(CH₂)₅-Val-Cit-pAB-ER-001150828 (МЗ-ER-61318). На Фиг. 6С изображены результаты независимого исследования анализа цитотоксичности MORAb-003-ПЭГ-рAB-дуостатина 3 (МЗ-027-0285). Информация, изображенная в легендах соответствующей фигуры, обеспечивает тестируемые клеточную линию: агент (клеточная линия/культивированные клеточные линии, плотность посева 1^{ой}/2^{ой} клеточной линии).

[0033] На Фиг. 7А и 7В изображено распределение соотношения лекарственного средства-к-антителу (DAR - drug-to-antibody) для ADC MORAb-003-VCP-эрибулин (Фиг. 7А) и MORAb-003-0285 (Фиг. 7В) по отношению к неконъюгированному MORAb-003, как описано в некоторых вариантах реализации изобретения. Числа над каждым пиком указывают на DAR отдельных видов.

[0034] -На Фиг. 8 изображены результаты анализа цитотоксичности - конкуренция MORAb-003-VCP-эрибулина с неконъюгированным MORAb-003 (2 мкМ) в клетках IGROV1 или SJSA-1.

[0035] На Фиг. 9 изображена кинетика массы тела для каждой группы мышей CD-1 (среднее по группе и СОС), получавших одну внутривенную дозу носителя (ФСБ) или MORAb-202 в количестве 10, 20, 40 или 80 мг/кг.

[0036] На Фиг. 10 изображена кинетика массы тела для каждой группы мышей CD-1 (среднее по группе и СОС), получавших внутривенно ФСБ или эрибулин в количестве 0,4, 0,8, 1,6 или 3,2 мг/кг в соответствии с режимом дозирования q4dx3 (дозы вводились один раз каждые четыре дня, всего 3 дозы).

[0037] На Фиг. 11 изображена кинетика роста опухоли для каждой группы мышей CB17-SCID, имплантированных клетками НМРЛ человека NCI-H2110 (среднее по группе и СОС), и получавших одну внутривенную дозу ФСБ, MORAb-003-VCP-эрибулин (MORAb-202) при 1, 2,5 или 5 мг/кг, или MORAb-003-0285 при 5 мг /кг.

[0038] На Фиг. 12 изображены объемы опухолей отдельных мышей CB17-SCID, имплантированных клетками НМРЛ человека NCI-H2110, а также среднее по группам и СОС на 17-й день. Группы получали одну дозу ФСБ внутривенно, MORAb-003-VCP-эрибулина (MORAb-202) при 1, 2,5 или 5 мг/кг или MORAb-003-0285 при 5 мг/кг.

[0039] На Фиг. 13 изображена кинетика массы тела для каждой группы мышей CB17-SCID, имплантированных NCI-H2110 (среднее по группе и СОС), получавших одну внутривенную дозу ФСБ, MORAb-003-VCP-эрибулин (MORAb-202) при 1, 2,5 или 5 мг/кг, или MORAb-003-0285 при 5 мг /кг.

[0040] На Фиг. 14 изображена кинетика роста опухоли для каждой группы мышей CB17-SCID, имплантированных NCI-H2110 (среднее по группе и СОС), получавших внутривенно носитель (ФСБ) или эрибулин при 0,5, 0,2, 0,8 или 1,6 мг/кг, в соответствии с режимом дозирования q4dx3.

5 [0041] На Фиг. 15 изображены объемы опухолей отдельных мышей CB17-SCID, имплантированных NCI-H2110, а также среднее по группам и СОС на 24-й день. Группы получали внутривенно носитель (ФСБ) или эрибулин при 0,5, 0,2, 0,8 или 1,6 мг/кг в соответствии с режимом дозирования q4dx3.

10 [0042] На Фиг. 16 изображена кинетика изменения массы тела для каждой группы мышей CB17-SCID, имплантированных NCI-H2110 (среднее по группе и СОС), получавших внутривенно носитель (ФСБ) или эрибулин при 0,5, 0,2, 0,8 или 1,6 мг/кг, в соответствии с режимом дозирования q4dx3.

15 [0043] На Фиг. 17 изображена активность MORAb-003-VCP-эрибулина (MORAb-202) на клетках IGROV1, OVCAR3, NCI-H2110, A431-A3 и SJSA-1, как измерено анализом цитотоксичности с кристаллическим фиолетовым.

[0044] На Фиг. 18 изображена кинетика роста опухоли для каждой группы мышей CB17-SCID, имплантированных NCI-H2110 (среднее по группе и СОС), получавших одну внутривенную дозу ФСБ или MORAb-003-VCP-эрибулин (MORAb-202) при 1, 2,5 или 5 мг/кг.

20 [0045] На Фиг. 19А и 19В изображена кинетика роста опухоли (Фиг. 19А) и кинетика изменения массы тела (Фиг. 19В) для каждой группы PDx НМРЛ (LXFA-737) мышей-опухоленосителей (среднее по группе и СОС), получавших одну внутривенную дозу носителя (ФСБ), MORAb-003 в количестве 5 мг/кг или MORAb-003-VCP-эрибулин (MORAb-202) в количестве 5 мг/кг.

25 [0046] На Фиг. 20А и 20В изображены отдельные соотношения объемов опухолей (Фиг. 20А) и кинетика изменения массы тела (Фиг. 20В) для каждой группы мышей-опухоленосителей рака эндометрия PDx (Endo-12961) (среднее по группе и СОС), получавших одну внутривенную дозу PBS, эрибулина в количестве 0,1 или 3,2 мг/кг или MORAb-003-VCP-эрибулин (MORAb-202) в количестве 5 мг/кг. На Фиг. 20С и 20D
30 изображена кинетика роста опухоли (Фиг. 20С) и кинетика изменения массы тела (Фиг. 20D) для каждой группы мышей-опухоленосителей рака эндометрия PDx (Endo-10590) (среднее по группе и СОС), получавших одну внутривенную дозу PBS, эрибулина в количестве 0,1 или 3,2 мг/кг или MORAb-003-VCP-эрибулин (MORAb-202) в количестве 5 мг/кг.

35 [0047] На Фиг. 21А изображено иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание опухолевой ткани мышей-опухоленосителей PDx ТНРМЖ (OD-BRE-0631) с антителом к человеческому IgG. Опухолевые ткани из мышей, получавших одну внутривенную дозу носителя (справа) или MORAb-003-VCP-эрибулин (MORAb-202) в количестве 5 мг/кг (слева), собирали и окрашивали через 5 дней после лечения. На Фиг. 21В изображено
40 ИHC окрашивание опухолевой ткани мышей-опухоленосителей PDx ТНРМЖ (OD-BRE-0631) с антителом α -гладкомышечного актина (ГМА)-FITC. Опухолевые ткани у мышей, не получавших лечение собирали за 2 дня до лечения (слева), тогда как опухолевые ткани у мышей, получавших одну внутривенную дозу MORAb-003-VCP-эрибулина (MORAb-202) в количестве 5 мг/кг, собирали через 5 дней после лечения (справа). На
45 Фиг. 21С изображена кинетика роста опухоли для каждой группы мышей-опухоленосителей PDx ТНРМЖ (OD-BRE-0631) (среднее по группе и СОС), получавших одну внутривенную дозу носителя (ФСБ) или MORAb-003-VCP-эрибулина (MORAb-202) в количестве 5 мг/кг.

[0048] На Фиг. 22 изображено дифференцирование человеческих мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (МСК-КМ) в культуре с клетками MKN-74 после введения носителя (ФСБ или этанола), эрибулина, MORAb-003 или MORAb-003-VCP-эрибулина (MORAb-202), как измерено методом проточной цитометрии. Stro-1⁺/CD105⁺,
 5 CD34⁺/CD31⁻ и NG2⁺ являются маркерами MSC, адипоцитов и перицитов, соответственно.

[0049] На Фиг. 23 изображен анализ временной динамики опухолевых тканей из мышей CB17-SCID, имплантированных NCI-H2110, получавших одну внутривенную дозу носителя (ФСБ) или MORAb-003-VCP-эрибулина (MORAb-202) в количестве 5 мг/кг, окрашенных с применением антитела α -гладкомышечного актина (ГМА)-FITC.
 10 Опухолевые ткани собирали и окрашивали в день 0 и в дни 3, 5, 7 и 9 после лечения. Ось Y: %=[подсчитаны окрашенные клетки/подсчитано общее количество клеток] * 100. Ось X: день (подсчитано общее количество клеток).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЛЛЮСТРАТИВНЫХ ВАРИАНТОВ РЕАЛИЗАЦИИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0050] Описанные композиции и способы могут быть поняты более легко со ссылкой на следующее подробное описание, взятое в связи с прилагаемыми фигурами, которые составляют часть данного описания. Следует понимать, что описанные композиции и способы не ограничены конкретными композициями и способами, описанными и/или
 20 показанными в данном документе, и что применяемая в данном документе терминология предназначена для описания конкретных вариантов реализации изобретения только в качестве примера и не предназначена для ограничения заявленных композиций и способов.

[0051] В этом тексте описания относятся к композициям и способам применения указанных композиций. В тех случаях, когда данное описание описывает или претендует на признак или вариант реализации изобретения, связанные с композицией, такой признак или вариант реализации изобретения в равной степени применимы к способам применения указанной композиции. Аналогичным образом, если данное описание описывает или заявляет признак, или вариант реализации изобретения, связанный со
 30 способом применения композиции, такой признак или вариант реализации изобретения в равной степени применимы к композиции.

[0052] В случае если выражен диапазон значений, он включает в себя варианты реализации изобретения, применяющие любое конкретное значение в пределах диапазона. Дополнительно, ссылка на значения, указанные в диапазонах, включает
 35 каждое значение в этом диапазоне. Все диапазоны включают в себя их конечные точки и являются комбинируемыми. В случае если значения выражены в виде приближений при помощи предшествующего термина "около", то следует понимать, что конкретное значение образует другой вариант реализации изобретения. Ссылка на конкретное числовое значение включает в себя, по меньшей мере, это конкретное значение, если
 40 из контекста явно не следует иное. Применение "или" означает "и/или", если конкретный контекст его применения не указывает иное. Все источники в данном описании включены посредством ссылки для любых целей. Если ссылка и спецификация вступают в конфликт, спецификация будет преобладать.

[0053] Следует принимать во внимание, что некоторые особенности описанных композиций и способов, которые для ясности, описанные в данном документе в контексте отдельных вариантов реализации изобретения, также могут быть
 45 представлены в комбинации в одном варианте реализации изобретения. И наоборот, различные признаки описанных композиций и способов, которые для краткости описаны в контексте одного варианта реализации изобретения, также могут быть представлены

по отдельности или в любой подкомбинации.

Определения

[0054] Различные термины, относящиеся к аспектам данного описания, применяются в описании и формуле изобретения. Такие термины должны иметь свое обычное значение в данной области техники, если не указано иное. Другие конкретно определенные термины должны толковаться в соответствии с определениями, представленными в данном документе.

[0055] Как применяются в данном документе формы единственного числа включают в себя формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное.

[0056] Термины "около" или "приблизительно" в контексте числовых значений и диапазонов относятся к значениям или диапазонам, которые приближены или близки к указанным значениям или диапазонам, таким образом, что вариант реализации изобретения может выполняться так, как предполагалось, например, имеющий нужное количество нуклеиновых кислот или полипептидов в реакционной смеси, как это очевидно специалисту в данной области техники из приведенных в данном документе принципов. Это связано, по меньшей мере частично, с различными свойствами вариаций композиций нуклеиновых кислот, возраста, рас, пола, анатомии и физиологии и неточностями биологических систем. Таким образом, эти термины охватывают значения, выходящие за рамки систематических ошибок.

[0057] В данном документе термины "конъюгат антители-лекарственное средство", "конъюгат антитела", "конъюгат", "иммуноконъюгат" и "ADC" применяются взаимозаменяемо и относятся к соединению или его производному, которое связано с антителом (например, антителом к FRA) и определяется общей формулой: $Ab-(L-D)_p$ (Формула I), где Ab=фрагмент антитела (то есть, антитело или антигенсвязывающий фрагмент), L=линкерный фрагмент, D=фрагмент лекарственного средства и p=количество фрагментов лекарственного средства на фрагмент антитела.

[0058] Термин "антитело" применяется в самом широком смысле, чтобы ссылаться на молекулу иммуноглобулина, которая распознает и специфически связывается с целью, такой как белок, полипептид, углевод, полинуклеотид, липид или комбинации вышеизложенного через, по меньшей мере, один сайт распознавания антигена в вариабельной области молекулы иммуноглобулина. Тяжелая цепь антитела состоит из вариабельного домена тяжелой цепи (V_H) и константной области тяжелой цепи (C_H).

Легкая цепь состоит из вариабельного домена легкой цепи (V_L) и константной области легкой цепи (C_L). Для целей данной заявки вариабельные домены зрелой тяжелой цепи и легкой цепи содержат три области, определяющие комплементарность (CDR1, CDR2 и CDR3) в четырех каркасных областях (FR1, FR2, FR3 и FR4), расположенных от N-конца до C-конца: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. "Антитело" может быть естественного происхождения или искусственным, таким как моноклональные антитела, продуцируемые традиционной гибридомной технологией. Термин "антитело" включает полноразмерные моноклональные антитела и полноразмерные поликлональные антитела, а также фрагменты антител, такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv и одноцепочечные антитела. Антитело может быть любым из пяти основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM или их подклассов (например, изотипы IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). Термин дополнительно охватывает человеческие антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела и любую модифицированную молекулу иммуноглобулина, содержащую сайт распознавания антигена, при условии, что он проявляет желаемую биологическую активность.

[0059] Термин "моноклональное антитело" в данном документе относится к антителу, полученному из популяции в значительной степени однородных антител, то есть отдельные антитела в составе популяции являются идентичными, за исключением мутаций, происходящих по естественным причинам, которые могут присутствовать в
 5 небольших количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, поскольку они направлены против одного антигенного эпитопа. В противоположность этому, обычные (поликлональные) препараты антител обычно включают множество антител, направленных против (или специфических к) разным эпитопам. Определение "моноклональное" указывает на то, что антитело получено из практически однородной
 10 популяции антител; его не следует интерпретировать как требование продукции антитела посредством какого-либо конкретного способа. Например, моноклональные антитела, которые должны применяться в соответствии с данным изобретением, могут быть получены с помощью гибридного способа, впервые описанного Kohler и соавт. (1975 год) Nature 256:495 или могут быть получены с помощью способов рекомбинантной
 15 ДНК (см., например, патент США №4,816,567). Моноклональные антитела также могут быть выделены из библиотек фаговых антител, применяя методы, описанные в Clackson и соавт. (1991 год) Nature 352:624-8, и Marks и соавт. (1991 год) J. Mol. Biol. 222:581-97, например.

[0060] Моноклональные антитела описанные в данном документе конкретно
 20 включают "химерные" антитела, в которых участок тяжелой и/или легкой цепи идентичен или гомологичен соответствующим последовательностям антител, полученных от конкретного вида или относящихся к конкретному классу или подклассу антител, тогда как остаток цепи(ей) идентичен или гомологичен соответствующим последовательностям антител, полученным от другого вида или относящихся к другому классу или подклассу
 25 антител, а также фрагменты таких антител при условии, что они специфически связывают целевой антиген и/или проявляют желаемую биологическую активность.

[0061] В данном контексте термин "человеческое антитело" означает антитело, продуцируемое человеком или антитело, имеющее аминокислотную последовательность антитела, продуцируемого человеком.

30 [0062] В данном контексте термин "химерное антитело" относится к антителам, в которых аминокислотная последовательность молекулы иммуноглобулина получена из двух или более видов. В некоторых случаях переменные области как тяжелых, так и легких цепей соответствуют переменным областям антител, полученных от одного вида с желаемой специфичностью, аффинностью и активностью, тогда как константные
 35 области гомологичны антителам, полученным из другого вида (например, человека) для минимизации иммунного ответа у последнего вида.

[0063] В данном контексте термин "гуманизированное антитело" относится к формам антител, которые содержат последовательности из нечеловеческих (например, мышиных) антител, а также человеческих антител. Такие антитела представляют собой химерные
 40 антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина, нечеловеческого происхождения. В общем, гуманизированное антитело будет содержать практически все из по меньшей мере одного, а обычно двух переменных доменов, в которых все или практически все гиперпеременные петли соответствуют таким участкам иммуноглобулина нечеловеческого происхождения, а
 45 все или практически все шарнирные (FR) области соответствуют таким участкам последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело также не обязательно будет содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно происходящей из иммуноглобулина человека.

Гуманизированное антитело может быть дополнительно модифицировано путем замещения остатков либо в каркасной области Fv, и/или в замещенных остатках нечеловеческого происхождения, для уточнения и оптимизации специфичности, аффинности и/или активности антител.

[0064] В данном документе термин "антигенсвязывающий фрагмент" или "антигенсвязывающая часть" антитела, относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, FRA). Антигенсвязывающие фрагменты предпочтительно также сохраняют способность к интернализации в клетку, экспрессирующую антиген. В некоторых вариантах реализации изобретения антигенсвязывающие фрагменты также сохраняют активность иммунного эффектора. Было показано, что фрагменты полноразмерного антитела могут выполнять антигенсвязывающую функцию полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "антигенсвязывающий фрагмент" или "антигенсвязывающая часть" антитела, включают (i) фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L , V_H , C_L и C_{H1} ; (ii) фрагмент $F(ab')_2$, двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, соединенных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов V_H и C_{H1} ; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча антитела; (v) фрагмент dAb, который содержит один вариабельный домен, например домен V_H (см., например, Ward и соавт. (1989 год) Nature 341:544-6; и Winter и соавт., WO 90/05144); и (vi) выделенную область, определяющую комплементарность (CDR). Кроме того, хотя два домена фрагмента Fv, V_L и V_H , кодируются отдельными генами, они могут соединяться, с применением рекомбинантных способов, синтетическим линкером, который позволяет им производиться в виде одной белковой цепи, в которой области V_L и V_H спариваются с образованием одновалентных молекул (известные как одноцепочечные Fv (scFv)). См., например, Bird и соавт. (1988 год) Science 242:423-6; и Huston и соавт. (1988 год) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-83. Такие одноцепочечные антитела также охватываются термином "антигенсвязывающий фрагмент" или "антигенсвязывающая часть" антитела и известны в данной области техники как типовый тип связывающего фрагмента, который может интернализироваться в клетки при связывании. См., например, Zhu и соавт. (2010 год) 9:2131-41; He и соавт. (2010 год) J. Nucl. Med. 51:427-32; и Fitting и соавт. (2015 год) MAbs 7:390-402. В некоторых вариантах реализации изобретения молекулы scFv могут быть включены в слитый белок. Также охватываются другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела. Диатела представляют собой двухвалентные, биспецифические антитела, в которых домены V_H и V_L экспрессируются в одной полипептидной цепи, но с применением линкера, который является слишком коротким, чтобы обеспечить спаривание между двумя доменами в одной и той же цепи, тем самым заставляя домены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавая два сайта связывания антигена (см., например, Holliger и соавт. (1993 год) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-8; и Poljak и соавт. (1994 год) Structure 2:1121-3). Антигенсвязывающие фрагменты получают с применением обычных методов, известных специалистам в данной области техники, а связывающие фрагменты подвергают скринингу на полезность (например, аффинность связывания, интернализацию) таким же образом, как и интактные антитела. Антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены расщеплением интактного белка, например, протеазой или химическим расщеплением.

[0065] В данном контексте термин "интернализующийся" в отношении антитела

или антигенсвязывающего фрагмента, относится к антителу или антигенсвязывающему фрагменту, который способен проходить через липидную бислойную мембрану клетки во внутренний компартмент (то есть "интернализированный") при связывании с клеткой, предпочтительно в деградирующий компартмент в клетке. Например,

интернализующееся антитело к FRA представляет собой антитело, которое может быть принято в клетку после связывания с FRA на клеточной мембране.

[0066] В данном контексте термин "рецептор фолиевой кислоты альфа" или "FRA" относится к любой нативной форме человеческого FRA. Данный термин охватывает полноразмерный FRA (например, NCBI Reference Sequence: NP_000793; SEQ ID NO: 19), а также любую форму человеческого FRA, которая является результатом процессинга в клетке. Данный термин также включает варианты FRA естественного происхождения, включая, но не ограничиваясь ими, сплайсинговые варианты, аллельные варианты и изоформы. FRA может быть выделен из человека или может быть получен рекомбинантно или с помощью синтетических способов.

[0067] Термин "антитело к FRA" или "антитело, которое специфически связывает FRA" относится к любой форме антитела или его фрагмента, которая специфически связывает FRA и охватывает моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела и биологически функциональные фрагменты антител, при условии, что они специфически связывают FRA.

Предпочтительно антитело к FRA, применяемое в описанных в данном документе ADC, является интернализирующимся антителом или интернализирующимся фрагментом антитела. MORAb-003 представляет собой типовое интернализирующееся антитело к FRA человека. В данном контексте термин "специфический", "специфически связывается" и "связывается специфически" относится к селективному связыванию антитела с эпитопом целевого антигена. Антитела могут быть протестированы на специфичность связывания путем сравнения связывания с соответствующим антигеном со связыванием с нерелевантным антигеном или антигенной смесью при заданном наборе условий. Если антитело связывается с соответствующим антигеном с по меньшей мере в 2, 5, 7 и, предпочтительно, 10 раз большей аффинностью, чем с нерелевантным антигеном или антигенной смесью, то это считается специфическим связыванием. В одном варианте реализации изобретения специфическое антитело представляет собой антитело, которое связывает только антиген FRA, но не связывает (или проявляет минимальное связывание) с другими антигенами.

[0068] В данном контексте термин "рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2 типа", "her2" или "her2/neu" относится к любой нативной форме her2 человека. Данный термин охватывает полноразмерный her2 (например, NCBI Reference Sequence: NP_004439. 2; SEQ ID NO: 21), а также любую форму человеческого her2, которая является результатом процессинга в клетке. Данный термин также включает варианты her2 естественного происхождения, включая, но не ограничиваясь ими, сплайсинговые варианты, аллельные варианты и изоформы. Her2 может быть выделен из человека или может быть получен рекомбинантно или с помощью синтетических способов.

[0069] Термин "антитело к her2" или "антитело, которое специфически связывает her2" относится к любой форме антитела или его фрагмента, которая специфически связывает her2 и охватывает моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела и биологически функциональные фрагменты антител, при условии, что они специфически связывают her2. В патенте США №5,821,337 (включенном в данный документ в качестве ссылки) представлены типовые последовательности связывания her2, включая типовые последовательности

антитела к her2. Предпочтительно антитело к her2, применяемое в описанных в данном документе ADC, является интернализирующимся антителом или интернализирующимся фрагментом антитела. Трастузумаб представляет собой типовое интернализирующееся антитело к her2 человека.

5 [0070] Термин "эпитоп" относится к части антигена, которая может быть распознана и специфически связана антителом. Когда антиген является полипептидом, эпитопы могут быть образованы из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, сопоставленных третичной укладкой полипептида. Эпитоп, связанный антителом, может быть идентифицирован с применением любого метода картирования эпитопов, 10 известного в данной области техники, включая рентгеновскую кристаллографию для идентификации эпитопа путем прямой визуализации комплекса антиген-антитело, а также контроля связывания антитела с фрагментами или мутированными вариантами антигена или контроля доступности для растворителя различных частей антитела и антигена. Типовые стратегии, применяемые для картирования эпитопов антител, 15 включают, но не ограничиваются ими, олигопептидное сканирование на основе матрицы, ограниченный протеолиз, сайт-направленный мутагенез, мутагенезное картирование с высокой пропускной способностью, водород-дейтериевый обмен и масс-спектрометрию (см., например, Gershoni и соавт. (2007 год) 21:145-56, и Hager-Braun and Tomer (2005 год) Expert Rev. Proteomics 2:745-56).

20 [0071] Конкурентное связывание и связывание эпитопа также могут быть применены для определения антител, имеющих идентичные или перекрывающиеся эпитопы. Конкурентное связывание может быть оценено с применением эпитоп-перекрестного конкурентного анализа, такого как анализ, описанный в "Antibodies, A Laboratory 25 Manual," Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow and Lane (1^е издание 1988 год, 2^е издание 2014 год). В некоторых вариантах реализации изобретения конкурентное связывание идентифицируют, когда тестируемое антитело или связывающий белок уменьшает связывание эталонного антитела или связывающего белка с целевым антигеном, таким как FRA или her2 (например, связывающий белок, содержащий CDR и/или вариабельные домены, выбранные из тех, которые указаны в Таблицах 2, 4 и 6), по меньшей мере, на 30 50% в эпитоп-перекрестном конкурентном анализе (например, на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 99,5% или более или любой процент между ними) и/или наоборот. В некоторых вариантах реализации изобретения конкурентное связывание может быть связано с общими или сходными (например, частично перекрывающимися) эпитопами или из-за стерического затруднения, в случае если антитела или связывающие белки 35 связываются в соседних эпитопах. См., например, Tzartos, Methods in Molecular Biology (Morris, ред. (1998 год) том 66, стр. 55-66). В некоторых вариантах реализации изобретения конкурентное связывание может быть применено для сортировки групп связывающих белков, которые имеют сходные эпитопы, например, те, которые конкурируют за связывание, могут быть "сгруппированы" в виде группы связывающих 40 белков, которые имеют перекрывающиеся или близлежащие эпитопы, тогда как те, которые не конкурируют помещают в отдельную группу связывающих белков, которые не имеют перекрывающихся или близлежащих эпитопов.

[0072] Термин " k_{on} " или " k_a " относится к константе скорости для ассоциации антитела с антигеном с образованием комплекса антитело/антиген. Скорость может быть 45 определена с применением стандартных анализов, таких как анализ Biacore или ИФА.

[0073] Термин " k_{off} " или " k_d " относится к константе скорости диссоциации антитела из комплекса антитело/антиген. Скорость может быть определена с применением

стандартных анализов, таких как анализ Biacore или ИФА.

[0074] Термин " K_D " относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. K_D вычисляется по k_a/k_d . Скорость может быть определена с применением стандартных анализов, таких как анализ Biacore или ИФА.

[0075] Термин "p" или "соотношение антитело: лекарственное средство" или "соотношение лекарственного средства-к-антителу" или "DAR" относится к числу фрагментов лекарственного средства на фрагмент антитела, то есть, содержанию лекарственного средства или количеству фрагментов L-D на антитело или антигенсвязывающий фрагмент (Ab) в ADC Формулы I. В композициях, содержащих несколько копий ADC Формулы I, "p" относится к среднему числу фрагментов L-D на антитело или антигенсвязывающий фрагмент, также называемый средним содержанием лекарственного средства.

[0076] "Линкер" или "линкерный фрагмент" представляет собой любой химический фрагмент, который способен ковалентно соединяться с соединением, обычно фрагментом лекарственного средства, таким как химиотерапевтический агент, с другим фрагментом, таким как фрагмент антитела. Линкеры могут быть подвержены или практически устойчивыми к вызванному кислотой расщеплению, расщеплению, вызванному пептидазой, индуцированному светом расщеплению, расщеплению, вызванному эстеразой и/или расщеплению дисульфидной связи в условиях, когда соединение или антитело остаются активными.

[0077] В данном контексте термин "агент" применяется для обозначения химического соединения, смеси химических соединений, биологической макромолекулы или экстракта, полученного из биологических материалов. Термин "терапевтический агент", "лекарственное средство" или "фрагмент лекарственного средства" относится к агенту, который способен модулировать биологический процесс и/или обладает биологической активностью.

[0078] В данном контексте термин "химиотерапевтический агент" или "противораковый агент" применяется для обозначения всех химических соединений, которые эффективны при лечении рака независимо от механизма действия. Ингибирование метастазов или ангиогенеза часто является свойством химиотерапевтического агента. Неограничивающие примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, например, азотистые иприты, этилениминовые соединения и алкилсульфонаты; антиметаболиты, например фолиевую кислоту, пуриновые или пиримидиновые антагонисты; антимиотические агенты, например антитубулиновые агенты, такие как эрибулин или мезилат эрибулина (HalavenTM) или их производные, алкалоиды барвинка и ауристатины; цитотоксические антибиотики; соединения, которые повреждают или мешают экспрессии или репликации ДНК, например, белки, связывающиеся с малой бороздой ДНК; и антагонисты рецепторов фактора роста. Кроме того, химиотерапевтические агенты включают в себя антитела, биологические молекулы и малые молекулы. Химиотерапевтический агент может быть цитотоксическим или цитостатическим агентом. Термин "цитостатический агент" относится к агенту, который ингибирует или подавляет рост клеток и/или размножение клеток.

[0079] Термин "цитотоксический агент" относится к веществу, которое вызывает гибель клеток, главным образом, путем вмешательства в экспрессионную активность клетки и/или ее функционирование. Примеры цитотоксических агентов включают в себя, но не ограничиваются ими, антимиотические агенты, такие как эрибулин, ауристин (например, монометил ауристин Е (ММАЕ), монометил ауристин F

(ММАF)), майтанзиноиды (например, майтансин), доластатины, дуостатины, криптофицины, алкалоиды барвинка (например, винкристин, винбластин), таксаны, таксолы и колхицины; антрациклины (например, даунорубицин, доксорубицин, дигидроксиантрациндион); цитотоксические антибиотики (например, митомицины, актиномицины, дуокармицины (например, СС-1065), аурамицины, дуомицины, калихеамицины, эндомицины, феномицины); алкилирующие агенты (например, цисплатин); интеркалирующие агенты (например, бромид этидия); ингибиторы топоизомеразы (например, этопозид, тенопозид); радиоизотопы, такие как At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} или ^{213} , P^{32} , и радиоактивные изотопы лютеция (например, Lu^{177}); а также токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения (например, рицин (например, А-цепь рицина), дифтерийный токсин, экзотоксин А *Pseudomonas* (например, PE40), эндотоксин, митогеллин, комбрестатин, рестриктоцин, гелонин, альфа-сарцин, абрин (например, А-цепь абрина), модецин (например, А-цепь модецина), курицин, кротин, ингибитор *Saponaia officinalis*, глюкокортикоид).

[0080] В данном контексте термин "эрибулин" относится к синтетическому аналогу галихондрина В, макроциклического соединения, которое первоначально было выделено из морской губки *Halichondria okadae*. Термин "фрагмент лекарственного средства эрибулина" относится к компоненту ADC, который имеет структуру эрибулина, и присоединен к линкеру ADC через его амин С-35. Эрибулин является ингибитором динамики микротрубочек, который, как считается, связывает тубулин и индуцирует остановку клеточного цикла в фазе G2/M путем ингибирования сборки митотического веретена. Термин "мезилат эрибулина" относится к мезилатной соли эрибулина, которая продается под торговым названием Halaven™.

[0081] Термин "гомолог" относится к молекуле, которая проявляет гомологию с другой молекулой, имея, например, последовательности химических остатков, которые являются одинаковыми или похожими в соответствующих положениях.

[0082] В данном контексте термин "ингибировать" или "ингибирование" означает уменьшение на измеримое количество и может включать, но не требует полного предотвращения или ингибирования.

[0083] Термин "отрицательный на наличие цели" или "отрицательный на наличие целевого антигена" относится к отсутствию экспрессии целевого антигена клеткой или тканью. Термин "положительный на наличие цели" или "положительный на наличие целевого антигена" относится к присутствию экспрессии целевого антигена. Например, клетка или клеточная линия, которая не экспрессирует целевой антиген, могут быть описаны как отрицательные на наличие цели, тогда как клетка или клеточная линия, которая экспрессирует целевой антиген, может быть описана как положительные на наличие цели.

[0084] Термин "неспецифический цитолиз" или "эффект "свидетеля"" относится к убийству клеток, отрицательных на наличие цели в присутствии клеток, положительных на наличие цели, при этом убийство клеток, отрицательных на наличие цели не наблюдается в отсутствие клеток, положительных на наличие цели. Клеточный контакт или, по меньшей мере, близость между клетками, положительными на наличие цели и отрицательными на наличие цели делает возможным несспецифический цитолиз. Этот тип уничтожения отличается от "нецелевого уничтожения", которое относится к неизбежному убийству клеток, отрицательных на наличие цели. "Нецелевое уничтожение" может наблюдаться в отсутствие клеток, положительных на наличие

цели.

[0085] Термин "рак" относится к физиологическому состоянию у млекопитающих, в которых популяция клеток характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примеры рака включают, но не ограничиваются ими, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкемию. Более конкретные примеры таких злокачественных новообразований включают плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого, плоскоклеточную карциному легкого, рак органов брюшной полости, гепатоцеллюлярный рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы (например, трижды негативный рак молочной железы), остеосаркому, меланому, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак эндометрия (например, серозный) или рак матки, карциному слюнных желез, рак почки, рак печени, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карцинома печени и различные типы рака головы и шеи. Трижды негативный рак молочной железы относится к раку молочной железы, который является отрицательным на экспрессию генов рецептора эстрогена (ER), рецептора прогестерона (PR) или Her2/neu.

[0086] Термины "опухоль" и "новообразование" относятся к любой массе ткани, которая является результатом чрезмерного роста или пролиферации клеток, доброкачественных или злокачественных, включая предраковые поражения.

[0087] Термины "раковая клетка" и "опухолевая клетка" относятся к отдельным клеткам или общей популяции клеток, полученных из опухоли, включая как неопухолегенные клетки, так и раковые стволовые клетки. Применяемый в данном документе термин "опухолевая клетка" будет модифицироваться термином "неопухолегенный", когда он относится исключительно к тем опухолевым клеткам, у которых нет способности обновляться и дифференцироваться, чтобы отличать эти опухолевые клетки от раковых стволовых клеток.

[0088] Термины "субъект" и "пациент" применяются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения любого животного, такого как любое млекопитающее, включая, но не ограничиваясь ими, людей, приматов, отличных от человека, грызунов и тому подобное. В некоторых вариантах реализации изобретения млекопитающее представляет собой мышь. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее представляет собой человека.

[0089] Термин "совместное введение" или введение "в сочетании с" одним или более терапевтическими агентами включает одновременное и последовательное введение в любом порядке.

[0090] "Фармацевтическая композиция" относится к препарату, который находится в такой форме, которая позволяет вводить, а затем обеспечивает предполагаемую биологическую активность активного ингредиента(ов) и/или достигать терапевтического эффекта, и которая не содержит дополнительных компонентов, которые неприемлемо токсичны для субъекта, которому вводили препарат. Фармацевтическая композиция может быть стерильной.

[0091] "Фармацевтический наполнитель" включает материал, такой как адъювант, носитель, pH-регулирующие и буферные агенты, агенты для регулирования тоничности, смазывающие агенты, консервант и тому подобное.

[0092] "Фармацевтически приемлемые" средства одобряются или утверждаются регулирующим органом федерального правительства или правительства штата, или внесены в Фармакопею США или другую общепризнанную фармакопею для

применения на животных и, более конкретно, на людях.

[0093] "Эффективное количество" ADC, как описано в данном документе, представляет собой количество, достаточное для выполнения конкретно заявленной цели, например, для получения терапевтического эффекта после введения, такого как уменьшение скорости роста опухоли или объема опухоли, уменьшения симптома рака или некоторых других признаков эффективности лечения. Эффективное количество может быть определено в обычном порядке в отношении заявленной цели. Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству ADC, эффективного для лечения заболевания или расстройства у субъекта. В случае рака терапевтически эффективное количество ADC может уменьшать количество раковых клеток, уменьшать размер опухоли, ингибировать (например, замедлять или останавливать) метастазы опухолей, ингибировать (например, замедлять или останавливать) рост опухоли и/или облегчать один или более симптомов. "Профилактически эффективное количество" относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого профилактического результата. Как правило, поскольку профилактическая доза применяется у субъектов до или на более ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество будет меньше терапевтически эффективного количества.

[0094] Применяемый в данном документе термин "лечить" или "терапевтический" и грамматически связанные термины относятся к любому улучшению любых последствий заболевания, таких как пролонгированная выживаемость, меньшая заболеваемость и/или уменьшение побочных эффектов, которые являются побочными продуктами альтернативного терапевтического воздействия. Как легко понять в данной области техники, полное искоренение болезни является предпочтительным, но не обязательным для лечения. В данном контексте "лечение" или "лечить" относится к введению описанного ADC субъекту, например, пациенту. Лечение может заключаться в терапии, излечении, облегчении, уменьшении, изменении, заживании, устранении, ослаблении, улучшении или влиянии на расстройство, симптомы расстройства или предрасположенность к расстройству, например, раку.

[0095] В некоторых вариантах реализации изобретения применяется меченный ADC. Подходящие "метки" включают радионуклиды, ферменты, субстраты, кофакторы, ингибиторы, флуоресцентные фрагменты, хемилюминесцентные фрагменты, магнитные частицы и тому подобное.

[0096] Под "белком", как применяется в данном документе, подразумевается по меньшей мере две ковалентно присоединенные аминокислоты. Данный термин охватывает полипептиды, олигопептиды и пептиды. В некоторых вариантах реализации изобретения две или более ковалентно присоединенные аминокислоты присоединены с помощью пептидной связи. Белок может состоять из аминокислот естественного происхождения и пептидных связей, например, в случае если белок получают рекомбинантно с применением экспрессионных систем и клеток-хозяев. В альтернативном варианте, белок может включать в себя синтетические аминокислоты (например, гомофенилаланин, цитруллин, орнитин и норлейцин) или пептидомиметические структуры, то есть "пептидные или белковые аналоги", такие как пептоиды. Пептоиды представляют собой типовой класс пептидомиметиков, боковые цепи которых присоединены к атому азота пептидного остова, а не к α -атомам углерода (так как они находятся в аминокислотах) и имеют различные водородные связи и конформационные характеристики по сравнению с пептидами (см., например, Simon и соавт. (1992 год) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:9367). Как таковые, пептоиды

могут быть устойчивыми к протеолизу или другим физиологическим условиям или условиям хранения и эффективны при проникновении через клеточные мембраны. Такие синтетические аминокислоты могут быть включены, в частности, в случае если антитело синтезировано *in vitro* общепринятыми способами, хорошо известными в данной области техники. Кроме того, можно применять любую комбинацию пептидомиметических, синтетических и встречающихся в природе остатков/структур. Термин "аминокислота" также включает аминокислотные остатки, такие как пролин и гидроксипролин. Аминокислотная "группа R" или "боковая цепь" может быть либо в (L)-, либо в (S)-конфигурации. В конкретном варианте реализации изобретения аминокислоты находятся в (L)- или (S)-конфигурации.

[0097] "Рекомбинантный белок" представляет собой белок, полученный с применением рекомбинантных методов с применением любых методов и способов, известных в данной области техники, то есть посредством экспрессии рекомбинантной нуклеиновой кислоты. Способы и методы получения рекомбинантных белков хорошо известны в данной области техники.

[0098] "Выделенный" белок не сопровождается, по меньшей мере, некоторым продуктом, с которым он обычно связан в его естественном состоянии, например, составляющим по меньшей мере около 5% или по меньшей мере около 50% от общего веса белка в данном образце. Понятно, что выделенный белок может составлять от 5 до 99,9% массы общего содержания белка в зависимости от обстоятельств. Например, белок может быть получен в значительно более высокой концентрации за счет применения индуцибельного промотора или промотора повышенной экспрессии, так что белок получают в повышенных концентрациях. Определение включает продуцирование антитела в самых разных организмах и/или клетках-хозяевах, известных в данной области техники.

[0099] Для аминокислотных последовательностей идентичность последовательности и/или сходство могут быть определены с применением стандартных методов, известных в данной области техники, включая, но без ограничений, алгоритм идентификации локальной последовательности по Smith and Waterman (1981 год) Adv. Appl. Math. 2:482, алгоритм выравнивания идентичности последовательности по Needleman and Wunsch (1970 год) J. Mol. Biol. 48:443, способ поиска сходства по Pearson and Lipman (1988 год) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85:2444, компьютерные реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Мэдисон, штат Висконсин), программу последовательности Best Fit, описанную Devereux и соавт. (1984 год) Nucl. Acid Res. 12:387-95, предпочтительно применяя настройки по умолчанию или непосредственно проверкой. Предпочтительно, процентная идентичность вычисляется с помощью FastDB на основе следующих параметров: штраф несоответствия 1; штраф за пропуск в последовательности 1; размер штрафа за пропуск в последовательности 0,33; и штраф соединения 30 ("Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, стр. 127-149 (1988 год), Alan R. Liss, Inc).

[00100] Примером полезного алгоритма является PILEUP. PILEUP создает множественное выравнивание последовательностей из группы подобных последовательностей с применением прогрессивных попарных выравниваний. Он также может отображать схему, показывающую отношения кластеризации, применяемые для создания выравнивания. PILEUP применяет упрощение способа прогрессивного выравнивания по Feng & Doolittle (1987 год) J. Mol. Evol. 35:351-60; способ аналогичен

описанному Higgins and Sharp (1989 год) CABIOS 5:151-3. Полезные параметры PILEUP включают штраф за открытие разрыва по умолчанию 3,00, штраф за продолжение разрыва по умолчанию 0,10 и оцениваемые концевые разрывы.

[00101] Другим примером полезного алгоритма является алгоритм BLAST, описанный в: Altschul и соавт. (1990 год) J. Mol. Biol. 215:403-10; Altschul и соавт. (1997 год) Nucleic Acids Res. 25:3389-402; и Karin и соавт. (1993 год) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-87. Особенно полезной программой BLAST является программа WU-BLAST-2, полученная от Altschul и соавт. (1996 год) Methods in Enzymology 266:460-80. WU-BLAST-2 применяет несколько параметров поиска, большинство из которых имеют значения по умолчанию. Регулируемые параметры задаются со следующими значениями: длина перекрытия=1, доля перекрытия=0,125, пороговая длина слова (T)=П. Параметры HSP S и HSP S2 являются динамическими значениями и определяются самой программой в зависимости от состава конкретной последовательности и состава конкретной базы данных, с которой осуществляется поиск последовательности, представляющей интерес; однако значения могут быть скорректированы для повышения точности.

[00102] Дополнительным полезным алгоритмом является gapped BLAST, как сообщается в Altschul и соавт. (1993 год) Nucl. Acids Res. 25:3389-402. Gapped BLAST применяет очки замещения BLOSUM-62; пороговый параметр T установлен на 9; метод двойного удара применяется для запуска расширений ungapped, цена длины разрыва k составляет 10+k; Xu установлен на 16, а Xg установлен на 40 для этапа поиска в базе данных и на 67 для этапа вывода алгоритмов. Выравнивания gapped запускаются с помощью оценки, соответствующей около 22 битам.

[00103] Как правило, гомология аминокислот, сходство или идентичность между белками, описанными в данном документе, и их вариантами, включая варианты FRA, варианты her2, варианты последовательностей тубулина и варианты вариабельных доменов антитела (включая отдельные варианты CDR), составляют по меньшей мере 80% по отношению к последовательностям, представленным в данном документе, и как правило с предпочтительно возрастающими гомологиями или идентичностями по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и почти 100% или 100%.

[00104] Аналогичным образом, "процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" по отношению к последовательности нуклеиновой кислоты антител и других белков, определенных в данном документе, определяют, как процентное содержание нуклеотидных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны остаткам нуклеотидов в кодирующей последовательности антигенсвязывающего белка. В конкретном способе используется модуль BLASTN WU-BLAST-2 с параметрами по умолчанию, с длиной перекрытия и долей перекрытия, установленным на 1 и 0,125, соответственно.

[00105] Хотя сайт или область для введения вариации аминокислотной последовательности предопределены, мутация сама по себе не обязательно должна быть предопределена. Например, с целью оптимизации производительности мутации на данном сайте, случайный мутагенез может быть проведен в целевом кодоне или области, а экспрессированные варианты CDR антигенсвязывающего белка, скринированы на оптимальное сочетание желаемой активности. Методы получения замещающих мутаций на заранее определенных участках ДНК, имеющих известную последовательность, являются хорошо известными, например, мутагенез с применением праймера МЗ и мутагенез с применением ПЦР.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство

[00106] Соединения по данному изобретению включают соединения с противораковой активностью. В частности, соединения включают в себя фрагмент антитела (включая его антигенсвязывающий фрагмент), конъюгированный (то есть ковалентно связанный линкером) с фрагментом лекарственного средства, при этом фрагмент лекарственного средства, в случае если он не конъюгирован с фрагментом антитела, имеет цитотоксический или цитостатический эффект. В различных вариантах реализации изобретения фрагмент лекарственного средства проявляет пониженную цитотоксичность или ее отсутствие в случае если связан в конъюгате, но возобновляет цитотоксичность после расщепления из линкера и фрагмента антитела. В различных вариантах реализации изобретения фрагмент лекарственного средства демонстрирует уменьшение или отсутствие неспецифического цитолиза в случае если связан в конъюгате (например, с применением нерасщепляемого линкера), но проявляет повышенный неспецифический цитолиз после отщепления от конъюгата (например, конъюгата, имеющего расщепляемый фрагмент Val-Cit).

[00107] Разработка и производство ADC для применения в качестве терапевтического агента для человека, например, в качестве онкологического агента, может потребовать больше, чем идентификация антитела, способного связываться с желаемой целью или целями и прикрепляться к лекарственному средству, применяемому самостоятельно для лечения рака. Связывание антитела с лекарственным средством может оказывать значительное и непредсказуемое воздействие на активность одного или обоих антител и лекарственного средства, воздействия, которые будут варьироваться в зависимости от типа линкера и/или выбранного лекарственного средства. Поэтому в некоторых вариантах реализации изобретения компоненты ADC выбирают так, чтобы (i) сохранять одно или более терапевтических свойств, проявляемых антителом и фрагментами лекарственного средства при выделении, (ii) поддерживать специфические связывающие свойства фрагмента антитела; (iii) оптимизировать содержание лекарственного средства и соотношения лекарственного средства-к-антителу; (iv) позволить доставку, например, внутриклеточную доставку фрагмента лекарственного средства посредством стабильного присоединения к фрагменту антитела; (v) сохранять стабильность ADC в виде интактного конъюгата до транспортировки или доставки к целевому сайту; (vi) минимизировать агрегацию ADC до или после введения; (vii) позволить терапевтический эффект, например цитотоксический эффект, фрагмента лекарственного средства после расщепления в клеточной среде; (viii) продемонстрировать эффективность противораковой терапии *in vivo* сравнимую или превосходящую эффективность антитела и фрагментов лекарственного средства при выделении; (ix) свести к минимуму нецелевое уничтожение с помощью фрагмента лекарственного средства; и/или (x) продемонстрировать желаемые фармакокинетические и фармакодинамические свойства, формулируемость и токсикологические/иммунологические профили. Скрининг каждого из этих свойств может потребоваться для идентификации улучшенного ADC с целью терапевтического применения (Ab и соавт. (2015 год) *Mol. Cancer The* 14:1605-13).

[00108] В различных вариантах реализации изобретения описанные в данном документе ADC демонстрируют неожиданно благоприятные свойства в некоторых или каждой из перечисленных выше категорий. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения конструкции ADC, содержащие присоединение Mal к антителу, спейсерную единицу ПЭГ (предпочтительно короткую спейсерную единицу ПЭГ) и/или пептидный расщепляемый линкер (например, линкер Val-Cit) демонстрируют удивительно благоприятное содержание лекарственного средства, агрегацию и/или профили стабильности, и/или сохраняют функцию связывания антител, активность

лекарственного средства, и/или улучшенный неспецифический цитолиз, в то же время уменьшая нецелевое уничтожение, по сравнению с ADC, которые применяют другие расщепляемые или нерасщепляемые линкерные структуры.

[00109] В некоторых вариантах реализации ADC, содержащий линкер Mal-(ПЭГ)₂-Val-

Cit-pAB, соединяющий эрибулин с антителом (например, антителом к FRA, таким как MORAb-003), проявляет особенно благоприятные свойства по перечисленным категориям по сравнению с другими расщепляемыми или нерасщепляемыми линкерами, соединяющими эрибулин с фрагментом антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения ADC, содержащий линкер Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB, соединяющий эрибулин с антителом (например, антителом к FRA, таким как MORAb-003), проявляет особенно благоприятные свойства неспецифического цитолиза по сравнению с нерасщепляемым ADC. В некоторых вариантах реализации изобретения ADC, содержащий линкер Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB, соединяющий эрибулин с антителом (например, антителом к FRA, таким как MORAb-003), проявляет особенно благоприятные свойства неспецифического цитолиза по сравнению с ADC, который применяет альтернативные расщепляемые линкерные структуры.

[00110] В некоторых вариантах реализации изобретения ADC, содержащий линкер Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB, соединяющий эрибулин с MORAb-003, обладает более высоким

и более желательным соотношением лекарственное средство:антитело (то есть, соотношение около 3-4) по отношению к ADC, например, содержащим линкер, присоединенный к антителу через альтернативный фрагмент (например, сукцинимидный фрагмент). В некоторых вариантах реализации изобретения ADC, содержащий линкер Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB, соединяющий эрибулин с MORAb-003, обладает более высоким

и более желательным соотношением лекарственное средство:антитело и/или более низкими уровнями агрегации по отношению к ADC, например, содержащим более длинную спейсерную единицу (например, (ПЭГ)₈). В некоторых вариантах реализации изобретения ADC, содержащий линкер Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB, соединяющий эрибулин

с MORAb-003, демонстрирует более высокое и более желательное соотношение лекарственное средство:антитело, более низкие уровни агрегации, повышенное целевое уничтожение и/или уменьшенное нецелевое уничтожение по сравнению с ADC, например, содержащим альтернативный расщепляемый фрагмент (то есть непептидный расщепляемый фрагмент, такой как расщепляемый дисульфид или сульфонамид). В

некоторых вариантах реализации изобретения ADC, содержащий линкер Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB, соединяющий эрибулин с MORAb-003, демонстрирует повышенную стабильность, увеличенное целевое уничтожение, уменьшенное нецелевое уничтожение, более низкие уровни агрегации и/или более высокое и более желательное соотношение лекарственное средство:антитело по отношению к ADC, например, содержащим альтернативную аминокислотную единицу (например, Ala-Ala-Asn) или альтернативный расщепляемый фрагмент (например, расщепляемый дисульфид или сульфонамид).

[00111] В некоторых вариантах реализации изобретения ADC, содержащий линкер Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB, соединяющий эрибулин с MORAb-003, может наблюдаться с ADC, содержащими линкерный токсин Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB-эрибулин,

конъюгированный с антителом к Her2, таким как трастузумаб, или антителом к мезотелину.

[00112] Соединения ADC по данному изобретению могут избирательно доставлять эффективную дозу цитотоксического или цитостатического агента в раковые клетки

или в опухолевую ткань. Было обнаружено, что описанные ADC обладают сильной цитотоксической и/или цитостатической активностью против клеток, экспрессирующих соответствующий целевой антиген (например, FRA или her2). В некоторых вариантах реализации изобретения цитотоксическая и/или цитостатическая активность ADC зависит от уровня экспрессии целевого антигена в клетке. В некоторых вариантах реализации изобретения, описанные ADC особенно эффективны при убийстве раковых клеток, экспрессирующих целевой антиген на высоком уровне, по сравнению с раковыми клетками, экспрессирующими один и тот же антиген на низком уровне. В некоторых вариантах реализации изобретения, описанные ADC особенно эффективны при убийстве раковых клеток, экспрессирующих целевой антиген на умеренном уровне, по сравнению с раковыми клетками, экспрессирующими тот же самый антиген на низком уровне. Типовые раки с высоким уровнем экспрессии FRA включают в себя, но без ограничений, рак яичников (например, серозный рак яичников, светлоклеточный рак яичников), карциноид легких, трижды негативный рак молочной железы, рак эндометрия и немелкоклеточный рак легкого (например, аденокарцинома). Типовые раки с умеренным уровнем экспрессии FRA включают в себя, но без ограничений, рак желудка и колоректальный рак. Типовые раки с низким уровнем экспрессии FRA включают в себя, но без ограничений, меланому и лимфому. Типовые раки с высоким уровнем экспрессии her2 включают в себя, но без ограничений, рак молочной железы, рак желудка, рак пищевода, рак яичников и рак эндометрия. Типовые раки с умеренным уровнем экспрессии her2 включают в себя, но без ограничений, рак легких и рак мочевого пузыря.

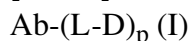
[00113] В некоторых вариантах реализации изобретения расщепление ADC высвобождает эрибулин из фрагмента антитела и линкера. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепление и высвобождение эрибулина улучшает цитотоксичность ADC. В некоторых вариантах реализации изобретения ADC, содержащий расщепляемый линкер, особенно эффективен при убийстве раковых клеток, включая неспецифический цитолиз, по сравнению с сопоставимым лечением с ADC, содержащим нерасщепляемый линкер. В некоторых вариантах реализации изобретения ADC, содержащий расщепляемый линкер (например, линкер Val-Cit), демонстрирует повышенное целевое уничтожение клеток и/или уменьшенное нецелевое уничтожение клеток по сравнению с ADC, содержащим нерасщепляемый линкер, (например, нерасщепляемый линкер (ПЭГ)₂ или (ПЭГ)₄), при этом в частности клетки и/или рак, получавшие ADC, не экспрессируют высокие уровни целевого антигена.

[00114] В некоторых вариантах реализации изобретения, описанные ADC также демонстрируют активность неспецифического цитолиза, но низкую нецелевую цитотоксичность. Не ограничиваясь теорией, активность неспецифического цитолиза ADC может быть особенно полезной, в случае если его проникновение в солидную опухоль ограничено и/или экспрессия целевого антигена среди опухолевых клеток является гетерогенной. В некоторых вариантах реализации изобретения ADC, содержащий расщепляемый линкер, особенно эффективен при неспецифическом цитолизе и/или демонстрирует улучшенную активность неспецифического цитолиза, по сравнению с сопоставимым лечением с ADC, содержащим нерасщепляемый линкер.

[00115] В данном изобретении представлены соединения ADC, содержащие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (Ab), который нацелен на опухолевую клетку, фрагмент лекарственного средства (D) и линкерный фрагмент (L), который ковалентно присоединяет Ab к D. В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут связываться с опухолеассоциированным антигеном (например, FRA

или her2) с высокой специфичностью и высокой аффинностью. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент интернализируются в целевую клетку при связывании, например, в деградирующий компартмент в клетке. Предпочтительными ADC являются, таким образом, те, которые интернализируются при связывании с целевой клеткой, подвергаются деградации и высвобождают фрагмент лекарственного средства для уничтожения раковых клеток. Фрагмент лекарственного средства может быть высвобожден из антитела и/или линкерного фрагмента ADC путем ферментативного действия, гидролиза, окисления или любого другого механизма.

[00116] Типовой ADC соответствует Формуле I:



где Ab=фрагмент антитела (то есть, антитело или антигенсвязывающий фрагмент), L=линкерный фрагмент, D=фрагмент лекарственного средства и p=количество фрагментов лекарственного средства на фрагмент антитела.

Антитела

[00117] Фрагмент антитела (Ab) Формулы I включает в свой объем любое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с целевым антигеном в раковой клетке. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент может связываться с целевым антигеном с константой диссоциации (K_D) ≤ 1 мМ, ≤ 100 нМ или ≤ 10 нМ или любым значением между ними, как измерено, например, с помощью анализа VIAcore®. В определенных вариантах реализации изобретения K_D составляет от 1 пМ до 500 пМ. В некоторых вариантах реализации изобретения K_D составляет от 500 пМ до 1 мкМ, от 1 мкМ до 100 нМ или от 100 мМ до 10 нМ.

[00118] В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент антитела представляет собой четырехцепочечное антитело (также называемое иммуноглобулином), содержащее две тяжелые цепи и две легкие цепи. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент антитела представляет собой двухцепочечное тело (одну легкую цепь и одну тяжелую цепь) или антигенсвязывающий фрагмент иммуноглобулина.

[00119] В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент антитела является интернализирующимся антителом или его интернализирующимся антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело связывается с целевым раковым антигеном, экспрессируемым на поверхности клетки, и проникает в клетку при связывании. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент лекарственного средства ADC высвобождается из фрагмента антитела ADC после того, как ADC проникает в клетку, и присутствует в клетке, экспрессирующей целевой раковый антиген (то есть после того, как ADC был интернализован).

[00120] Аминокислоты и последовательности нуклеиновых кислот типовых антител по данному изобретению приведены в Таблицах 1-9.

Таблица 1. Антитела

мАт	Класс/Изотип	Цель
MORAb-003	гуманизированное	человеческий рецептор фолиевой кислоты альфа
MORAb-009	химерное мышинное-человеческое	человеческий мезотелин
трастузумаб	гуманизированное	her2/neu человека
33011-xi	химерное кроличье-человеческое	человеческий мезотелин
33011-zu	гуманизированное	человеческий мезотелин

111B10-xi	химерное кроличье-человеческое	человеческий мезотелин
111B10-zu	гуманизированное	человеческий мезотелин
201C15-xi	химерное кроличье-человеческое	человеческий мезотелин
201C15-zu	гуманизированное	человеческий мезотелин
346C6-xi	химерное кроличье-человеческое	человеческий мезотелин
346C6-zu	гуманизированное	человеческий мезотелин

Сокращения: xi - химерное; zu - гуманизированное.

Таблица 2. Аминокислотные последовательности вариабельных областей мАт

	мАт	цепь IgG	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
1	MORAb-003	Тяжелая цепь	23	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFTFSGYGLSWVRQAPC KGLEWVAMISSGGSYTYYADSVKGRFAISRDNKNTLFLQM DSLRLPEDTGVYFCARHGDDPAWFAYWGQGPVTVSS
2	MORAb-003	Легкая цепь	24	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSVSSSISSNNLHWYQQKPGK APKPWIYGTSLNLAGVPSRFSGSGSGTDYFTFTISLQPEDIATY YCQQWSSYPMYTFGQGTKEIK
3	MORAb-009	Тяжелая цепь	25	QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSTGYTMNWVKQSH GKSLEWIGLITPYNGASSYNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDL LSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGSGTPVTVSS
4	MORAb-009	Легкая цепь	26	DIELTQSPAIMASPGKEVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTS PKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGNSYSLTISSVEAEDDATY YCQQWSKHPLTFGSGTKVEIK
5	трастузумаб	Тяжелая цепь	27	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPC KGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQM NSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTILTVSS
6	трастузумаб	Легкая цепь	28	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPG KAPKLLIYASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQHYTTPPTFGQGTKEIK
7	33011-xi	Тяжелая цепь	29	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGISLSSDAISWVRQAPGK LEYIGIINGGGNTYYASWAKGRFTISKSTTTVDLKITSPTTEDT ATYFCARGIQHGGGNSDYYYYGMDLWGPGTLTVSS
8	33011-xi	Легкая цепь	30	EVLMTQTPSSVSAVAGDVTITKQASQSISSVLSWYQQKPGQ PKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISDLECDDAATY YCQTYNGTSSSNYGFAFGGGTEVVVK
9	33011-zu	Тяжелая цепь	31	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGISLSSDAISWVRQAPG KGLEIYIGIINGGGNTYYASWAKGRFTISRHNSKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARGIQHGGGNSDYYYYGMDLWGQGTILTV SS
10	33011-zu	Легкая цепь	32	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQSISSVLSWYQQKPGKA PKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQCEDIATYYC QTNYGTSSSNYGFAFGGGTKVEIK
11	111B10-xi	Тяжелая цепь	33	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLNNYAMSWVRQAPGK GLEWIGSISTGGLAFYANWAKGRFTISRSTTTVDLKMTSLTTE DTATYFCGRNGGGSYIFYYFDLWGQGTILTVSS
12	111B10-xi	Легкая цепь	34	AFELTQTPSSVEAAVGGTITIKQASQSISSVLSWYQQKPGQP PKLLIYASLTASGVSSRFKSGSGTEYLTISDLECADAATYF CQSYIDIGTSTFGGGTEVVVK
13	111B10-zu	Тяжелая цепь	35	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLNNYAMSWVRQAP GKGLEWIGSISTGGLAFYANWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNS SLRAEDTAVYYCARNGGGSYIFYYFDLWGQGTILTVSS
14	111B10-zu	Легкая цепь	36	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQSISSVLSWYQQKPGKA PKLLIYASLTASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQCEDAATYYC CQSYIDIGTSTFGGGTKVEIK
15	201C15-xi	Тяжелая цепь	37	QSVKESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLSSYAMGWFRQAPGK GLEIYIGTINIGGRVYYASWAKGRFTISRSTTTVDLKAPSLTAE DTATYFCARYYNGGSDIWDGPGTLTVSL
16	201C15-xi	Легкая цепь	38	DVVMQTQTPASASEPVGGTVTIKQASESIYRVLAWYQQKPG QPPKLLIYDTSTLASGAPSRFKSGSGYGTFTLTISGVQCEDAA TYCQGGYYADSYGIAFGGGTEVVVK
17	201C15-zu	Тяжелая цепь	39	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGIDLSSYAMGWVRQAP GKGLEIYIGTINIGGRVYYASWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNS SLRAEDTAVYYCARYYNGGSDIWDGPGTLTVSS
18	201C15-zu	Легкая цепь	40	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCQASESIYRVLAWYQQKPGK APKLLIYDTSTLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQCDAAATY YCQGGYYADSYGIAFGGGTKVEIK
19	346C6-xi	Тяжелая цепь	41	QSVEESGGRLVKPDESLLTCTASGFSLSSYAMIWVRQAPGE GLEWIGTISTGGITYYASWAKGRFTISKSTTTVDLKITSPTTEDT TATYFCARGGYAASSAYLPYFDLWGQGTILTVSS

20	346C6-xi	Легкая цепь	42	AAVLTQTPSPVSAAVGGTVTISCQSSQSVYNNNNLAWFQQKP GQPPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISGVQCDDA ATYYCLGGCDDADTFAFGGGTEVVVK
21	346C6-zu	Тяжелая цепь	43	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMIWVRQAPG KGLEWIGTISTGGITYYASWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNS LRAEDTAVYYCARGGYAASSAYLYPYFDLWGQGLTVVSS
22	346C6-zu	Легкая цепь	44	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCQSSQSVYNNNNLAWYQQKP GKVPKLLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQCEDAA TYYCLGGCDDADTFAFGGGTKVEIK

Таблица 3. Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие переменные области мАТ

	мАТ	цепь IgG	SEQ ID NO	Последовательность нуклеиновой кислоты
1	MORAb-003	Тяжелая цепь	45	GAGGTCCAACCTGGTGGAGAGCGGTGGAGGTGTTGTGCAAC CTGGCCGGTCCCTGCGCCTGTCTGCTCCGCATCTGGCTTC ACCTTCAGCGGCTATGGGTTGTCTTGGGTGAGACAGGCAC CTGGAAGAGGTCTTGAGTGGGTGCAATGATTAGTAGTGG TGGTAGTTATACCTACTATGCAGACAGTGTGAAGGTTAGA TTTGCAATATCGCGAGACAAGCCAAGAACAATTGTTC TGCAATGGACAGCCTGAGACCCGAAGACACCGGGGTCTA TTTTTGTGCAAGACATGGGGACGATCCCGCCTGGTTCGCTT ATTGGGGCCAAGGGACCCCGTCAACCGTCTCCTCA
2	MORAb-003	Легкая цепь	46	GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCA CGGTGGGTGACAGAGTGACCATCACCTGTAGTGTACAGTC AAGTATAAGTTCCAACAACCTGCACTGTACCAGCAGAAG CCAGGTAAGGCTCCAAAGCCATGGATCTACGGCAGATCCA ACCTGGCTTCTGGTGTGCCAAGCAGATTACGCGGTAGCGG TAGCGGTACCGACTACACCTTACCATCAGCAGCCTCCAG CCAGAGGACATCGCCACCTACTACTGCCAACAGTGGAGTA GTTACCCGTACATGTACACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGT GGAAATCAAA
3	MORAb-009	Тяжелая цепь	47	CAGGTACAACCTGCAGCAGTCTGGGCCTGAGCTGGAGAAGC CTGGCGCTTCACTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTAC TCATTCAGTGGCTACACCATGAACCTGGGTGAAGCAGAGCC ATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGACTTATTACTCCTTAC AATGGTGTCTTAGCTACAACCAGAAGTTACGGGGCAAGG CCACATTAACCTGTAGACAAGTCATCCAGCACAGCCTACAT GGACCTCCTCAGTCTGACATCTGAAGACTCTGCAGTCTATT TCTGTGCAAGGGGGGGTTACGACGGGAGGGGTTTGTACTA CTGGGGATCCGGGACCCCGTCAACCGTCTCCTCA
4	MORAb-009	Легкая цепь	48	GACATCGAGCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATC TCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCCAGCTCA AGTGAAGTTACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCA CCTCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCCAACTGGC TCTGGAGTCCAGGTCGCTTCACTGGCAGTGGGTCTGGA AACTCTTACTCTCTACAATCAGCAGCGTGGAGGCTGAAG ATGATGCAACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAAGCACCC TCTACGTTTCGGATCCGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
5	33011-xi	Тяжелая цепь	49	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTGCGCTGGTCAAGCCTG GGACACCCCTGACACTCACCTGCACCGTCTCTGGAATCTCC CTCAGTAGCGATGCAATAAGCTGGGTCCGCCAGGCTCAG GGAAGGGGCTCGAATACATCGGAATCATTAATGGTGGTGG TAACACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACAC ATCTCCAAAACCTCGACCACGGTGGATCTGAAAATCACCA GTCCGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTCTGTGCCAG AGGCAATCAACATGGTGGTGGTAATAGTGATTATTATTAT ACGGCATGGACCTCTGGGGCCCGACCCCTGGTCACTGT CTCTTCA
6	33011-xi	Легкая цепь	50	GAAGTGTTGATGACCCAGACTCCATCCTCCGTGTCTGCAGC TGTGGGAGACACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAG AGCATTAGTAGTGTCTTGTCTGGTATCAGCAGAAACCA GGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTATCTGGCATCCACTTG GCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTACGCGGCAGTAGATCTG GGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCGACCTGGAGTGTGA CGATGCTGCCACTTACTACTGTCAAACCAATTATGGTACTA GTAGTAGTAATTATGGTTTGTCTTTCGGCGGAGGGACCGA GGTGGTCTGCAAA
7	33011-zu	Тяжелая цепь	51	GAAGTCCAACCTGGTGGAAAGCGGGGGAGGACTGGTGCAG CCGGGCGGATCCCTCCGGCTGTCTGTCTGCATCGGGAA TTCCCTCTCCTCCGACGCGATTAGCTGGGTGAGACAGGCC CCCGGAAAGGGGCTGGAGTACATCGGTATCATCAACGGCG GCGGAAACACCTACTACGCTCCTGGGCCAAGGGCCGCTT CACCATCTCGCGGCATAATTCCAAGAACTCTGTACTTGC AAATGAACCTCCCTGAGGGCCGAGGACACCGCGGTGACTA CTGCGCGCGCGCATCCAGCACGGTGGTGGAAACAGCGAC TACTACTACTATGGGATGGATCTGTGGGGCCAGGGAACTC

				TTGTGACCGTGTCTGTC
8	33011-zu	Легкая цепь	52	GACATTCAGATGACCCAGTCCCCAAGCTCGCTGTCCGCCCTC CGTGGGCGACCGCGTGACCATCACGTGCCAGGCGTCCCAG TCAATTAGCAGCGTGCTCTCCTGGTACCAACAGAAGCCGG GGAAAGCACCCAAGCTGCTGATCTACTTGGCCTCCACTCTG GCCTCGGGAGTGCCTTCACGGTTCTCCGGATCGGGATCTGG TACTGATTTACCCCTCACCATCTCGAGCCTTCAGTGCGAGG ACATCGCTACTTACTATTGTCAAACCAACTACGGAACCTCC AGCTCCAACCTACGGCTTTGCCTTCGGTGGCGGGACCAAGG TCGAAATCAAAA
9	111B10-xi	Тяжелая цепь	53	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTGCGCTGGTCACGCGCTG GGACACCCCTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGGATTCTCC CTCAATAACTATGCAATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAG GGAAGGGGCTGGAATGGATCGGATCCATTAGTACTGGTGG TCTCGCATTTCTACGCGAACTGGGCAAAAGGCCGATTACCC ATCTCCAGAACCTCGACCACGGTGGATCTGAAAATGACCA GTCTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGGCAG AAATGGTGGTGGTAGTTATATTTTCTATTATTTTGACTTGT GGGGCCAAGGCACCCCTCGTCACTGTCTCTTCA
10	111B10-xi	Легкая цепь	54	GCATTGCAATTGACCCAGACTCCATCCTCCGTGGAGGCAG CTGTGGGAGGCACAATCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCA GAGCATTAGTAGTTACTTATCCTGGTATCAGCAGAAACCA GGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTATTCTGCATCCACTCT GGCATCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCT GGGACAGAGTACACTCTCACCATCAGCGACCTGGAGTGTG CCGATGCTGCCACTTACTTCTGTCAAAGCTATTATGATATT GGTACTAGTACTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTCGTCA AA
11	111B10-zu	Тяжелая цепь	55	GAAGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGGCGGACTGGTGACG CTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCTCCGGCTTC TCCCTGAACAACCTACGCCATGTCTGGGTGCGACAGCCCC CTGGCAAAGGCCCTGGAATGGATCGGCTCCATCAGCACAGG CGGCCTGGCCTTCTACGCCAATTGGGGCAAGGGCCGGTTCC ACCATCAGCCGGGACAACCTCCAAGAACACCCTGTACCTCC AGATGAACCTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTA CTGTGCCAGAAACGGCGGAGGCTCCTACATCTTCTACTACT TCGACCTGTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGACAGTGTCACT
12	111B10-zu	Легкая цепь	56	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCCGCTTC TGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCAGGCCTCCCAG TCCATCTCCTCCTACCTGTCTGGTATCAGCAGAAAGCCCG CAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACTCTGCCTCCACACTGG CCTCCGGCGTGCCTCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGC ACCGACTTTACCCTGACCATCAGCTCCCTCCAGTGCAGGGA TGCCGCCACCTACTACTGCCAGTCTACTACGACATCGGCA CCTCCACCTTCGGCGGAGGACCAAGGTGGAAATCAAAA
13	201C15-xi	Тяжелая цепь	57	CAGTCAGTGAAGGAGTCCGGGGGTGCGCTGGTCAACGCTG GGACACCCCTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGGAATCGA CCTCAGTAGCTATGCAATGGGCTGGTTCGCCAGGCTCCA GGGAAGGGGCTGGAATACATCGGAACCATTAATATTGGTG GTCGCGTATATTACGCGAGCTGGGCAAAAGGCCGATTAC CATCTCCAGAACCTCGACACGGTGGATCTGAAAGCGCCC AGTCTGACAGCCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCCA GATATTATAATGGTGGTAGTTATGACATCTGGGGCCAGG CACCTGGTCACCGTCTCTTTA
14	201C15-xi	Легкая цепь	58	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCAGCCTCCGCGTCTGAACC TGTGGGAGGCACAGTCAACATCAAGTGCCAGGCCAGTGAG AGCATTTATCGCGTATTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAG GGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTATGATACATCCACTCTG GCATCTGGGGCCCCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATATG GGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCGGCGTGCAGTGTGA AGATGCTGCCACTTACTACTGTCAAAGGCGGTTATTATGCTG ATAGTTATGGTATTGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGT GGTCAAAA
15	201C15-zu	Тяжелая цепь	59	CAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGAGGACTGGTGACG CTGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTGTTCCGCCTCCGGAATC GACCTGTCTCTCCTACGCTATGGGCTGGGTGCGACAGGCTCC TGGAAGGGCCTGGAGTACATCGGCACCATCAACATCGGC GGCAGAGTGTACTACGCCTCCTGGGCCAAGGGCCGGTTCA CCATCTCCAGAGACAACCTCCAAGAACACCCTGTACCTCCA GATGAACCTCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTAC TGCGCCCGGTACTACAACGGCGGCTCCTACGATATCTGGG GCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTCT
16	201C15-zu	Легкая цепь	60	GATATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCACCCTGTCTGCCTC TGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCAAGGCCTCCGAG TCCATCTACCGGGTCTGGCCTGGTATCAGCAGAAAGCCTG GCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACGACACCAGCACACT GGCCTCCGGCGTGCCTCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTC GCACCGAGTTTACCCTGACCATCTCCAGCCTCCAGTGCAGC GACGCCGCCACCTACTATTGTACGGGCGGCTACTACGCCG

					ACTCCTACGGAATCGCTTTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGA AATCAAA
5	17	346C6-xi	Тяжелая цепь	61	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGCGGTTCGCCTGGTAAAGCCTG ACGAATCCCTGACACTCACCTGCACAGCCTCTGGATTCTCC CTCAGTAGTTATGCAATGATCTGGGTCCGCCAGGCTCCAG GGGAGGGGCTGGAATGGATCGGAACCATAGTACTGGTGG TATCACATACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTCAAC ATCTCCAAAACCTCGACCACGGTGGATCTGAAAATCACCA GTCCGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTCTGTGCCAG AGGGGGATATGCTGCTAGTAGTGCTTATTATCTCCCGTACT ACTTTGACTTGTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCC TCA
10	18	346C6-xi	Легкая цепь	62	GCAGCCGTGCTGACCCAGACACCATCACCCGTGTCTGCAG CTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAGTTGCCAGTCCAGTCA GAGTGTTTATAATAATAACAACCTTAGCCTGGTTTCAGCAGA AACCCGGGCAGCCTCCCAAGCTTCTGATCTATCTGGCATCC ACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCACGGTTCAGCGGCAGTG GATCTGGGACACAGTTCACCTCACCATCAGCGGCGTGCA GTGTGACGATGCTGCCACTTATTACTGTCTAGGTGGTTGTG ATGATGATGCTGATACTTTTGCTTTCGGCGGAGGGACTGAG GTGGTGGTCAAA
15	19	346C6-zu	Тяжелая цепь	63	GAAGTGCAGCTGGTGGAATCTGGCGGGCGGACTGGTGCAGC CTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCTCCGGCTTC TCCCTGTCTCTCTACGCTATGATCTGGGTGCGACAGGCCCC TGGCAAGGGCCTGGAATGGATCGGCACCATCTCTACCGGC GGAATTACCTACTACGCCTCTGGGCCAAGGGCCGGTTCA CCATCTCCAGAGACAACCTCAAGAACACCTGTACTCCA GATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTAT TGTGCTAGAGGCGGCTACGCCGCCAGCTCCGCTTACTACCT GCCCTACTACTTCGACCTGTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTG ACAGTGTCACT
20	20	346C6-zu	Легкая цепь	64	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCCGCTTC TGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTGTCAGTCTCTCCAG TCCGTGTATAACAACAACAACCTGGCCTGGTATCAGCAGA AACCCGGCAAGGTGCCCAAGCTGCTGATCTACCTGGCCTC CACACTGGCCTCTGGCGTGCCCTCTAGATTCTCCGGCTCTG GCTCTGGCACCGACTTTACCTTGACCATCAGCTCCCTCCAG TGCGAGGATGCCGCCACCTACTATTGCCTGGGCGGCTGCG ACGACGACGCCGATACCTTTGCTTTTGGCGGAGGCACCAA GGTGGAATCAAA

Таблица 4. Аминокислотные последовательности CDR мАт по Кабату

	мАт	цепь IgG	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность	
30	1	MORAb-003	HC CDR1	2	GYGLS
	2	MORAb-003	HC CDR2	3	MISSGGSYTTYADSVKG
	3	MORAb-003	HC CDR3	4	HGDDPAWFAY
	4	MORAb-003	LC CDR1	7	SVSSSISSNNLH
	5	MORAb-003	LC CDR2	8	GTSNLAS
	6	MORAb-003	LC CDR3	9	QQWSSYPMYT
35	7	MORAb-009	HC CDR1	65	GYTMN
	8	MORAb-009	HC CDR2	66	LITPYNGASSYNQKFRG
	9	MORAb-009	HC CDR3	67	GGYDGRGFDY
	10	MORAb-009	LC CDR1	68	SASSSVSYMH
	11	MORAb-009	LC CDR2	69	DTSKLAS
	12	MORAb-009	LC CDR3	70	QQWSKHPLT
40	13	трастузумаб	HC CDR1	71	DTYIH
	14	трастузумаб	HC CDR2	72	RIYPTNGYTRYADSVKG
	15	трастузумаб	HC CDR3	73	WGGDGFYAMDY
	16	трастузумаб	LC CDR1	74	RASQDVNTAVA
	17	трастузумаб	LC CDR2	75	SASFLYS
	18	трастузумаб	LC CDR3	76	QQHYTTPPT
45	19	33011-xi	HC CDR1	77	SDAIS
	20	33011-xi	HC CDR2	78	IINGGGNTYYASWAKG
	21	33011-xi	HC CDR3	79	GIQHGGGNSDYYYYGMDL
	22	33011-xi	LC CDR1	80	QASQSISSVLS
	23	33011-xi	LC CDR2	81	LASTLAS
	24	33011-xi	LC CDR3	82	QTNYGTSSSNYGFA

5	25	33011-zu	HC CDR1	83	SDAIS
	26	33011-zu	HC CDR2	84	IINGGGNTYYASWAKG
	27	33011-zu	HC CDR3	85	GIQHGGGNSDYYYYYGMDL
	28	33011-zu	LC CDR1	86	QASQSISSVLS
	29	33011-zu	LC CDR2	87	LASTLAS
10	30	33011-zu	LC CDR3	88	QTNYGTSSSNYGFA
	31	111B10-xi	HC CDR1	89	NYAMS
	32	111B10-xi	HC CDR2	90	SISTGGLAIFYANWAKG
	33	111B10-xi	HC CDR3	91	NGGGSYIFYFYFDL
	34	111B10-xi	LC CDR1	92	QASQSISSYLS
15	35	111B10-xi	LC CDR2	93	SASTLAS
	36	111B10-xi	LC CDR3	94	QSYDIGTST
	37	111B10-zu	HC CDR1	95	NYAMS
	38	111B10-zu	HC CDR2	96	SISTGGLAIFYANWAKG
	39	111B10-zu	HC CDR3	97	NGGGSYIFYFYFDL
20	40	111B10-zu	LC CDR1	98	QASQSISSYLS
	41	111B10-zu	LC CDR2	99	SASTLAS
	42	111B10-zu	LC CDR3	100	QSYDIGTST
	43	201C15-xi	HC CDR1	101	SYAMG
	44	201C15-xi	HC CDR2	102	TINIGGRVYYASWAKG
25	45	201C15-xi	HC CDR3	103	YYNGGSYDI
	46	201C15-xi	LC CDR1	104	QASESIYRVLA
	47	201C15-xi	LC CDR2	105	DTSTLAS
	48	201C15-xi	LC CDR3	106	QGGYYADSYGIA
	49	201C15-zu	HC CDR1	107	SYAMG
30	50	201C15-zu	HC CDR2	108	TINIGGRVYYASWAKG
	51	201C15-zu	HC CDR3	109	YYNGGSYDI
	52	201C15-zu	LC CDR1	110	QASESIYRVLA
	53	201C15-zu	LC CDR2	111	DTSTLAS
	54	201C15-zu	LC CDR3	112	QGGYYADSYGIA
35	55	346C6-xi	HC CDR1	113	SYAMI
	56	346C6-xi	HC CDR2	114	TISTGGITYYASWAKG
	57	346C6-xi	HC CDR3	115	GGYAASSAYLPPYYFDL
	58	346C6-xi	LC CDR1	116	QSSQSVYNNNNLA
	59	346C6-xi	LC CDR2	117	LASTLAS
40	60	346C6-xi	LC CDR3	118	LGGCDDADTFA
	61	346C6-zu	HC CDR1	119	SYAMI
	62	346C6-zu	HC CDR2	120	TISTGGITYYASWAKG
	63	346C6-zu	HC CDR3	121	GGYAASSAYLPPYYFDL
	64	346C6-zu	LC CDR1	122	QSSQSVYNNNNLA
45	65	346C6-zu	LC CDR2	123	LASTLAS
	66	346C6-zu	LC CDR3	124	LGGCDDADTFA

Таблица 5. Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие CDR мАт по Кабату

40		мАт	цепь IgG	SEQ ID NO	Последовательность нуклеиновой кислоты
	1	MORAb-003	HC CDR1	125	GGCTATGGGTTGTCT
45	2	MORAb-003	HC CDR2	126	ATGATTAGTAGTGGTGGTAGTTATACCTACTATGCAGACAGT GTGAAGGGT
	3	MORAb-003	HC CDR3	127	CATGGGGACGATCCCGCTGGTTCGCTTAT
50	4	MORAb-003	LC CDR1	128	AGTGTCACTCAAGTATAAGTTCCAACAACCTTGCAC
	5	MORAb-003	LC CDR2	129	GGCACATCCAACCTGGCTTCT
55	6	MORAb-003	LC CDR3	130	CAACAGTGGAGTAGTTACCCGTACATGTACACG
	7	MORAb-009	HC CDR1	131	GGCTACACCATGAAC
60	8	MORAb-009	HC CDR2	132	CTTATTACTCCTTACAATGGTGTCTTCTAGCTACAACCAGAAG TTCAGGGGC
	9	MORAb-009	HC CDR3	133	GGGGGTTACGACGGGAGGGGTTTGTACTAC

5	10	MORAb-009	LC CDR1	134	AGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCAC
	11	MORAb-009	LC CDR2	135	GACACATCCAACTGGCTTCT
	12	MORAb-009	LC CDR3	136	CAGCAGTGGAGTAAGCACCTCTCACG
	13	33011-xi	HC CDR1	137	AGCGATGCAATAAGC
	14	33011-xi	HC CDR2	138	ATCATTAAATGGTGGTGGTAACACATACTACGCGAGCTGGGC GAAAGGC
10	15	33011-xi	HC CDR3	139	GGCATTCAACATGGTGGTGGTAATAGTGATTATTATTATTAC GGCATGGACCTC
	16	33011-xi	LC CDR1	140	CAGGCCAGTCAGAGCATTAGTAGTGTCTTGTC
	17	33011-xi	LC CDR2	141	CTGGCATCCACTCTGGCATCT
	18	33011-xi	LC CDR3	142	CAAACCAATTATGGTACTAGTAGTAGTAATTATGGTTTTGCT
	19	33011-zu	HC CDR1	143	TCCGACGCGATTAGC
15	20	33011-zu	HC CDR2	144	ATCATCAACGGCGGGCGAAACCTACTACGCCTCCTGGGC CAAGGGC
	21	33011-zu	HC CDR3	145	GGCATCCAGCACGGTGGTGGAAACAGCGACTACTACTACTA TGGGATGGATCTG
	22	33011-zu	LC CDR1	146	CAGGCGTCCAGTCAATTAGCAGCGTGCTCTCC
	23	33011-zu	LC CDR2	147	TTGGCCTCCACTCTGGCCTCG
	24	33011-zu	LC CDR3	148	CAAACCACTACGGAACCTCCAGCTCCAACTACGGCTTTGCC
20	25	111B10-xi	HC CDR1	149	AACTATGCAATGAGC
	26	111B10-xi	HC CDR2	150	TCCATTAGTACTGGTGGTCTCGCATTCTACGCGAACTGGGCA AAAGGC
	27	111B10-xi	HC CDR3	151	AATGGTGGTGGTAGTTATATTTCTATTATTTTGACTTG
	28	111B10-xi	LC CDR1	152	CAGGCCAGTCAGAGCATTAGTAGTTACTTATCC
	29	111B10-xi	LC CDR2	153	TCTGCATCCACTCTGGCATCT
25	30	111B10-xi	LC CDR3	154	CAAAGCTATTATGATATTGGTACTAGTACT
	31	111B10-zu	HC CDR1	155	AACTACGCCATGTCC
	32	111B10-zu	HC CDR2	156	TCCATCAGCACAGGCGGCCTGGCCTTCTACGCCAATTGGGCC AAGGGC
	33	111B10-zu	HC CDR3	157	AACGGCGGAGGCTCCTACATCTTCTACTACTTCGACCTG
	34	111B10-zu	LC CDR1	158	CAGGCCTCCAGTCCATCTCCTCTACCTGTCC
30	35	111B10-zu	LC CDR2	159	TCTGCCTCCACTGGCCTCC
	36	111B10-zu	LC CDR3	160	CAGTCCTACTACGACATCGGCACCTCCACC
	37	201C15-xi	HC CDR1	161	AGCTATGCAATGGGC
	38	201C15-xi	HC CDR2	162	ACCATTAATATTGGTGGTCTGCGTATATTACGCGAGCTGGGCA AAAGGC
	39	201C15-xi	HC CDR3	163	TATTATAATGGTGGTAGTTATGACATC
35	40	201C15-xi	LC CDR1	164	CAGGCCAGTGAGAGCATTATCGCGTATTGGCC
	41	201C15-xi	LC CDR2	165	GATACATCCACTCTGGCATCT
	42	201C15-xi	LC CDR3	166	CAAGGCGGTTATTATGCTGATAGTTATGGTATTGCT
	43	201C15-zu	HC CDR1	167	TCCTACGCTATGGGC
	44	201C15-zu	HC CDR2	168	ACCATCAACATCGGCGGCAGAGTGTACTACGCCTCCTGGGC CAAGGGC
40	45	201C15-zu	HC CDR3	169	TACTACAACGGCGGCTCCTACGATATC
	46	201C15-zu	LC CDR1	170	CAGGCCTCCGAGTCCATCTACCGGGTGCTGGCC
	47	201C15-zu	LC CDR2	171	GACACCAGCACACTGGCCTCC
	48	201C15-zu	LC CDR3	172	CAGGGCGGCTACTACGCCGACTCTACGGAATCGCT
	49	346C6-xi	HC CDR1	173	AGTTATGCAATGATC
45	50	346C6-xi	HC CDR2	174	ACCATTAGTACTGGTGGTATCACATACTACGCGAGCTGGGCG AAAGGC
	51	346C6-xi	HC CDR3	175	GGGGGATATGCTGCTAGTAGTGCTTATTATCTCCCGTACTAC TTTGACTTG
	52	346C6-xi	LC CDR1	176	CAGTCCTCCAGTCCGTGTATAACAACAACCTGGCC
	53	346C6-xi	LC CDR2	177	CTGGCATCCACTCTGGCATCT
	54	346C6-xi	LC CDR3	178	CTAGGTGGTTGTGATGATGATGCTGATACTTTTGCT
45	55	346C6-zu	HC CDR1	179	TCCTACGCTATGATC
	56	346C6-zu	HC CDR2	180	ACCATCTCTACCGGCGGAATTACCTACTACGCCTCCTGGGCC AAGGGC
	57	346C6-zu	HC CDR3	181	GGCGGCTACGCCGCCAGCTCCGCTTACTACCTGCCCTACTAC TTCGACCTG

58	346C6-zu	LC CDR1	182	CAGTCCTCCCAGTCCGTGTATAACAACAACCTGGCC
59	346C6-zu	LC CDR2	183	CTGGCCTCCACACTGGCCTCT
60	346C6-zu	LC CDR3	184	CTGGGCGGCTGCGACGACGACGCCGATACCTTTGCT

Таблица 6. Аминокислотные последовательности CDR мАт IMGT

5

10

15

20

25

30

35

40

45

	мАт	цепь IgG	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
1	MORAb-003	HC CDR1	13	GFTFSGYG
2	MORAb-003	HC CDR2	14	ISSGGSYT
3	MORAb-003	HC CDR3	15	ARHGDDPAWFAY
4	MORAb-003	LC CDR1	16	SSISSNN
5	MORAb-003	LC CDR2	17	GTS
6	MORAb-003	LC CDR3	18	QQWSSYPMYT
7	MORAb-009	HC CDR1	185	GYSFTGYT
8	MORAb-009	HC CDR2	186	ITPYNGAS
9	MORAb-009	HC CDR3	187	ARGGYDGRGFDY
10	MORAb-009	LC CDR1	188	SSVS
11	MORAb-009	LC CDR2	189	DTS
12	MORAb-009	LC CDR3	190	QQWSKHPLT
13	трастузумаб	HC CDR1	191	GFNIKDTY
14	трастузумаб	HC CDR2	192	IYPTNGYT
15	трастузумаб	HC CDR3	193	SRWGGDGFYAMDY
16	трастузумаб	LC CDR1	194	QDVNTA
17	трастузумаб	LC CDR2	195	SAS
18	трастузумаб	LC CDR3	196	QQHYTTPT
19	33011-xi	HC CDR1	197	GISLSSDA
20	33011-xi	HC CDR2	198	INGGGNT
21	33011-xi	HC CDR3	199	ARGIQHGGGNSDYYYGMDL
22	33011-xi	LC CDR1	200	QSISSV
23	33011-xi	LC CDR2	201	LAS
24	33011-xi	LC CDR3	202	QTNYGTSNNYGFA
25	33011-zu	HC CDR1	203	GISLSSDA
26	33011-zu	HC CDR2	204	INGGGNT
27	33011-zu	HC CDR3	205	ARGIQHGGGNSDYYYGMDL
28	33011-zu	LC CDR1	206	QSISSV
29	33011-zu	LC CDR2	207	LAS
30	33011-zu	LC CDR3	208	QTNYGTSNNYGFA
31	111B10-xi	HC CDR1	209	GFSLNNYA
32	111B10-xi	HC CDR2	210	ISTGGLA
33	111B10-xi	HC CDR3	211	GRNGGGSYIFYFDL
34	111B10-xi	LC CDR1	212	QSISSY
35	111B10-xi	LC CDR2	213	SAS
36	111B10-xi	LC CDR3	214	QSYDIGTST
37	111B10-zu	HC CDR1	215	GFSLNNYA
38	111B10-zu	HC CDR2	216	ISTGGLA
39	111B10-zu	HC CDR3	217	ARNGGGSYIFYFDL
40	111B10-zu	LC CDR1	218	QSISSY
41	111B10-zu	LC CDR2	219	SAS
42	111B10-zu	LC CDR3	220	QSYDIGTST
43	201C15-xi	HC CDR1	221	GIDLSSYA
44	201C15-xi	HC CDR2	222	INIGGRV
45	201C15-xi	HC CDR3	223	ARYYNGGSYDI
46	201C15-xi	LC CDR1	224	ESYRV
47	201C15-xi	LC CDR2	225	DTS
48	201C15-xi	LC CDR3	226	QGGYYADSYGIA
49	201C15-zu	HC CDR1	227	GIDLSSYA
50	201C15-zu	HC CDR2	228	INIGGRV

51	201C15-zu	HC CDR3	229	ARYYNGGSYDI
52	201C15-zu	LC CDR1	230	ESIYRV
53	201C15-zu	LC CDR2	231	DTS
54	201C15-zu	LC CDR3	232	QGGYYADSYGIA
55	346C6-xi	HC CDR1	233	GFSLSSYA
56	346C6-xi	HC CDR2	234	ISTGGIT
57	346C6-xi	HC CDR3	235	ARGGYAASSAYLPYYFDL
58	346C6-xi	LC CDR1	236	QSVYNNNN
59	346C6-xi	LC CDR2	237	LAS
60	346C6-xi	LC CDR3	238	LGGCDDADTFA
61	346C6-zu	HC CDR1	239	GFSLSSYA
62	346C6-zu	HC CDR2	240	ISTGGIT
63	346C6-zu	HC CDR3	241	ARGGYAASSAYLPYYFDL
64	346C6-zu	LC CDR1	242	QSVYNNNN
65	346C6-zu	LC CDR2	243	LAS
66	346C6-zu	LC CDR3	244	LGGCDDADTFA

Таблица 7. Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие CDR мАт IMGT

	мАт	цепь IgG	SEQ ID NO	Последовательность нуклеиновой кислоты
1	MORAb-003	HC CDR1	245	GGCTTCACCTTCAGCGGCTATGGG
2	MORAb-003	HC CDR2	246	ATTAGTAGTGGTGGTAGTTATACC
3	MORAb-003	HC CDR3	247	GCAAGACATGGGGACGATCCCGCTGGTTCGCTTAT
4	MORAb-003	LC CDR1	248	TCAAGTATAAGTTCCAACAAC
5	MORAb-003	LC CDR2	249	GGCACATCC
6	MORAb-003	LC CDR3	250	CAACAGTGGAGTAGTTACCCGTACATGTACACG
7	MORAb-009	HC CDR1	251	GGTTACTCATTCACTGGCTACACC
8	MORAb-009	HC CDR2	252	ATTACTCCTTACAATGGTGCTTCT
9	MORAb-009	HC CDR3	253	GCAAGGGGGGGTTACGACGGGAGGGGTTTGTACTAC
10	MORAb-009	LC CDR1	254	TCAAGTGTAAGTTAC
11	MORAb-009	LC CDR2	255	GACACATCC
12	MORAb-009	LC CDR3	256	CAGCAGTGGAGTAAGCACCTCTCACG
13	33011-xi	HC CDR1	257	GGAATCTCCCTCAGTAGCGATGCA
14	33011-xi	HC CDR2	258	ATTAATGGTGGTGGTAACACA
15	33011-xi	HC CDR3	259	GCCAGAGGCATTCAACATGGTGGTGAATAGTGATTATTAT TATTACGGCATGGACCTC
16	33011-xi	LC CDR1	260	CAGAGCATTAGTAGTGTC
17	33011-xi	LC CDR2	261	CTGGCATCT
18	33011-xi	LC CDR3	262	CAAACCAATTATGGTACTAGTAGTAGTAATTATGGTTTTGCT
19	33011-zu	HC CDR1	263	GGAATTTCCCTCTCCTCCGACGCG
20	33011-zu	HC CDR2	264	ATCAACGGCGGCGGAAACACC
21	33011-zu	HC CDR3	265	GCGCGCGGCATCCAGCACGGTGGTGGAAACAGCGACTACTA CTACTATGGGATGGATCTG
22	33011-zu	LC CDR1	266	CAGTCAATTAGCAGCGTG
23	33011-zu	LC CDR2	267	TTGGCCTCC
24	33011-zu	LC CDR3	268	CAAACCAACTACGGAACCTCCAGCTCCAACCTACGGCTTTGCC
25	111B10-xi	HC CDR1	269	GGATTCTCCCTCAATAACTATGCA
26	111B10-xi	HC CDR2	270	ATTAGTACTGGTGGTCTCGCA
27	111B10-xi	HC CDR3	271	GGCAGAAATGGTGGTGGTAGTTATTTTCTATTATTTTGAC TTG
28	111B10-xi	LC CDR1	272	CAGAGCATTAGTAGTTAC
29	111B10-xi	LC CDR2	273	TCTGCATCC
30	111B10-xi	LC CDR3	274	CAAAGCTATTATGATAATTGGTACTAGTACT
31	111B10-zu	HC CDR1	275	GGCTTCTCCCTGAACAACTACGCC
32	111B10-zu	HC CDR2	276	ATCAGCACAGGCGGCGCTGGCC
33	111B10-zu	HC CDR3	277	GCCAGAAACGGCGGAGGCTCCTACATCTTCTACTACTTCGAC CTG
34	111B10-zu	LC CDR1	278	CAGTCCATCTCCTCTAC

	35	111B10-zu	LC CDR2	279	TCTGCCTCC
	36	111B10-zu	LC CDR3	300	CAGTCCTACTACGACATCGGCACCTCCACC
	37	201C15-xi	HC CDR1	301	GGAATCGACCTCAGTAGCTATGCA
	38	201C15-xi	HC CDR2	302	ATTAATATTGGTGGTCGCGTA
5	39	201C15-xi	HC CDR3	303	GCCAGATATTATAATGGTGGTAGTTATGACATC
	40	201C15-xi	LC CDR1	304	GAGAGCATTTATCGCGTA
	41	201C15-xi	LC CDR2	305	GATACATCC
	42	201C15-xi	LC CDR3	306	CAAGGCGGTTATTATGCTGATAGTTATGGTATTGCT
	43	201C15-zu	HC CDR1	307	GGAATCGACCTGTCCTCCTACGCT
	44	201C15-zu	HC CDR2	308	ATCAACATCGGCGGCAGAGTG
10	45	201C15-zu	HC CDR3	309	GCCCCGCTACTACAACGGCGGCTCCTACGATATC
	46	201C15-zu	LC CDR1	310	GAGTCCATCTACCGGGTG
	47	201C15-zu	LC CDR2	311	GACACCAGC
	48	201C15-zu	LC CDR3	312	CAGGGCGGCTACTACGCCGACTCTACGGAATCGCT
	49	346C6-xi	HC CDR1	313	GGATTCTCCCTCAGTAGTTATGCA
	50	346C6-xi	HC CDR2	314	ATTAGTACTGGTGGTATCACA
15	51	346C6-xi	HC CDR3	315	GCCAGAGGGGGATATGCTGCTAGTAGTGCTTATTATCTCCCG TACTACTTTGACTTG
	52	346C6-xi	LC CDR1	316	CAGAGTGTATAATAATAACAAC
	53	346C6-xi	LC CDR2	317	CTGGCATCC
	54	346C6-xi	LC CDR3	318	CTAGGTGGTTGTGATGATGATGCTGATACTTTTGCT
	55	346C6-zu	HC CDR1	319	GGCTTCTCCCTGTCTCTACGCT
20	56	346C6-zu	HC CDR2	320	ATCTCTACCGGCGGAATTACC
	57	346C6-zu	HC CDR3	321	GCTAGAGGCGGCTACGCCGCCAGCTCCGCTTACTACCTGCC TACTACTTCGACCTG
	58	346C6-zu	LC CDR1	322	CAGTCCGTGTATAACAACAACAAC
	59	346C6-zu	LC CDR2	323	CTGGCCTCC
	60	346C6-zu	LC CDR3	324	CTGGGCGGCTGCGACGACGACGCCGATACCTTTGCT

Таблица 8. Аминокислотные последовательности полноразмерных цепей мАт Ig

	мАт	цепь IgG	SEQ ID NO	Аминокислотная последовательность
1	MORAb-003	Тяжелая цепь	1	EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCSASGFTTFSGYGLSWVRQAPGKGLEWVAMISSGGSYTYADSVKGRFAISRDNAKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCARHGDDPAWFAYWGQGPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
2	MORAb-003	Легкая цепь	6	DIQLTQSPSSLSASVGDRTTITCSVSSISSNNLHWYQQKPGKAPKRWIYGTSNLASGVPSRFSGSGSGTDYFTTISLQPEDIATYYCQQWSSYPMYTFGGQGTKEVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
3	MORAb-009	Тяжелая цепь	325	QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSTFGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLITPYNGASSYNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYDGRGFDYWGSGTPVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
4	MORAb-009	Легкая цепь	326	DIELTQSPAIMSASPGKEVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGNSYSLTISSVEAEDDATYYCQQWSKHPLTFGSGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
5	трастузумаб	Тяжелая цепь	327	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS

					VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
5	6	трастузумаб	Легкая цепь	328	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFELYSGVPSRFGSGRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
10	7	33011-xi	Тяжелая цепь	329	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGISLSSDAISWVRQAPGKGLEIYINGGGNTYYASWAKGRFTISKSTTTVDLKITSPTTEDTATYFCARGIQHGGGNSDYYYYGMDL WPGGTIVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15	8	33011-xi	Легкая цепь	330	EVLMTQTPSSVSAVGDVTITKQASQSISSVLSWYQQKPGQPPLLIIYLASTLASGVPSRFGSGRSGTEFTLTISDLECDAAATYYCQNTYGTSSSNYGFAFGGKTEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
20	9	33011-zu	Тяжелая цепь	331	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGISLSSDAISWVRQAPGKGLEIYGIINGGGNTYYASWAKGRFTISRHNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGIQHGGGNSDYYYYGMDLWGQGTIVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
25	10	33011-zu	Легкая цепь	332	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQSISSVLSWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQCEDATYYCQNTYGTSSSNYGFAFGGKTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
30	11	111B10-xi	Тяжелая цепь	333	QSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLNNYAMSWVRQAPGKGLEWIGSISTGGLAFYANWAKGRFTISRTSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCGRNGGGSYIFYYFDLWGQGTIVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
35	12	111B10-xi	Легкая цепь	334	AFELTQTPSSVEAAVGGTITIKQASQSISSVLSWYQQKPGQPPLLIIY SASTLASGVPSRFGSGSGTEYTLTISDLECADAAATYFCQSYIDIGTSTFGGGTEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
40	13	111B10-zu	Тяжелая цепь	335	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLNNYAMSWVRQAPGKGLEWIGSISTGGLAFYANWAKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNGGGSYIFYYFDLWGQGTIVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
45	14	111B10-zu	Легкая цепь	336	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQSISSVLSWYQQKPGKAPKLLIY SASTLASGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQCEDAAATYYCQSYIDIGTSTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	15	201C15-xi	Тяжелая цепь	337	QSVKESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGIDLSSYAMGWFRQAPGKGLEIYGTINIGGRVYYASWAKGRFTISRTSTTVDLKAPSLAEDTATYFCARYYNGGSYDIWGPGLTVTVSLASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

5	16	201C15-xi	Легкая цепь	338	DVVMTQTPASASEPVGGTVTIKQASESIYRVLAWYQQKPGQPPLLI YDTSTLASGAPSRFKSGSGYGTFTLTISGVQCEDAATYYCQGGYYAD SYGIAFGGGTEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	17	201C15-zu	Тяжелая цепь	339	QVQVLESGGGLVQPGGSLRLSCSASGIDLSYAMGWVRQAPGKLEY IGTINIGGRVYYASWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARYYNGGSDIWGQGTILTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSS SLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCSCVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
	18	201C15-zu	Легкая цепь	340	DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCQASESIYRVLAWYQQKPGKAPKLLI YDTSTLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQCDDAATYYCQGGYYADS YGIAGGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPR EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
	19	346C6-xi	Тяжелая цепь	341	QSVESGGRLVKPDESILTCTASGFSLSYAMIWVRQAPGEGLEWIG TISTGGITYYASWAKGRFTISKSTTVDLKITSPTEDTATYFCARGGY AASSAYLPYYFDLWGQGTILTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFLYSLKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	20	346C6-xi	Легкая цепь	342	AAVLQTTPSPVSAVGGTVTISCQSSQSVYNNNNLAWFQQKPGQPPL LLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYCLGGCDD DADTFAGGGGTEVVVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFY YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
25	21	346C6-zu	Тяжелая цепь	343	EVQVLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYAMIWVRQAPGKLEW IGTISTGGITYYASWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARGGYAASSAYLPYYFDLWGQGTILTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFLYSLKLTVDKSRWQQ GNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	22	346C6-zu	Легкая цепь	344	DIQMTQSPSSLASVGDRTITCQSSQSVYNNNNLAWYQQKPGKVPK LLIYLASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQCEDAATYYCLGGCDD DADTFAGGGGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSDSTYLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Таблица 9. Последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие полноразмерные цепи мАт Ig⁺

35		мАт	цепь IgG	SEQ ID NO	Последовательность нуклеиновой кислоты
40	1	MORAb-003	Тяжелая цепь	345	GAGGTCCAACCTGGTGAGAGCGGTGGAGGTGTTGTGCAACCTGGC CGGTCCCTGCGCCTGTCTGCTCCGATCTGGCTTCACTTCAGCGG CTATGGGTGTCTTGGGTGAGACAGGCACCTGGAAAAGGTCTTGAG TGGGTGCAATGATTAGTAGTGGTGGTAGTTATACCTACTATGCAG ACAGTGTGAAGGGTAGATTTGCAATATCGCGAGACAACGCCAAGA ACACATTGTTCTGCAAAATGGACAGCCTGAGACCCGAAGACACCG GGGTCTATTTTGTGCAAGACATGGGGACGATCCCGCTGGTTGCG TTATTGGGGCCAAGGGACCCCGGTACCGTCTCCTCAGCCTCCACC AAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCAAGAGCACCT CTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC CGAACCGGTGACGGTGTCTGTTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGG CGTGACACCTTCCCCTGCTGCTACAGTCTCAGGACTCTACTCC CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGA CCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGG ACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACATGCC CACCCTGCCCAGCACCTGAACTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCT CTCCCCCCTCAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCT GAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCTGAG GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAAGCC AAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTG GTCAGCGTCTCACCCTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGGCAAGG AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCCATCG

5					AGAAAACCATCTCCAAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGG TGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGG TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAACAAGA CCACGCCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTATTCA AAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTC TCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGA AGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAATGA
10	2	MORAb-003	Легкая цепь	346	GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTG GGTGACAGAGTGACCATCACCTGTAGTGTACAGTCAAGTATAAGTT CCAACAACCTTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGTAAGGCTCCAA AGCCATGGATCTACGGCACATCCAACCTGGCTTCTGGTGTGCCAAG CAGATTACGCGGTAGCGGTAGCGGTACCGACTACACCTTGACCATC AGCAGCCTCCAGCCAGAGGACATCGCCACCTACTACTGCCAACAG TGGAGTAGTTACCCGTACATGTACACGTTTCGGCCAAGGGACCAAG GTGGAAATCAAACGAACCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTTCC CGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTG CCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAA GGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTAC AGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTC GACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTG CGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTT CAACAGGGGAGAGTGTAA
15					CAGGTACAACCTGCAGCAGTCTGGGCCTGAGCTGGAGAAGCCTGGC GCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTATTCACTG GCTACACCATGAACCTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCTTG AGTGGATTGGACTTATTACTCCTTACAATGGTGTCTTAGTACAAA CCAGAAGTTCAGGGGCAAGGCCACATTAAGTGTAGACAAGTCACT CAGCACAGCCTACATGGACCTCCTCAGTCTGACATCTGAAGACTCT GCAGTCTATTTCTGTGCAAGGGGGGGTTACGACGGGAGGGGTTTTG ACTACTGGGGATCCGGGACCCCGGTACCCGTCTCCTCAGCCTCCAC CAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCAC TCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC CCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCG GCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTC CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAAGCAACACCAAGGTG GACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGC CCACCGTGGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCC TCTTCCCCC AAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCC TGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCTCACCCTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG GTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAG GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGACAACACTACAAG ACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACA GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAATGA
20					
25	3	MORAb-009	Тяжелая цепь	347	CAGGTACAACCTGCAGCAGTCTGGGCCTGAGCTGGAGAAGCCTGGC GCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTATTCACTG GCTACACCATGAACCTGGGTGAAGCAGAGCCATGGAAGAGCCTTG AGTGGATTGGACTTATTACTCCTTACAATGGTGTCTTAGTACAAA CCAGAAGTTCAGGGGCAAGGCCACATTAAGTGTAGACAAGTCACT CAGCACAGCCTACATGGACCTCCTCAGTCTGACATCTGAAGACTCT GCAGTCTATTTCTGTGCAAGGGGGGGTTACGACGGGAGGGGTTTTG ACTACTGGGGATCCGGGACCCCGGTACCCGTCTCCTCAGCCTCCAC CAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCAC TCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCC CCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCG GCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTC CCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAG ACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAAGCAACACCAAGGTG GACAAGAAAGTTGAGCCCAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGC CCACCGTGGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCC TCTTCCCCC AAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCC TGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCTCACCCTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG GTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAG GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGACAACACTACAAG ACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACA GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAATGA
30					
35	4	MORAb-009	Легкая цепь	348	GACATCGAGCTCACTCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAG GGGAGAAGGTCAACATGACCTGCAAGTCCAGCTCAAGTGTAAAGTT ACATGCACTGGTACCAGCAGAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGAT GGATTTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCAGGTGCTT CAGTGGCAGTGGGTCTGGAACCTTACTCTCTCACAATCAGCAGC GTGGAGGTGAAGATGATGCAACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGT AAGCACCTCTCAGCTTCGGATCCGGGACCAAGGTGGAAATCAAA CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTTCCCCGCCATCTGATGA GCAGTTGAAATCTGGAACCTGCTTGTGTGTGCTGCTGAATAAC TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCC CTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAA GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCAT CAGGGCCTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG TGTTAA
40					
45	5	33011-xi	Тяжелая цепь	349	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTGCGCTGGTACGCCTGGGACA CCCCTGACACTCACCTGCACCGTCTCTGGAATCTCCCTCAGTAGCG ATGCAATAAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTCGAAT ACATCGGAATCATTAATGGTGGTGGTAACACATACTACGCGAGCTG GGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAAAACCTCGACCACGGTGA TCTGAAAATCACCAGTCCGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTTC TGTGCCAGAGGCATTCAACATGGTGGTGGTAATAGTGATTATTATT ATTACGGCATGGACCTCTGGGGGCCAGGCACCTGGTCACTGTCTC TTCAGCATCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCC TCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTC AAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTC CAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAG

				CTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAG CAACACCAAGGTGGACAAGA AAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAA AACTCACACATGCCCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGG ACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATG ATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGG AGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGACTG GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCT CCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCC CCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGATGAGCT GACCAAGAACCAGGTACAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCC TCTTCTTATATTCAAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAAC CACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAAATGA
6	33011-xi	Легкая цепь	350	GAAGTGTTGATGACCCAGACTCCATCCTCCGTGTCTGCAGCTGTGG GAGACACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCAATTAGTA GTGTCTTGTCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCT CCTGATCTATCTGGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGG TTCAGCGGCAGTAGATCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCG ACCTGGAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCAAACCAATTA TGGTACTAGTAGTAGTAATTATGTTTTGCTTTCGGCGGAGGGACC GAGGTGGTTCGTCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCT TCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGT GTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGG AAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAC TCCCAGGAGAGTGTG ACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC CTGACGCTGAGCAAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCC TGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGTTGA
7	33011-zu	Тяжелая цепь	351	GAAGTCCAAGTGGTGAAAGCGGGGGAGGACTGGTGCAGCCGGGC GGATCCCTCCGGCTGTCTGTGCTGCATCGGGAATTTCCCTCTCCTC CGACGCGATTAGCTGGGTACAGACAGGCCCCCGGAAAGGGGCTGGA GTACATCGGTATCATCAACGGCGGCGGAAACACCTACTACGCCTCC TGGGCCAAGGGCCGCTTACCATCTCGCGGCATAATTTCAAAGAACA CTCTGTACTTGCAAATGAACTCCCTGAGGGCCGAGGACACCGCGT GTACTACTGCGCGCGCGGCATCCAGCACGGTGGTGAAACAGCGA CTACTACTACTATGGGATGGATCTGTGGGGCCAGGGAAC TCTGTG ACCGTGTCTGTCAGCATCCACCAAGGGGCCCATCGTCTTCCCTTG CACCTCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTG CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAC TCAGGCGCCCTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTAC AGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTC CAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACA GCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT TGACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCTGT GGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCC TCATGATCTCCCGGACCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGT GAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGAT GAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC TTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCGAG CCGGAGACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC GGCTCCTTCTTCTTATATTCAAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCT GCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAA ATGA
8	33011-zu	Легкая цепь	352	GACATTGAGATGACCCAGTCCCCAAGCTCGCTGTCCGCCTCCGTGG GCGACCGCGTGACCATCACGTGCCAGGCGTCCAGTCAATTAGCA GCGTGCTCTCCTGGTACCAACAGAAGCCGGGGAAGCACCCAAGC TGCTGATCTACTTGGCCTCCACTCTGGCCTCGGGAGTGCCTTCACG GTTCTCCGGATCGGGATCTGGTACTGATTACCCCTCACCATCTCG AGCCTTCAGTGCAGGACATCGCTACTTACTATTGTCAAACCAACT ACGGAACTCCAGCTCCAACCTACGGCTTTGCTTCCGTGGCGGGAC CAAGGTGCAAAATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATC TTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTG TGTGCTGTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTG GAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAC TCCCAGGAGAGTGT CACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC CCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGC CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAG CTTCAACAGGGGAGAGTGTTGA
9	111B10-xi	Тяжелая цепь	353	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGTGCGCTGGTCACGCCTGGGACA CCCCTGACACTACCTGCACAGTCTCTGGATTCTCCCTCAATAACT ATGCAATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAAT

				GGATCGGATCCATTAGTACTGGTGGTCTCGCATTCTACGCGAACTG GGCAAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAACCTCGACCACGGTGGA TCTGAAAATGACCAGTCTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTTC TGTGGCAGAAATGGTGGTGGTAGTTATATTTTCTATTATTTTGACTT GTGGGGCCAAGGCACCCTCGTCACTGTCTCTTCAGCATCCACCAAG GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTG GGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCG AACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACGACGGCGG TGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTC AGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACC TACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGAC AAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCA CCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCT TCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGT CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAA GACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGT CAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGA GTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAAGCCCCATCGA GAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGT GTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGAC CACGCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTATATTCAA AGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCT CATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAA GAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAATGA
10	111B10-xi	Легкая цепь	354	GCATTGCAATTGACCCAGACTCCATCCTCCGTGGAGGCAGCTGTGG GAGGCACAATCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTCAGAGCATTAGTA GTTACTTATCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCT CCTGATCTATTCTGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGGT TCAAAGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTACACTCTCACCATCAGCG ACCTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTTCTGTCAAAGCTATTA TGATATTGGTACTAGTACTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTCTGC AAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTG ATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAA TAACCTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAA CGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGA CAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAG CAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCAC CCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGG AGAGTGTGA
11	111B10-zu	Тяжелая цепь	355	GAAGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGC GGATCTCTGAGACTGTCTTGTGCCGCCTCCGGCTTCTCCCTGAACA ACTACGCCATGTCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGCCCTGG AATGGATCGGCTCCATCAGCACAGGCGGCCTGGCCTTCTACGCCAA TTGGGCCAAGGGCCGGTTACCATCAGCCGGGACAACCTCCAAGAA CACCTGTACCTCCAGATGAACCTCTGCGGGCCGAGGACACCGCC GTGTACTACTGTGCCAGAAACGGCGGAGGCTCCTACATCTTCTACT ACTTCGACCTGTGGGGCCAGGGCACCTCTGTGACAGTGTCTATCTGC ATCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAG AGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGAC TACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACTCAGGCGCCCTGA CCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACT CTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC AAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCAC ACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAAACTCCTGGGGGGACCGTCA GTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCC GGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAG ACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGC ATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGT ACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGTGAA TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGC CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGTGAACCAA GAACCAGGTACGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGC GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAA TACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCT TATATTCAAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAAATGA
12	111B10-zu	Легкая цепь	356	GATATTCAGATGACCCAGTCCCCCTCAGCCTGTCCGCTTCTGTGG GCGACAGAGTGACCATCACCTGTACGGCCTCCAGTCCATCTCCTC CTACCTGTCTGGTATCAGCAGAAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTG CTGATCTACTCTGCCTCCACTGGCCTCCGGCGTGGCCTCTAGATT CTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGCACTTACCCTGACCATCAGTCTC CTCCAGTGCAGAGGATGCCGCCACCTACTACTGCCAGTCTCTACTACG ACATCGGCACCTCCACCTTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAATCA AACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGA TGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAAT AACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAAC

				GCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGA
13	201C15-xi	Тяжелая цепь	357	CAGTCAGTGAAGGAGTCCGGGGGTGCGCTGGTCACGCCTGGGACACCCCTGACACTCACCTGCACAGTCTCTGGAATCGACCTCAGTAGCTATGCAATGGGCTGGTTCGCCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATACATCGGAACCATTAATATTGGTGGTCGCGTATATTACGCGAGCTGGCAAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAACCTCGACCACGGTGGA TCTGAAAGCGCCAGTCTGACAGCCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCCAGATATTATAATGGTGGTAGTTATGACATCTGGGGCCAGGCACCCTGGTCACCGTCTCTTTAGCATCCACCAAGGGGCCATCGGCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCGACAGCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAGTTGAGCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCACGACC TGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAAACCC AAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAGTGAAGCCAGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAAGTGTACGTGGACGGCTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCGTCTCTACCGTCTGACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTATATTCAAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTTGCAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAATGA
14	201C15-xi	Легкая цепь	358	GATGTTGTGATGACCAGACTCCAGCCTCCGCGTCTGAACCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAGGCCAGTGAGAGCATTTATCGCGTATTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCTATGATACATCCACTCTGGCATCTGGGGCCCCATCGCGTTCAAAGGCAGTGGATATGGGACAGAGTTCACTCTCACCATCAGCGCGTGCAGTGTGAAGATGCTGCCACTTACTACTGTCAAGGCGGTATTATGCTGATAGTTATGGTATTGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCCTGATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAACACAAAGTCTACGCTGCGAGAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTGA
15	201C15-zu	Тяжелая цепь	359	CAGGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGAGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCTGAGACTGTCTGTTCCGCCCTCCGGAATCGACCTGTCTCTACGCTATGGGCTGGGTGCGACAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAGTACATCGGCACCATCAACATCGGCGGCAGAGTGTACTACGCTCCTGGGCCAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAACCTCAAGAACACCTGTACCTCCAGATGAACCTCCTGCGGGCCGAGGACCCGCCGTGTACTIONGCGCCGGTACTACAACGGCGGCTCCTACGATATCTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTCTGCAATCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGGCTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCTCAGACC TACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCCAACCGTCCCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCAACAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACACGCTCCCGTGGTGGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCC

5	16	201C15-zu	Легкая цепь	360	GATATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCACCCTGTCTGCCTCTGTGG GCGACAGAGTGACCATCACCTGTGAGGCCTCCGAGTCCATCTACCG GGTGTCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCCCCAAGCT GCTGATCTACGACACCAGCACACTGGCCTCCGGCGTGCCCTCTAGA TTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGTTTACCTTGACCTCTCCAG CCTCCAGTGGCAGCAGCGCCGCCACCTACTATTGTGAGGGCGGCTAC TACGCCGACTCCTACGGAATCGCTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTG GAAATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGC CATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCT GCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGT GGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGA GCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGAC GCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGA AGTCACCCATCAGGGCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAA CAGGGGAGAGTGTGA
10	17	346C6-xi	Тяжелая цепь	361	CAGTCGGTGGAGGAGTCCGGCGGTGCGCTGGTAAAGCCTGACGAA TCCCTGACACTCACCTGCACAGCCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGTTA TGCAATGATCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGGAGGGGCTGGAATG GATCGGAACCATTAGTACTGGTGGTATCACATACTACGCGAGCTGG GCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAAAACCTCGACACCGTGGAT CTGAAAATCACCAGTCCGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTTCT GTGCCAGAGGGGGATATGCTGCTAGTAGTGCTTATATCTCCCGTA CTACTTTGACTTGTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACCGTCTCCTCA GCATCCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCA AGAGCACCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCT GACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGA CTTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCAACA CCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAATC ACACATGCCACCCTGCCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGT CAGTCTTCTCTTCCCCCCTAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTC CCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGA AGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCA CGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAAGGAGTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCC AGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCG AGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCCATCCCGGATGAGCTGAC CAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAAC AACTACAAGACCACGCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCTTATATTCAAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTGTGCAACCA CTACACGAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAATGA
30	18	346C6-xi	Легкая цепь	362	GCAGCCGTGCTGACCCAGACACCATCACCCGTGTCTGCAGCTGTGG GAGGCAGAGTCACCATCAGTTGCCAGTCCAGTCAGAGTGTTATAA TAATAACAACCTAGCCTGGTTTCAGCAGAAACCCGGGCGACCTCC AAGCTTCTGATCTATCTGGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCAT CACGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCTCACCAT CAGCGGCGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTATTACTGTCTAGGT GGTTGTGATGATGATGCTGATACTTTTGCTTTCGGCGGAGGGACTG AGGTGGTGGTCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT CCCGCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTG TGCTGTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGGA AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTCA CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCT GCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCT TCAACAGGGGAGAGTGTGA
40	19	346C6-zu	Тяжелая цепь	363	GAAGTGAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGC GGATCTCTGAGACTGTCTTGTCGCGCCTCCGGCTTCTCCCTGTCTC CTACGCTATGATCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAGGGCCTGGA ATGGATCGGCACCATCTCTACCGGCGGAATTACCTACTACGCCTCC TGGGCCAAGGGCCGTTACCATCTCCAGAGACAACCTCAAGAAC ACCCTGTACCTCCAGATGAACCTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCG TGTAATTTGTGCTAGAGGCGGCTACGCCGCCAGCTCCGCTTACTA CCTGCCCTACTACTTCGACCTGTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGACA GTGTCATCTGCATCCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCAC CCTCCTCAAGAGCACCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCT GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCA GGCGCCTGACCAAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGT CCTCAGGACTTACTCCTCAGCAGCGTGTGTGACCGTGCCTCCAG CAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGA CAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACCTCTGGGG GGACCGTCACTTCTCTTCCCCCCTAAACCAAGGACACCCCTA TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAG CCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACA ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAAGGA CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGC

5					CCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGA GCTGACCAAGAACCAGGTGACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT CTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCC GGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGG CTCCTTCTTCTTATATTCAAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAAAT GA
10	20	346C6-zu	Легкая цепь	364	GATATTCAAGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCCGCTTCTGTGG GCGACAGAGTGACCATCACCTGTCACTCCTCCAGTCCGTGTATAA CAACAACAACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCCGGCAAGGTGCC CAAGCTGCTGATCTACCTGGCCTCCACACTGGCCTCTGGCGTGGCC TCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGACCAT CAGTCCCTCCAGTGCGAGGATGCCGCCACCTACTATTGCCTGGGC GGCTGCGAGACGACGCCGATACCTTTGTCTTTGGCGGAGGCCACCA AGGTGGAAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTT CCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTG TGCTCTGTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGA AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTCA CAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCC TGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCT GCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCT TCAACAGGGGAGAGTGTGTA
15					

⁺ Представленные последовательности нуклеиновых кислот не включают лидерные последовательности.

[00121] В различных вариантах реализации изобретения, описанный в данном документе ADC может содержать любой набор переменных доменов тяжелой и легкой цепей, перечисленных в приведенных выше таблицах (например, переменные домены тяжелой и легкой цепи MORAb-003 или переменные домены тяжелой и легкой цепи трастузумаба) или набор из шести последовательностей CDR из набора тяжелых и легких цепей. В некоторых вариантах реализации изобретения ADC дополнительно содержит константные домены тяжелой и легкой цепи человека или их фрагменты. Например, ADC может содержать константный домен тяжелой цепи IgG человека (такой как IgG1) и константный домен легкой цепи каппа или лямбда человека. В различных вариантах реализации изобретения фрагмент антитела описанных ADC содержит константный домен тяжелой цепи подтипа 1 иммуноглобулина G (IgG1) человека с константным доменом легкой цепи Ig каппа человека.

[00122] В различных вариантах реализации изобретения целевой раковый антиген для ADC представляет собой рецептор фолиевой кислоты альфа ("FRA").

[00123] В различных вариантах реализации изобретения антитело к FRA или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи следующим образом: CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), состоящий из SEQ ID NO: 2, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), состоящий из SEQ ID NO: 3, CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), состоящий из SEQ ID NO: 4; CDR1 легкой цепи (LCDR1), состоящий из SEQ ID NO: 7, CDR2 легкой цепи (LCDR2), состоящий из SEQ ID NO: 8 и CDR3 легкой цепи (LCDR3), состоящий из SEQ ID NO: 9, как определено системой нумерации Кабат (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Бетесда, штат Мэриленд (1987 год и 1991 год))).

[00124] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к FRA или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи следующим образом: CDR1 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 13, CDR2 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 14, CDR3 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 15; CDR1 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 16, CDR2 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 17 и CDR3 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 18, как определено системой нумерации IMGT (International ImMunoGeneTics Information System (IMGT®)).

[00125] В различных вариантах реализации изобретения антитело к FRA или его

антигенсвязывающий фрагмент включает вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 23, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к FRA или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 23 и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 24 или последовательности, которые по меньшей мере на 95% идентичны вышеупомянутым последовательностям. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к FRA или его антигенсвязывающий фрагмент имеет аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 23 и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 24.

[00126] В различных вариантах реализации изобретения антитело к FRA содержит константный домен тяжелой цепи IgG1 человека с константным доменом легкой цепи Ig каппа человека.

[00127] В различных вариантах реализации изобретения антитело к FRA содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи из SEQ ID NO: 1 или последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 1, и аминокислотную последовательность легкой цепи SEQ ID NO: 6 или последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 6. В конкретных вариантах реализации изобретения антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи из SEQ ID NO: 1 и аминокислотную последовательность легкой цепи из SEQ ID NO: 6 или последовательности, которые по меньшей мере на 95% идентичны вышеупомянутым последовательностям. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к FRA имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 1 и/или аминокислотную последовательность легкой цепи, которая по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к FRA содержит тяжелую цепь, кодируемую нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 11 (с нуклеотидами, кодирующими лидерную последовательность) или SEQ ID NO: 345 (без нуклеотидов, кодирующих лидерную последовательность); и легкую цепь, кодируемую нуклеотидной последовательностью SEQ ID NO: 12 (с нуклеотидами, кодирующими лидерную последовательность) или SEQ ID NO: 346 (без нуклеотидов, кодирующих лидерную последовательность). В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная последовательность тяжелой цепи не имеет С-концевого лизина. В различных вариантах реализации изобретения антитело к FRA имеет аминокислотную последовательность антитела, продуцируемого клеточной линией, депонированной на условиях в соответствии с Будапештским договором с Американской коллекцией типовых культур (ATCC, 10801 University Blvd., Манассас, штат Виргиния 20110-2209) 24 апреля 2006 года под № доступа РТА -7552 или такие последовательности, лишенные С-концевого лизина тяжелой цепи. В различных вариантах реализации изобретения антитело к FRA представляет собой MORAb-003 (название USAN: фарлетузумаб) (Ebel и соавт. (2007

год) Cancer Immunity 7:6) или его антигенсвязывающий фрагмент.

[00128] В различных других вариантах реализации изобретения целевой раковый антиген для ADC представляет собой рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2 типа ("her2").

5 [00129] В различных вариантах реализации изобретения антитело к her2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи следующим образом: CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), состоящий из SEQ ID NO: 71, CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), состоящий из SEQ ID NO: 72, CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), состоящий из SEQ ID NO: 73; CDR1 легкой цепи (LCDR1), состоящий из SEQ ID NO: 74,
10 CDR2 легкой цепи (LCDR2), состоящий из SEQ ID NO: 75 и CDR3 легкой цепи (LCDR3), состоящий из SEQ ID NO: 76, как определено системой нумерации Кабат.

[00130] В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к her2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи следующим образом: CDR1 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 191, CDR2
15 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 192, CDR3 тяжелой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 193; CDR1 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 194, CDR2 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 195 и CDR3 легкой цепи, состоящий из SEQ ID NO: 196, как определено системой нумерации IMGT.

[00131] В различных вариантах реализации изобретения антитело к her2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи,
20 содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 27, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к her2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность
25 вариабельной области тяжелой цепи из SEQ ID NO: 27 и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи из SEQ ID NO: 28 или последовательности, которые по меньшей мере на 95% идентичны вышеупомянутым последовательностям. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к her2 или его антигенсвязывающий фрагмент имеет аминокислотную последовательность
30 вариабельной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 27 и/или аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, которая по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична SEQ ID NO: 28.

35 [00132] В различных вариантах реализации изобретения антитело к her2 содержит константный домен тяжелой цепи IgG1 человека и константный домен легкой цепи IgG1 человека.

[00133] В различных вариантах реализации изобретения антитело к her2 содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи из SEQ ID NO: 327 или
40 последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 327, и аминокислотную последовательность легкой цепи из SEQ ID NO: 328 или последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 328. В конкретных вариантах реализации изобретения антитело содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи из SEQ ID NO:
45 327 и аминокислотную последовательность легкой цепи из SEQ ID NO: 328 или последовательности, которые по меньшей мере на 95% идентичны вышеупомянутым последовательностям. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к her2 имеет аминокислотную последовательность тяжелой цепи, которая по меньшей мере

на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 327 и аминокислотную последовательность легкой цепи, которая по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 328. В различных вариантах реализации изобретения антитело к her2 представляет собой трастузумаб или его антигенсвязывающий фрагмент.

[00134] В различных вариантах реализации изобретения антитело к FRA или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи MORAb-003 или при этом CDR включают не более одного, двух, трех, четырех, пяти или шести аминокислотных добавлений, делеций или замещений в HCDR1 (SEQ ID NO: 2 в соответствии с Кабатом или SEQ ID NO: 13 в соответствии с IMGT), HCDR2 (SEQ ID NO: 3 в соответствии с Кабатом или SEQ ID NO: 14 в соответствии с IMGT), HCDR3 (SEQ ID NO: 4 в соответствии с Кабатом, или SEQ ID NO: 15 в соответствии с IMGT); LCDR1 (SEQ ID NO: 7 в соответствии с Кабатом или SEQ ID NO: 16 в соответствии с IMGT), LCDR2 (SEQ ID NO: 8 в соответствии с Кабатом или SEQ ID NO: 17 в соответствии с IMGT) и LCDR3 (SEQ ID NO: 9 в соответствии с Кабатом, или SEQ ID NO: 18 в соответствии с IMGT).

[00135] В различных других вариантах реализации изобретения антитело к her2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи трастузумаба или при этом CDR включают не более одного, двух, трех, четырех, пяти или шести аминокислотных добавлений, делеций или замещений в HCDR1 (SEQ ID NO: 71 в соответствии с Кабатом или SEQ ID NO: 191 в соответствии с IMGT), HCDR2 (SEQ ID NO: 72 в соответствии с Кабатом или SEQ ID NO: 192 в соответствии с IMGT), HCDR3 (SEQ ID NO: 73 в соответствии с Кабатом, или SEQ ID NO: 193 в соответствии с IMGT); LCDR1 (SEQ ID NO: 74 в соответствии с Кабатом или SEQ ID NO: 194 в соответствии с IMGT), LCDR2 (SEQ ID NO: 75 в соответствии с Кабатом или SEQ ID NO: 195 в соответствии с IMGT) и LCDR3 (SEQ ID NO: 76 в соответствии с Кабатом, или SEQ ID NO: 196 в соответствии с IMGT).

[00136] В различных вариантах реализации изобретения аминокислотные замены представляют собой замены одного остатка. Вставки обычно будут иметь порядок от около 1 до около 20 аминокислотных остатков, хотя значительно более крупные вставки могут быть допустимы, пока сохраняется биологическая функция (например, связывание с FRA или her2). Делеции обычно варьируются от около 1 до около 20 аминокислотных остатков, хотя в некоторых случаях делеции могут иметь значительно больший размер. Замены, делеции, вставки или любая их комбинация могут применяться для получения окончательного производного или варианта. Как правило, эти изменения производятся на нескольких аминокислотах, чтобы свести к минимуму изменение молекулы, особенно иммуногенность и специфичность антигенсвязывающего белка. Тем не менее, большие изменения могут допускаться при определенных обстоятельствах. Консервативные замены обычно выполняются в соответствии со следующей таблицей, изображенной как Таблица 10.

Таблица 10

	Исходный остаток	Типовые замены
	Ala	Ser
5	Arg	Lys
	Asn	Gln, His
	Asp	Glu
10	Cys	Ser
	Gln	Asn
	Glu	Asp
	Gly	Pro
15	His	Asn, Gln
	Ile	Leu, Val
	Leu	Ile, Val
20	Lys	Arg, Gln, Glu
	Met	Leu, Ile
	Phe	Met, Leu, Tyr
	Ser	Thr
25	Thr	Ser
	Trp	Tyr
	Tyr	Trp, Phe
30	Val	Ile, Leu

[00137] Существенные изменения функции или иммунологической идентичности производятся путем отбора замен, которые являются менее консервативными, чем те, которые показаны в Таблице 10. Например, могут быть сделаны замены, которые более существенно влияют на: структуру полипептидного остова в области изменения, например, альфа-спиральную или бета-складчатую структуру; заряд или гидрофобность молекулы на целевом сайте; или объемную часть боковой цепи. Ожидается, что замены, которые в общем будут давать наибольшие изменения в свойствах полипептида, представляют собой такие, в которых (а) гидрофильный остаток, например, серил или треонил, замещен (или замещается) гидрофобным остатком, например, лейцилом, изолейцилом, фенилаланином, валином или аланином; (b) цистеин или пролин замещен (или замещается) любым другим остатком; (c) остаток, имеющий электроположительную боковую цепь, например лизил, аргинил или гистидил, замещен (или замещается) электроотрицательным остатком, например, глутамином или аспартилом; или (d) остаток, имеющий объемную боковую цепь, например фенилаланин, замещен (или замещается) одним остатком, не имеющим боковой цепи, например глицином.

[00138] В различных вариантах реализации изобретения, где варианты последовательностей антитела применяются в ADC, варианты обычно проявляют такую же качественную биологическую активность и будут вызывать тот же иммунный ответ, хотя варианты могут также быть выбраны для модификации характеристик

антигенсвязывающих белков по мере необходимости. В альтернативном варианте, вариант может быть сконструирован таким образом, что биологическая активность антигенсвязывающего белка изменяется. Например, сайты гликозилирования могут быть изменены или удалены, как обсуждалось в данном документе.

5 [00139] Различные антитела могут применяться с применяемым в данном документе ADC для нацеливания на раковые клетки. Как показано ниже, линкер-токсины в ADC, описанных в данном документе, являются неожиданно эффективными с различными антиген-нацеливающими антителами против опухоли. В данной области техники известны подходящие антигены, экспрессирующиеся на опухолевых клетках, но не на
10 здоровых клетках, или экспрессирующиеся на опухолевых клетках на более высоком уровне, чем на здоровых клетках, а также антитела, направленные против них. Эти антитела можно применять с линкерами и токсином (например, эрибулином), описанным в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент антитела нацелен на FRA. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент антитела,
15 нацеленного на FRA, представляет собой MORAb-003. В некоторых вариантах реализации изобретения, в то время как описанные линкеры и токсин (эрибулин) являются неожиданно эффективными с несколькими различными антителами, нацеленными на опухоль, фрагменты антител, нацеленные на FRA, такие как MORAb-003, обеспечивают особенно улучшенное соотношение лекарственное средство:антитело,
20 нацеливание на опухоль, неспецифический цитолиз, эффективность лечения, а также уменьшенное нецелевое уничтожение. Повышенная эффективность лечения может быть измерена *in vitro* или *in vivo*, и может включать снижение скорости роста опухоли и/или уменьшение объема опухоли.

[00140] В некоторых вариантах реализации изобретения применяют антитела к
25 другим целям антигена и обеспечивают, по меньшей мере, некоторые из благоприятных функциональных свойств ADC, содержащего фрагмент антитела, нацеленного на FRA, такой как MORAb-003 (например, улучшенное соотношение лекарственное средство: антитело, улучшенная эффективность лечения, снижение нецелевого уничтожения и тому подобное). В некоторых вариантах реализации изобретения некоторые или все
30 из этих благоприятных функциональных свойств наблюдаются, в случае если описанные линкеры и токсин (эрибулин) конъюгированы с фрагментом антитела, нацеленного на her2, таким как трастузумаб. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент антитела нацелен на her2. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент антитела, нацеленного на her2, представляет собой трастузумаб. В некоторых вариантах
35 реализации изобретения некоторые или все из этих благоприятных функциональных свойств наблюдаются, в случае если описанные линкеры и токсин (эрибулин) конъюгированы с фрагментом антитела, нацеленного на MSLN, таким как MORAb-009. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент антитела нацелен на MSLN. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент антитела, нацеленного на
40 MSLN, представляет собой MORAb-009.

Линкеры

[00141] В различных вариантах реализации изобретения линкер в ADC является
внеклеточно стабильным достаточным образом, чтобы быть терапевтически
эффективным. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер стабилен вне
45 клетки, так что ADC остается интактным, в случае если он присутствует во внеклеточных условиях (например, перед транспортировкой или доставкой в клетку). Термин "интактный", применяемый в контексте ADC, означает, что фрагмент антитела остается присоединенным к фрагменту лекарственного средства. В данном контексте термин

"стабильный" в контексте линкера или ADC, содержащего линкер, означает, что не более чем 20%, не более чем около 15%, не более чем около 10%, не более чем около 5%, не более чем около 3% или не более чем около 1% линкеров (или любой процент между ними) в образце ADC расщепляются (или в случае общего ADC, в противном случае не интактного), в случае если ADC находится во внеклеточных условиях.

[00142] Стабилен ли линкер внеклеточно, можно определить, например, путем включения ADC в плазму крови в течение заданного периода времени (например, 2, 4, 6, 8, 16 или 24 часов), а затем количественного определения количества свободного фрагмента лекарственного средства присутствующего в плазме крови. Стабильность может предоставить время для ADC с целью локализации целевых опухолевых клеток и предотвратить преждевременное высвобождение лекарственного средства, что может снизить терапевтический индекс ADC, из-за повреждения как нормальных, так и опухолевых тканей. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер стабилен вне целевой клетки и высвобождает часть лекарственного средства из ADC один раз внутри клетки, таким образом, что фрагмент лекарственного средства может связываться со своей целью (например, с микротрубочками). Таким образом, эффективный линкер будет: (i) поддерживать специфические связывающие свойства фрагмента антитела; (ii) позволять доставку, например, внутриклеточную доставку фрагмента лекарственного средства посредством стабильного присоединения к фрагменту антитела; (iii) оставаться стабильными и интактными до тех пор, пока ADC не будет транспортирован или доставлен к его целевому сайту; и (iv) позволять терапевтический эффект, например цитотоксический эффект, фрагмента лекарственного средства после расщепления.

[00143] Линкеры могут влиять на физико-химические свойства ADC. Поскольку многие цитотоксические агенты являются гидрофобными по своей природе, связывание их с антителом с дополнительным гидрофобным фрагментом может привести к агрегации. Агрегаты ADC нерастворимы и часто ограничивают достижимое содержание лекарственного средства на антителе, что может отрицательно влиять на эффективность ADC. Протеиновые агрегаты биологических препаратов, в общем, также были связаны с повышенной иммуногенностью. Как показано ниже, линкеры, описанные в данном документе, приводят к ADC с низким уровнем агрегации и желательным уровнем содержания лекарственного средства.

[00144] Линкер может быть "расщепляемым" или "нерасщепляемым" (Ducry and Stump, Bioconjugate Chem. (2010 год) 21:5-13). Расщепляемые линкеры предназначены для высвобождения лекарственного средства при воздействии определенных факторов окружающей среды, например, при интернализации в целевую клетку, тогда как нерасщепляемые линкеры обычно полагаются на деградацию самого фрагмента антитела.

[00145] В некоторых вариантах реализации изобретения линкером является нерасщепляемый линкер. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент лекарственного средства ADC высвобождается путем деградации фрагмента антитела. Нерасщепляемые линкеры, как правило, остаются ковалентно связанными с, по меньшей мере, одной аминокислотой антитела и лекарственным средством при интернализации и деградации в целевой клетке. Нерасщепляемые линкеры обычно включают в себя тиоэфирную связь, которую получают путем конъюгации тиольной группы на лекарственном средстве или антителе с малеимидной или галоацетамидной группой на антителе или лекарственном средстве, соответственно (Goldmacher и соавт., In Cancer Drug Discovery and Development: Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins (G. L. Phillips

ред., Springer, 2013 год)). Типовой нерасщепляемый линкер содержит тиоэфир, циклогексил, N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил) циклогексан-1 карбоксилат (SMCC), N-гидроксисукцинимид (NHS) или один или более фрагментов полиэтиленгликоля (ПЭГ), например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 ПЭГ. В некоторых вариантах реализации изобретения нерасщепляемый линкер содержит (ПЭГ)₂. В других вариантах реализации изобретения нерасщепляемый линкер содержит (ПЭГ)₄.

[00146] В некоторых вариантах реализации изобретения линкером является расщепляемый линкер. Расщепляемый линкер относится к любому линкеру, который содержит расщепляемый фрагмент. В данном контексте термин "расщепляемый фрагмент" относится к любой химической связи, которая может быть расщеплена. Подходящие расщепляемые химические связи хорошо известны в данной области техники и включают, но без ограничений, кислотолабильные связи, протеазо/пептидазолабильные связи, фотоллабильные связи, дисульфидные связи и эстеразолабильные связи. Линкеры, содержащие расщепляемый фрагмент, могут позволить высвобождение фрагмента лекарственного средства из ADC через расщепление на определенном участке в линкере. В различных вариантах реализации изобретения расщепление антитела от связанного токсина активирует или увеличивает активность токсина. В некоторых вариантах реализации изобретения ADC, содержащий расщепляемый линкер (например, линкер Val-Cit), демонстрирует повышенное целевое уничтожение клеток и/или уменьшенное нецелевое уничтожение клеток по сравнению с ADC, содержащим нерасщепляемый линкер, (например, нерасщепляемый линкер (ПЭГ)₂ или (ПЭГ)₄). В некоторых вариантах реализации изобретения ADC, содержащий расщепляемый линкер, демонстрирует улучшенную эффективность лечения по отношению к ADC, содержащим нерасщепляемый линкер, в случае если клетки и/или рак, получавшие лечение в виде ADC, не экспрессируют целевой антиген на высоких уровнях (например, FRA или her2). В некоторых вариантах реализации изобретения расщепление антитела от связанного токсина требуется для достижения улучшенной эффективности лечения ADC, как измерено *in vitro* и/или *in vivo*.

[00147] В некоторых вариантах реализации изобретения линкер расщепляется при внутриклеточных условиях, так что расщепление линкера в достаточной степени высвобождает фрагмент лекарственного средства от фрагмента антитела во внутриклеточной среде для активации лекарственного средства и/или делает лекарственное средство терапевтически эффективным. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент лекарственного средства не расщепляется от фрагмента антитела до тех пор, пока ADC не попадет в клетку, которая экспрессирует антиген, специфичный для фрагмента антитела ADC, а фрагмент лекарственного средства отщепляется от фрагмента антитела после входа в клетку. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит расщепляемый фрагмент, который расположен так, что часть линкера или фрагмента антитела не остается связанной с фрагментом лекарственного средства при расщеплении. Примеры расщепляемых линкеров включают кислотолабильные линкеры, линкеры, чувствительные к протеазе/пептидазе, фотоллабильные линкеры, диметил-, дисульфид- или сульфонамидсодержащие линкеры.

[00148] В некоторых вариантах реализации изобретения линкером является линкер, чувствительный к pH и чувствительный к гидролизу при определенных значениях pH. Как правило, линкер, чувствительный к pH расщепляется в кислых условиях. Эта стратегия расщепления обычно использует более низкие значения pH в эндосомальных

(pH ~ 5-6) и лизосомальных (pH ~ 4,8) внутриклеточных компартментах по сравнению с цитозолем (pH ~ 7,4) для запуска гидролиза кислотолабильной группы в линкере, таком как гидразон (Jain и соавт. (2015 год) *Pharm Res* 32:3526-40). В некоторых вариантах реализации изобретения линкер является кислотолабильным и/или гидролизуемым линкером. Например, может быть применен кислотолабильный линкер, который гидролизуется в лизосоме, и содержит кислотолабильную группу (например, гидразон, семикарбазон, тиосемикарбазон, цис-аконитовый амид, ортоэфир, ацеталь, кеталь или тому подобное). См., например, патенты США №5,122,368; 5,824,805; 5,622,929; Dubowchik and Walker (1999 год) *Pharm. Therapeutics* 83:67-123; Neville и соавт. (1989 год) *Biol. Chem.* 264:14653-61. Такие линкеры относительно стабильны при нейтральных условиях pH, например, в крови, но нестабильны при pH ниже 5,5 или 5,0, приблизительном значении pH лизосомы. В некоторых вариантах реализации изобретения гидролизуемый линкер представляет собой тиоэфирный линкер (такой как, например, тиоэфир, присоединенный к терапевтическому агенту через ацилгидразоновую связь). См., например, патент США №5,622,929.

[00149] В некоторых вариантах реализации изобретения линкер расщепляется в восстановительных условиях. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер расщепляется в присутствии восстанавливающего агента, такого как глутатион или дитиотреитол. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер представляет собой расщепляемый дисульфидный линкер или расщепляемый сульфонамидный линкер.

[00150] В некоторых вариантах реализации изобретения линкер представляет собой расщепляемый дисульфидный линкер. В данной области техники известны различные дисульфидные линкеры, включая, например, те, которые могут быть получены с применением SATA (N-сукцинимидил-5-ацетилтиоацетата), SPDP (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионата), SPDB (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)бутирата) и SMPT (N-сукцинимидилоксикарбонил-альфа-метил-альфа-(2-пиридил-дитио)толуола), SPDB и SMPT. См., например, Thorpe и соавт. (1987 год) *Cancer Res.* 47:5924-31; Wawrzynczak и соавт., In *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel ред., Oxford U. Press, 1987 год). См., также патент США №4,880,935. Дисульфидные линкеры обычно применяют с целью использования распространенных внутриклеточных тиолов, которые могут способствовать расщеплению их дисульфидных связей. Внутриклеточные концентрации наиболее распространенного внутриклеточного тиола, восстановленного глутатиона, обычно находятся в диапазоне 1-10 нМ, что в около 1000 раз выше, чем у наиболее распространенного низкомолекулярного тиола в крови (то есть, цистеина) около 5 мкМ (Goldmacher и соавт., In *Cancer Drug Discovery and Development: Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins* (G. L. Phillips ред., Springer, 2013 год)). Внутриклеточные ферменты семейства белков дисульфид-изомеразы могут также способствовать внутриклеточному расщеплению дисульфидного линкера. Как применяется в данном документе, расщепляемый дисульфидный линкер относится к любому линкеру, который содержит расщепляемый дисульфидный фрагмент. Термин "расщепляемый дисульфидный фрагмент" относится к дисульфидной связи, которая может быть расщеплена и/или восстановлена, например, тиолом или ферментом. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый дисульфидный фрагмент представляет собой дисульфидил-диметил.

[00151] В некоторых вариантах реализации изобретения линкером является расщепляемый сульфонамидный линкер. Как применяется в данном документе, расщепляемый сульфонамидный линкер относится к любому линкеру, который содержит расщепляемый сульфонамидный фрагмент. Термин "расщепляемый сульфонамидный

фрагмент" относится к сульфонамидной группе, то есть, к сульфонильной группе, присоединенной к аминогруппе, при этом серо-азотная связь может быть расщеплена.

[00152] В некоторых вариантах реализации изобретения линкер может быть линкером дендритного типа для ковалентного присоединения более чем одного фрагмента лекарственного средства к фрагменту антитела через разветвляющийся, многофункциональный фрагмент линкера. См., например, Sun и соавт. (2002 год) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12:2213-5; Sun и соавт. (2003 год) *Bioorg. Med. Chem.* 11:1761-8.

Дендритные линкеры могут увеличивать молярное соотношение лекарственного средства по отношению к антителу, то есть, содержание лекарственного средства, что связано с эффективностью ADC. Таким образом, если фрагмент антитела несет только одну реакционноспособную цистеиновую тиольную группу, например, через дендритный линкер можно присоединить множество фрагментов лекарственного средства. В некоторых вариантах реализации изобретения линкерный фрагмент или фрагмент линкер-лекарственное средство могут быть присоединены к антителу посредством химии восстановленных дисульфидных мостиков или ограниченной технологии ограниченной утилизации лизина. См., например, Международные публикации № WO 2013173391 и WO 2013173393.

[00153] В некоторых вариантах реализации изобретения линкер расщепляется расщепляющим агентом, например, ферментом, который присутствует во внутриклеточной среде (например, в лизосоме или эндосоме, или кавеоле). Линкером может быть, например, пептидный линкер, который расщепляется внутриклеточной пептидазой или ферментом протеазы, включая, но без ограничений, лизосомальную или эндосомальную протеазу. В некоторых вариантах реализации изобретения линкером является расщепляемый пептидный линкер. Как применяется в данном документе, расщепляемый пептидный линкер относится к любому линкеру, который содержит расщепляемый пептидный фрагмент. Термин "расщепляемый пептидный фрагмент" относится к любой химической связи, связывающей аминокислоты (натуральные или синтетические производные аминокислот), которые могут быть расщеплены агентом, который присутствует во внутриклеточной среде. Например, линкер может содержать последовательность аланин-аланин-аспарагин (Ala-Ala-Asn) или валин-цитруллин (Val-Cit), которая расщепляется пептидазой, такой как катепсин, например, катепсин В.

[00154] В некоторых вариантах реализации изобретения линкер представляет собой расщепляемый ферментом линкер и расщепляемый пептидный фрагмент в линкере расщепляется ферментом. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый пептидный фрагмент расщепляется лизосомальным ферментом, например, катепсином. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер представляет собой расщепляемый катепсином линкер. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый пептидный фрагмент в линкере расщепляется лизосомальным цистеиновым катепсином, таким как катепсин В, С, F, H, K, L, O, S, V, X или W. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый пептидный фрагмент расщепляется катепсином В. Типовым дипептидом, который может быть расщеплен катепсином В, является валин-цитруллин (Val-Cit) (Dubowchik и соавт., 2002 год) *Bioconjugate Chem.* 13:855-69). В некоторых вариантах реализации ADC, который содержит расщепляемый пептидный фрагмент, демонстрирует более низкие уровни агрегации и/или более высокое содержание лекарственного средства (p) по сравнению с ADC, который содержит альтернативный расщепляемый фрагмент (например, расщепляемый дисульфидный фрагмент или расщепляемый сульфонамидный фрагмент).

[00155] В некоторых вариантах реализации изобретения линкер или расщепляемый

пептидный фрагмент в линкере содержит аминокислотную единицу. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная единица позволяет расщеплять линкер с помощью протеазы, тем самым облегчая высвобождение фрагмента лекарственного средства из ADC при воздействии одной или более внутриклеточных протеаз, таких как один или более лизосомальных ферментов (Doronina и соавт. (2003 год) Nat. Biotechnol. 21:778-84; Dubowchik and Walker (1999 год) Pharm. Therapeutics 83: 67-123). Типовые аминокислотные единицы включают в себя, но без ограничений, дипептиды, трипептиды, тетрапептиды и пентапептиды. Типовые дипептиды включают в себя, но без ограничений, валин-цитруллин (Val-Cit), аланин-аспарагин (Ala-Asn), аланин-фенилаланин (Ala-Phe), фенилаланин-лизин (Phe-Lys), аланин-лизин (Ala-Lys), аланин-валин (Ala-Val), валин-аланин (Val-Ala), валин-лизин (Val-Lys), лизин-лизин (Lys-Lys), фенилаланин-цитруллин (Phe-Cit), лейцин-цитруллин (Leu-Cit), изолейцин-цитруллин (Ile-Cit), триптофан-цитруллин (Trp-Cit) и фенилаланин-аланин (Phe-Ala). Типовые трипептиды включают в себя, но без ограничений, аланин-аланин-аспарагин (Ala-Ala-Asn), глицин-валин-цитруллин (Gly-Val-Cit), глицин-глицин-глицин (Gly-Gly-Gly), фенилаланин-фенилаланин-лизин (Phe-Phe-Lys) и глицин-фенилаланин-лизин (Gly-Phe-Lys). Другие типовые аминокислотные единицы включают, но без ограничений, Gly-Phe-Leu-Gly, Ala-Leu-Ala-Leu, Phe-N⁹-тозил-Arg и Phe-N⁹-Нитро-Arg, как описано, например, в патенте США №6,214,345. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная единица в линкере содержит Val-Cit. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная единица в линкере содержит Ala-Ala-Asn. В некоторых вариантах реализации изобретения ADC, который включает в себя Val-Cit, демонстрирует уменьшение нецелевого уничтожения клеток, увеличение целевого уничтожения клеток, снижение уровней агрегации и/или более высокое содержание лекарственного средства (р) по сравнению с ADC, который содержит альтернативную аминокислотную единицу или альтернативный расщепляемый фрагмент. Аминокислотная единица может содержать аминокислотные остатки, которые встречаются в природе и/или второстепенные аминокислоты, и/или не встречающиеся в природе аналоги аминокислот, такие как цитруллин. Аминокислотные единицы могут быть сконструированы и оптимизированы для ферментативного расщепления конкретным ферментом, например, опухолеассоциированной протеазой, лизосомальной протеазой, такой как катепсин В, С, D или S, или плазминовой протеазой.

[00156] В некоторых вариантах реализации изобретения линкер в любом из описанных в данном документе ADC может содержать по меньшей мере одну спейсерную единицу, соединяющую фрагмент антитела с фрагментом лекарственного средства. В некоторых вариантах реализации изобретения спейсерная единица соединяет сайт расщепления (например, расщепляемый пептидный фрагмент) в линкере с фрагментом антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер и/или спейсерная единица в линкере являются по существу гидрофильными. Гидрофильный линкер может применяться для уменьшения степени, в которой лекарственное средство может выкачиваться из устойчивых раковых клеток из-за множественной устойчивости к лекарственным средствам (MDR) или функционально аналогичных транспортеров. В некоторых аспектах линкер включает один или более фрагментов полиэтиленгликоля (ПЭГ), например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 фрагментов ПЭГ. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер является более коротким линкером ПЭГ и обеспечивает улучшенную стабильность и уменьшенную агрегацию по сравнению с более длинными линкерами ПЭГ.

[00157] В некоторых вариантах реализации изобретения спейсерная единица в линкере

содержит один или более фрагментов ПЭГ. В некоторых вариантах реализации изобретения спейсерная единица содержит $-(\text{ПЭГ})_m$ - и m представляет собой целое число от 1 до 10. В некоторых вариантах реализации изобретения m находится в диапазоне от 1 до 10; от 2 до 8; от 2 до 6; от 2 до 5; от 2 до 4; или от 2 до 3. В некоторых вариантах реализации изобретения m равно 8. В некоторых вариантах реализации изобретения m равно 4. В некоторых вариантах реализации изобретения m равно 3. В некоторых вариантах реализации изобретения m равно 2. В некоторых вариантах реализации изобретения спейсерная единица содержит $(\text{ПЭГ})_2$, $(\text{ПЭГ})_4$, $(\text{ПЭГ})_8$, $(\text{ПЭГ})_9$, $(\text{ПЭГ})_3$ -триазол- $(\text{ПЭГ})_3$, $(\text{ПЭГ})_4$ -триазол- $(\text{ПЭГ})_3$, или дибензилциклооктен-триазол- $(\text{ПЭГ})_3$. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения спейсерная единица содержит $(\text{ПЭГ})_2$. В некоторых вариантах реализации изобретения ADC, который содержит более короткую спейсерную единицу (например, $(\text{ПЭГ})_2$), демонстрирует более низкие уровни агрегации и/или более высокое содержание лекарственного средства (p) по сравнению с ADC, который содержит более длинную спейсерную единицу (например, $(\text{ПЭГ})_8$).

[00158] В некоторых вариантах реализации изобретения спейсерная единица в линкере содержит алкильный фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения спейсерная единица содержит $-(\text{CH}_2)_n$ -, и n представляет собой целое число от 1 до 10 (то есть, n может быть 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10). В некоторых вариантах реализации изобретения n равно 5. В некоторых вариантах реализации изобретения ADC, который содержит более короткую спейсерную единицу (например, $(\text{CH}_2)_5$), демонстрирует более низкие уровни агрегации и/или более высокое содержание лекарственного средства (p) по сравнению с ADC, который содержит более длинную спейсерную единицу (например, $(\text{ПЭГ})_8$).

[00159] Спейсерная единица может быть применена, например, для связывания фрагмента антитела с фрагментом лекарственного средства, прямо или косвенно. В некоторых вариантах реализации изобретения спейсерная единица непосредственно связывает фрагмент антитела с фрагментом лекарственного средства. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент антитела и фрагмент лекарственного средства присоединяются через спейсерную единицу, содержащую одну или более фрагментов ПЭГ (например, $(\text{ПЭГ})_2$ или $(\text{ПЭГ})_4$). В некоторых вариантах реализации изобретения спейсерная единица опосредованно связывает фрагмент антитела с фрагментом лекарственного средства. В некоторых вариантах реализации изобретения спейсерная единица связывает фрагмент антитела с фрагментом лекарственного средства опосредованно через расщепляемый фрагмент (например, расщепляемый пептид, расщепляемый дисульфид или расщепляемый сульфонамид) и/или присоединенный фрагмент для присоединения спейсерной единицы к фрагменту антитела, например, малеимидному фрагменту.

[00160] Спейсерная единица в различных вариантах реализации изобретения прикрепляется к фрагменту антитела (то есть к антителу или антигенсвязывающему фрагменту) через малеимидный фрагмент (Mal). В некоторых вариантах реализации изобретения ADC, который содержит линкер, присоединенный к фрагменту антитела через малеимидный фрагмент, демонстрирует более высокое содержание лекарственного средства (p) по сравнению с ADC, который содержит линкер, присоединенный к фрагменту антитела через альтернативный присоединенный фрагмент, такой как сукцинимидный фрагмент.

[00161] Спейсерная единица, которая прикрепляется к антителу или антигенсвязывающему фрагменту через Mal, упоминается в данном документе как "Mal-спейсерная единица". В данном контексте термин "малеимидный фрагмент" означает соединение, которое содержит малеимидную группу, и которое реагирует с сульфгидрильной группой, например, сульфгидрильной группой остатка цистеина на фрагменте антитела. Другие функциональные группы, которые реагируют с сульфгидрильными группами (тиолами), включают иодацетамид, бромацетамид, винилпиридин, дисульфид, пиридилдисульфид, изоцианат и изотиоцианат, но не ограничиваются ими. В некоторых вариантах реализации изобретения Mal-спейсерная единица реагирует с остатком цистеина на антителе или антигенсвязывающем фрагменте. В некоторых вариантах реализации изобретения Mal-спейсерная единица соединяется с антителом или антигенсвязывающим фрагментом через остаток цистеина. В некоторых вариантах реализации изобретения Mal-спейсерная единица содержит ПЭГ-фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения Mal-спейсерная единица содержит алкильный фрагмент.

[00162] В определенных вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-спейсерная единица и расщепляемый пептидный фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый пептидный фрагмент содержит аминокислотную единицу. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная единица содержит Val-Cit. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная единица содержит Ala-Ala-Asn. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-спейсерная единица и Val-Cit. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-(ПЭГ)₂ и Val-Cit. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-(ПЭГ)_m и Val-Cit, где m составляет от 2 до 8 или от 2 до 5, или 2, 3, 4 или 5. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-(ПЭГ)₈ и Val-Cit. В определенных вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-(CH₂)₅ и Val-Cit. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-спейсерная единица и Ala-Ala-Asn. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-(ПЭГ)₂ и Ala-Ala-Asn.

[00163] В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-спейсерная единица и расщепляемый дисульфидный фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый дисульфидный фрагмент представляет собой дисульфидил-диметил. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-спейсерная единица и дисульфидил-диметил. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-(ПЭГ)₄-триазол-(ПЭГ)₃ и дисульфидил-диметил.

[00164] В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-спейсерная единица и расщепляемый сульфонамидный фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-(ПЭГ)₄-триазол-(ПЭГ)₃ и сульфонамид.

[00165] В различных вариантах реализации изобретения спейсерная единица прикрепляется к антителу или антигенсвязывающему фрагменту через сукцинимидный фрагмент (OSu). Спейсерная единица, которая прикрепляется к антителу или антигенсвязывающему фрагменту через OSu, упоминается в данном документе как "OSu-спейсерная единица". В данном контексте термин "сукцинимидный фрагмент" означает соединение, которое содержит сукцинимидное соединение, которое реагирует с аминогруппой, например, аминогруппой лизинового остатка на фрагменте антитела. Типовой сукцинимидный фрагмент представляет собой N-гидроксисукцинимид (NHS). В некоторых вариантах реализации изобретения OSu-спейсерная единица реагирует с

остатком лизина на антителе или антигенсвязывающем фрагменте. В некоторых вариантах реализации изобретения OSu-спейсерная единица соединяется с антителом или антигенсвязывающим фрагментом через остаток лизина. В некоторых вариантах реализации изобретения OSu-спейсерная единица содержит ПЭГ-фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения OSu-спейсерная единица содержит алкильный фрагмент.

[00166] В определенных вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-спейсерная единица и расщепляемый пептидный фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый пептидный фрагмент содержит аминокислотную единицу. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная единица содержит Val-Cit. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная единица содержит Ala-Ala-Asn. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-спейсерная единица и Val-Cit. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-(ПЭГ)₂ и Val-Cit. В других вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-(ПЭГ)₉ и Val-Cit. В других вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-(CH₂)₅ и Val-Cit. В определенных вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-(ПЭГ)₃-триазол-(ПЭГ)₃ и Val-Cit. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-спейсерная единица и Ala-Ala-Asn. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-(ПЭГ)₂ и Ala-Ala-Asn.

[00167] В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-спейсерная единица и расщепляемый дисульфидный фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый дисульфидный фрагмент представляет собой дисульфидил-диметил. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-спейсерная единица и дисульфидил-диметил. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-(ПЭГ)₃-триазол-(ПЭГ)₃ и дисульфидил-диметил. В других вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-дибензилциклооктен-триазол-(ПЭГ)₃ и дисульфидил-диметил.

[00168] В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-спейсерная единица и расщепляемый сульфонамидный фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-(ПЭГ)₃-триазол-(ПЭГ)₃ и сульфонамид. В других вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-дибензилциклооктен-триазол-(ПЭГ)₃ и сульфонамид.

[00169] В некоторых вариантах реализации изобретения Mal-спейсерная единица или OSu-спейсерная единица присоединяют фрагмент антитела (то есть антитело или антигенсвязывающий фрагмент) к расщепляемому фрагменту в линкере. В некоторых вариантах реализации изобретения Mal-спейсерная единица или OSu-спейсерная единица присоединяют антитело или антигенсвязывающий фрагмент к расщепляемому пептидному фрагменту. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый пептидный фрагмент содержит аминокислотную единицу. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-спейсерная единица-аминокислотная единица или OSu-спейсерная единица-аминокислотная единица. В некоторых вариантах реализации изобретения Mal-спейсерная единица или OSu-спейсерная единица содержит ПЭГ-фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения Mal-спейсерная единица или OSu-спейсерная единица содержит алкильный фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная единица содержит Val-Cit. В других вариантах

реализации изобретения аминокислотная единица содержит Ala-Ala-Asn.

[00170] В некоторых вариантах реализации линкер содержит структуру: Mal-спейсерная единица-Val-Cit. В некоторых вариантах реализации линкер содержит структуру: Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit. В некоторых вариантах реализации линкер содержит структуру: Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-(ПЭГ)₈-Val-Cit. В определенных вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-(CH₂)₅-Val-Cit. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-спейсерная единица-Ala-Ala-Asn. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-(ПЭГ)₂-Ala-Ala-Asn.

[00171] В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-спейсерная единица-Val-Cit. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-(ПЭГ)₂-Val-Cit. В других вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-(ПЭГ)₉-Val-Cit. В других вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-(CH₂)₅-Val-Cit. В других вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-(ПЭГ)₃-триазол-(ПЭГ)₃-Val-Cit. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-спейсерная единица-Ala-Ala-Asn. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-(ПЭГ)₂-Ala-Ala-Asn.

[00172] В различных вариантах реализации изобретения Mal-спейсерная единица или OSu-спейсерная единица присоединяют антитело или антигенсвязывающий фрагмент к расщепляемому дисульфидному фрагменту. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-спейсерная единица-дисульфид или OSu-спейсерная единица-дисульфид. В некоторых вариантах реализации изобретения дисульфид представляет собой дисульфидил-диметил. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-спейсерная единица-дисульфидил-диметил. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-(ПЭГ)₄-триазол-(ПЭГ)₃-дисульфидил-диметил. В других вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-спейсерная единица-дисульфидил-диметил. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-(ПЭГ)₃-триазол-(ПЭГ)₃-дисульфидил-диметил. В других вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-дибензилциклооктен-триазол-(ПЭГ)₃-дисульфидил-диметил.

[00173] В определенных вариантах реализации изобретения Mal-спейсерная единица или OSu-спейсерная единица присоединяют антитело или антигенсвязывающий фрагмент к расщепляемому сульфонамидному фрагменту. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-спейсерная единица-сульфонамид или OSu-спейсерная единица-сульфонамид. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-(ПЭГ)₄-триазол-(ПЭГ)₃-сульфонамид. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-(ПЭГ)₃-триазол-(ПЭГ)₃-сульфонамид. В других вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-дибензилциклооктен-триазол-(ПЭГ)₃-сульфонамид.

[00174] В различных вариантах реализации изобретения расщепляемый фрагмент в линкере соединяется непосредственно с фрагментом лекарственного средства. В других вариантах реализации изобретения другая спейсерная единица применяется для прикрепления расщепляемого фрагмента в линкере к фрагменту лекарственного средства. В различных вариантах реализации изобретения фрагмент лекарственного

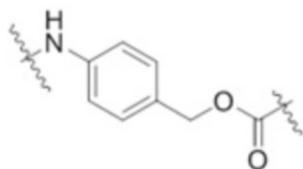
средства представляет собой эрибулин. В различных вариантах реализации изобретения эрибулин присоединен к расщепляемому фрагменту в линкере с помощью спейсерной единицы. В некоторых вариантах реализации изобретения эрибулин присоединен к расщепляемому фрагменту в линкере с помощью саморасщепляющейся спейсерной единицы. В некоторых вариантах реализации изобретения эрибулин присоединен к расщепляемому фрагменту в линкере с помощью саморасщепляющейся спейсерной единицы, расщепляемый фрагмент содержит Val-Cit, а дополнительная спейсерная единица, содержащая ПЭГ, соединяет расщепляемый фрагмент с фрагментом антитела. В определенных вариантах реализации изобретения эрибулин соединяется с антителом к FRA через Mal-спейсерная единица в линкере, соединенном с расщепляемым фрагментом Val-Cit и саморасщепляющейся спейсерной единицей pAB. В определенных других вариантах реализации изобретения эрибулин соединяется с антителом к her2 через Mal-спейсерная единица в линкере, соединенном с расщепляемым фрагментом Val-Cit и саморасщепляющейся спейсерной единицей pAB.

[00175] Спейсерная единица может быть "саморасщепляющейся" или "не саморасщепляющейся". "Не саморасщепляющаяся" спейсерная единица, представляет собой спейсерную единицу, полностью или частично остающуюся связанной с фрагментом лекарственного средства при расщеплении линкера. Примеры не саморасщепляющихся спейсерных единиц включают глициновую спейсерную единицу и глицин-глициновую спейсерную единицу, но не ограничиваются ими. Не саморасщепляющиеся спейсерные единицы могут со временем деградировать, но не могут легко в полной мере высвободить связанное нативное лекарственное средство в клеточных условиях. "Саморасщепляющаяся" спейсерная единица обеспечивает высвобождение фрагмента нативного лекарственного средства во внутриклеточных условиях. "Нативное лекарственное средство" представляет собой лекарственное средство, в котором после расщепления/деградации спейсерной единицы не остается части спейсерной единицы или другой химической модификации.

[00176] Химия саморасщепления известна в данной области техники и может быть легко выбрана для описанных ADC. В различных вариантах реализации изобретения спейсерная единица, прикрепляющая расщепляемый фрагмент в линкере к фрагменту лекарственного средства (например, эрибулина), является саморасщепляющейся и подвергается саморасщеплению одновременно с или незадолго до/после расщепления расщепляемого фрагмента при внутриклеточных условиях.

[00177] В некоторых вариантах реализации изобретения саморасщепляющаяся спейсерная единица в линкере содержит п-аминобензильную группу. В некоторых вариантах реализации изобретения, п-аминобензиловый спирт (pABOH) присоединен к аминокислотной единице или другому расщепляемому фрагменту в линкере посредством амидной связи, и между pABOH и фрагментом лекарственного средства образуется карбамат, метилкарбамат или карбонат (Hamann и соавт. (2005 год) Expert Opin. Ther. Patents 15:1087-103). В некоторых вариантах реализации изобретения саморасщепляющаяся спейсерная единица представляет собой или содержит п-аминобензилоксикарбонил (pAB). Не привязываясь к теории, считается, что саморасщепляемый pAB включает спонтанную реакцию 1,6-элиминации (Jain и соавт. (2015 год) Pharm Res 32:3526-40).

[00178] В различных вариантах реализации изобретения структура п-аминобензилоксикарбонила (pAB), применяемого в описанных ADC, показана ниже:



p-амино-бензилоксикарбонил

[00179] В различных вариантах реализации изобретения саморасщепляющаяся спейсерная единица прикрепляет расщепляемый фрагмент в линкере к амину С-35 на эрибулине. В некоторых вариантах реализации изобретения саморасщепляющаяся спейсерная единица представляет собой рАВ. В некоторых вариантах реализации изобретения рАВ прикрепляет расщепляемый фрагмент в линкере к амину С-35 на эрибулине. В некоторых вариантах реализации изобретения рАВ подвергается саморасщеплению при расщеплении расщепляемого фрагмента, и эрибулин высвобождается из ADC в его нативной, активной форме. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело к FRA (например, MORAb-003) соединяется с амином С-35 эрибулина с помощью линкера, содержащего Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB. В других вариантах реализации изобретения антитело к her2 (например, трастузумаб) соединяется с амином С-35 эрибулина с помощью линкера, содержащего Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB.

[00180] В некоторых вариантах реализации изобретения рАВ подвергается саморасщеплению при расщеплении расщепляемого пептидного фрагмента в линкере. В некоторых вариантах реализации изобретения расщепляемый пептидный фрагмент содержит аминокислотную единицу. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит аминокислотную единицу-рАВ. В некоторых вариантах реализации изобретения аминокислотная единица представляет собой Val-Cit. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Val-Cit-pAB (VCP). В определенных вариантах реализации изобретения аминокислотная единица представляет собой Ala-Ala-Asn. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Ala-Ala-Asn-pAB.

[00181] В некоторых вариантах реализации изобретения рАВ подвергается саморасщеплению при расщеплении расщепляемого дисульфидного фрагмента в линкере. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит дисульфид-рАВ. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит дисульфидил-диметил-рАВ.

[00182] В некоторых вариантах реализации изобретения рАВ подвергается саморасщеплению при расщеплении расщепляемого сульфонамидного фрагмента в линкере. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит сульфонамид-рАВ.

[00183] В различных аспектах фрагмент антитела ADC конъюгирует с фрагментом лекарственного средства посредством линкера, при этом линкер содержит Mal-спейсерная единица, расщепляемую аминокислотную единицу и рАВ. В некоторых вариантах реализации изобретения спейсерная единица содержит ПЭГ-фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения спейсерная единица содержит алкильный фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-(ПЭГ)₂-аминокислотная единица-рАВ. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB. В других вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-(ПЭГ)₂-Ala-Ala-Asn-pAB. В некоторых вариантах реализации

изобретения линкер содержит Mal-(ПЭГ)₈-аминокислотная единица-рАВ. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-(ПЭГ)₈-Val-Cit-рАВ. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-(CH₂)₅-аминокислотная единица-рАВ. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-(CH₂)₅-Val-Cit-рАВ.

[00184] В различных вариантах реализации изобретения фрагмент антитела ADC конъюгирует с фрагментом лекарственного средства посредством линкера, при этом линкер содержит Mal-спейсерная единица-дисульфид-рАВ. В некоторых вариантах реализации изобретения спейсерная единица содержит ПЭГ-фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-(ПЭГ)₄-триазол-(ПЭГ)₃-дисульфид-рАВ. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-(ПЭГ)₄-триазол-(ПЭГ)₃-дисульфидил-диметил-рАВ.

[00185] В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент антитела ADC конъюгирует с фрагментом лекарственного средства посредством линкера, при этом линкер содержит Mal-спейсерная единица-сульфонамид-рАВ. В некоторых вариантах реализации изобретения спейсерная единица содержит ПЭГ-фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит Mal-(ПЭГ)₄-триазол-(ПЭГ)₃-сульфонамид-рАВ.

[00186] В некоторых аспектах фрагмент антитела ADC конъюгирует с фрагментом лекарственного средства посредством линкера, при этом линкер содержит OSu-спейсерная единица-аминокислотная единица-рАВ. В некоторых вариантах реализации изобретения спейсерная единица содержит ПЭГ-фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения спейсерная единица содержит алкильный фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-(ПЭГ)₂-аминокислотная единица-рАВ. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-(ПЭГ)₂-Val-Cit-рАВ. В других вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-(ПЭГ)₂-Ala-Ala-Asn-рАВ. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-(ПЭГ)₉-аминокислотная единица-рАВ. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-(ПЭГ)₉-Val-Cit-рАВ. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-(CH₂)₅-аминокислотная единица-рАВ. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-(CH₂)₅-Val-Cit-рАВ. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-(ПЭГ)₃-триазол-(ПЭГ)₃-аминокислотная единица-рАВ. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-(ПЭГ)₃-триазол-(ПЭГ)₃-Val-Cit-рАВ.

[00187] В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент антитела ADC конъюгирует с фрагментом лекарственного средства посредством линкера, при этом линкер содержит OSu-спейсерная единица-дисульфид-рАВ. В некоторых вариантах реализации изобретения спейсерная единица содержит ПЭГ-фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-(ПЭГ)₃-триазол-(ПЭГ)₃-дисульфид-рАВ. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-(ПЭГ)₃-триазол-(ПЭГ)₃-дисульфидил-диметил-рАВ. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-дибензилциклооктен-триазол-(ПЭГ)₃-дисульфид-рАВ. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер

содержит OSu-дибензилциклооктен-триазол-(ПЭГ)₃-дисульфидил-диметил-рАВ.

[00188] В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент антитела ADC конъюгирует с фрагментом лекарственного средства посредством линкера, при этом линкер содержит OSu-спейсерная единица-сульфонамид-рАВ. В некоторых вариантах реализации изобретения спейсерная единица содержит ПЭГ-фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-(ПЭГ)₃-триазол-(ПЭГ)₃-сульфонамид-рАВ. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер содержит OSu-дибензилциклооктен-триазол-(ПЭГ)₃-сульфонамид-рАВ.

[00189] В различных вариантах реализации изобретения линкер предназначен для облегчения неспецифичного цитолиза (убийства соседних клеток) посредством расщепления после клеточной интернализации и диффузии фрагмента линкер-лекарственное средство и/или фрагмента лекарственного средства отдельно к соседним клеткам. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер способствует клеточной интернализации. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер предназначен для сведения к минимуму расщепления во внеклеточной среде и, таким образом, для снижения токсичности по отношению к нецелевой ткани (например, не раковой ткани), при сохранении связывания ADC с целевой клеткой и неспецифическим цитолизом раковой ткани, которая не экспрессирует антиген, нацеленный на фрагмент антитела ADC, но окружает целевую раковую ткань, экспрессирующую этот антиген. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер, содержащий малеимидный фрагмент (Mal), фрагмент полиэтиленгликоля (ПЭГ), валин-цитруллин (Val-Cit или "vc") и рАВ, обеспечивает эти функциональные признаки. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер, содержащий Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-рАВ особенно эффективен для обеспечения этих функциональных признаков, например, при соединении фрагмента антитела к FRA, такого как MORAb-003, и фрагмента лекарственного средства, такого как эрибулин. В некоторых вариантах реализации изобретения, по меньшей мере, некоторые из этих функциональных признаков также могут наблюдаться без фрагмента антитела к FRA и/или без MORAb-003. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения линкер, содержащий Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-рАВ эффективен для обеспечения всех или некоторых из этих функциональных признаков, например, при соединении фрагмента антитела к her2, такого как трастузумаб, и фрагмента лекарственного средства, такого как эрибулин.

[00190] В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент антитела конъюгирован с фрагментом лекарственного средства посредством линкера, содержащего малеимидный фрагмент (Mal), фрагмент полиэтиленгликоля (ПЭГ), валин-цитруллин (Val-Cit или "vc") и рАВ. В этих вариантах реализации изобретения малеимидный фрагмент ковалентно присоединяет фрагмент линкера-лекарственного средства к фрагменту антитела, а рАВ действует как саморасщепляющаяся спейсерная единица. Такой линкер может упоминаться как линкер "m-vc-рАВ", линкер "Mal-VCP", линкер "Mal-(ПЭГ)₂-VCP", или линкер "Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-рАВ". В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент лекарственного средства представляет собой эрибулин. Структура Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-рАВ-эрибулин приведена в Таблице 46. рАВ линкера Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-рАВ присоединен к амину C-35 на эрибулине.

[00191] Было обнаружено, что ADC, содержащие Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-рАВ-эрибулин, демонстрируют конкретную комбинацию желательных свойств, особенно в случае если спарены с антителом к FRA, таким как MORAb-003, или его антигенсвязывающим

фрагментом. Эти свойства включают, но не ограничиваются ими, эффективные уровни содержания лекарственного средства ($r \sim 4$), низкие уровни агрегации, стабильность в условиях хранения или при циркуляции в организме (например, стабильность в сыворотке крови), сохранения аффинности к клеткам, экспрессирующим цель по сравнению с неконъюгированным антителом, сильной цитотоксичностью против клеток, экспрессирующих цель, низкие уровни нецелевого уничтожения клеток, высокие уровни неспецифического цитолиза и/или эффективную противораковую активность *in vivo*, все по сравнению с ADC с применением других линкер-токсинов и/или антител. В то время как многочисленные варианты линкера и комбинации спейсеров и сайтов расщепления были известны в данной области техники и могут обеспечить определенные преимущества в одной или более из этих функциональных категорий, конкретная комбинация Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB, соединяющая эрибулин с фрагментом антитела, таким как антитело к FRA (например, MORAb-003), может обеспечивать хорошие или превосходные свойства по всему спектру желаемых функциональных свойств для терапевтического ADC. В некоторых вариантах реализации изобретения хорошие или превосходные функциональные свойства, обеспечиваемые конкретной комбинацией линкера Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB, соединяющего эрибулин с фрагментом антитела, могут наблюдаться с этим линкер-токсином, конъюгированным с, например, антителом к her2, таким как трастузумаб.

[00192] В некоторых вариантах реализации изобретения ADC содержит Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB-эрибулин и фрагмент антитела, содержащий интернализирующееся антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который сохраняет способность к нацеливанию и интернализации в опухолевой клетке. В некоторых вариантах реализации изобретения ADC содержит Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB-эрибулин и интернализирующееся антитело или его интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент, который нацелен на опухолевые клетки, экспрессирующие FRA. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или его интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент, который нацелен на опухолевую клетку, экспрессирующую FRA, содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 2 (HCDR1), SEQ ID NO: 3 (HCDR2) и SEQ ID NO: 4 (HCDR3); три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 7 (LCDR1), SEQ ID NO: 8 (LCDR2) и SEQ ID NO: 9 (LCDR3), как определено системой нумерации Кабата; или три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 13 (HCDR1), SEQ ID NO: 14 (HCDR2) и SEQ ID NO: 15 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 16 (LCDR1), SEQ ID NO: 17 (LCDR2) и SEQ ID NO: 18 (LCDR3), как определено системой нумерации IMGT. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело его интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент, который нацелен на опухолевые клетки, экспрессирующие FRA, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 23, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или его интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент, который нацелен на опухолевые клетки, экспрессирующие FRA, содержит константный домен тяжелой цепи

IgG1 человека и константный домен легкой цепи каппа Ig.

[00193] В некоторых вариантах реализации изобретения ADC имеет Формулу I:

$Ab-(L-D)_p$ (I)

в которой:

(i) Ab представляет собой интернализирующееся антитело к рецептору фоллиевой кислоты альфа (FRA) или его интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент, содержащий три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 2 (HCDR1), SEQ ID NO: 3 (HCDR2) и SEQ ID NO: 4 (HCDR3); три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 7 (LCDR1), SEQ ID NO: 8 (LCDR2) и SEQ ID NO: 9 (LCDR3), как определено системой нумерации Кабата; или три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 13 (HCDR1), SEQ ID NO: 14 (HCDR2) и SEQ ID NO: 15 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 16 (LCDR1), SEQ ID NO: 17 (LCDR2) и SEQ ID NO: 18 (LCDR3), как определено системой нумерации IMGT;

(ii) D представляет собой эрибулин;

(iii) L представляет собой расщепляемый линкер, содержащий Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB; и

(iv) p представляет собой целое число от 1 до 20.

[00194] В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело его интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент, содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 23, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело представляет собой MORAb-003. В некоторых вариантах реализации изобретения p составляет от 1 до 8 или от 1 до 6. В некоторых вариантах реализации изобретения p составляет от 2 до 8 или от 2 до 5. В некоторых вариантах реализации изобретения p составляет от 3 до 4. В некоторых вариантах реализации изобретения p представляет собой 4.

[00195] В других вариантах реализации изобретения ADC содержит Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB-эрибулин и интернализирующееся антитело или его интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент, который нацелен на опухолевые клетки, экспрессирующие her2. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или его интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент, который нацелен на опухолевую клетку, экспрессирующую her2, содержит три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 71 (HCDR1), SEQ ID NO: 72 (HCDR2) и SEQ ID NO: 73 (HCDR3); три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 74 (LCDR1), SEQ ID NO: 75 (LCDR2) и SEQ ID NO: 76 (LCDR3), как определено системой нумерации Кабата; или три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 191 (HCDR1), SEQ ID NO: 192 (HCDR2) и SEQ ID NO: 193 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 194 (LCDR1), SEQ ID NO: 195 (LCDR2) и SEQ ID NO: 196 (LCDR3), как определено

системой нумерации IMGT. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело его интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент, который нацелен на опухолевые клетки, экспрессирующие her2, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 27, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или его интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент, который нацелен на опухолевые клетки, экспрессирующие her2, содержит константный домен тяжелой цепи IgG1 человека и константный домен легкой цепи каппа Ig.

[00196] В некоторых вариантах реализации изобретения ADC имеет Формулу I:

$$\text{Ab}-(\text{L-D})_p \text{ (I)}$$

в которой:

(i) Ab представляет собой интернализирующееся антитело к рецептору человеческого эпидермального фактора роста 2 типа (her2) или его интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент, содержащий три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 71 (HCDR1), SEQ ID NO: 72 (HCDR2) и SEQ ID NO: 73 (HCDR3); три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 74 (LCDR1), SEQ ID NO: 75 (LCDR2) и SEQ ID NO: 76 (LCDR3), как определено системой нумерации Кабата; или три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 191 (HCDR1), SEQ ID NO: 192 (HCDR2) и SEQ ID NO: 193 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 194 (LCDR1), SEQ ID NO: 195 (LCDR2) и SEQ ID NO: 196 (LCDR3), как определено системой нумерации IMGT;

(ii) D представляет собой эрибулин;

(iii) L представляет собой расщепляемый линкер, содержащий Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB; и

(iv) p представляет собой целое число от 1 до 20.

[00197] В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело его интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 27, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело представляет собой трастузумаб. В некоторых вариантах реализации изобретения p составляет от 1 до 8 или от 1 до 6. В некоторых вариантах реализации изобретения p составляет от 2 до 8 или от 2 до 5. В некоторых вариантах реализации изобретения p составляет от 3 до 4. В некоторых вариантах реализации изобретения p представляет собой 4.

[00198] В других вариантах реализации изобретения ADC содержит Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB-эрибулин и интернализирующееся антитело или его интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент, который нацелен на опухолевые клетки, экспрессирующие мезотелин (MSLN). В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или его интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент, который нацелен на опухолевую клетку, экспрессирующую MSLN, содержит

три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 65 (HCDR1), SEQ ID NO: 66 (HCDR2) и SEQ ID NO: 67 (HCDR3); три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 68 (LCDR1), SEQ ID NO: 69 (LCDR2) и SEQ ID NO: 70 (LCDR3), как определено системой нумерации Кабата; или три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 185 (HCDR1), SEQ ID NO: 186 (HCDR2) и SEQ ID NO: 187 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 188 (LCDR1), SEQ ID NO: 189 (LCDR2) и SEQ ID NO: 190 (LCDR3), как определено системой нумерации IMGT. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело его интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент, который нацелен на опухолевые клетки, экспрессирующие MSLN, содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 25, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело или его интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент, который нацелен на опухолевые клетки, экспрессирующие MSLN, содержит константный домен тяжелой цепи IgG1 человека и константный домен легкой цепи каппа Ig.

[00199] В некоторых вариантах реализации изобретения ADC имеет Формулу I:

$$\text{Ab}-(\text{L-D})_p \text{ (I)}$$

в которой:

(i) Ab представляет собой интернализирующееся антитело к мезотелину или его интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент, содержащий три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 65 (HCDR1), SEQ ID NO: 66 (HCDR2) и SEQ ID NO: 67 (HCDR3); три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 68 (LCDR1), SEQ ID NO: 69 (LCDR2) и SEQ ID NO: 70 (LCDR3), как определено системой нумерации Кабата; или три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 185 (HCDR1), SEQ ID NO: 186 (HCDR2) и SEQ ID NO: 187 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 188 (LCDR1), SEQ ID NO: 189 (LCDR2) и SEQ ID NO: 190 (LCDR3), как определено системой нумерации IMGT;

(ii) D представляет собой эрибулин;

(iii) L представляет собой расщепляемый линкер, содержащий Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB; и

(iv) p представляет собой целое число от 1 до 20.

[00200] В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело его интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент, содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 25, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 26. В некоторых вариантах реализации изобретения интернализирующееся антитело представляет собой MORAb-003, MORAb-009 или трастузумаб. В некоторых вариантах реализации изобретения p составляет от 1 до 8 или от 1 до 6. В некоторых вариантах реализации изобретения p составляет от 2 до 8

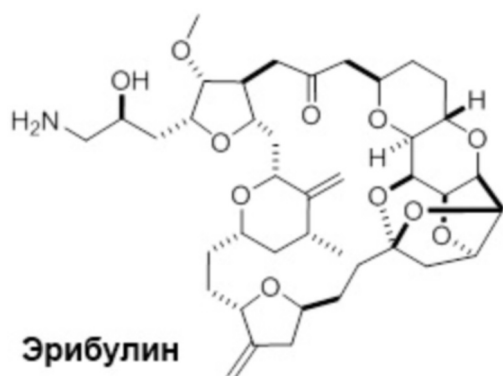
или от 2 до 5. В некоторых вариантах реализации изобретения r составляет от 3 до 4. В некоторых вариантах реализации изобретения r представляет собой 4.

Фрагменты лекарственных средств

[00201] Фрагмент лекарственного средства (D) ADC, описанного в данном документе, может быть любым химиотерапевтическим агентом. Полезные классы химиотерапевтических агентов включают, например, антитубулиновые агенты. В определенных вариантах реализации изобретения фрагмент лекарственного средства представляет собой противотубулиновый агент. Примеры антитубулиновых агентов включают в себя криптофицин и эрибулин. Предпочтительным фрагментом лекарственного средства для применения в описанных ADC является эрибулин.

[00202] В различных вариантах реализации изобретения фрагмент лекарственного средства представляет собой эрибулин. В этих вариантах реализации изобретения линкер ADC присоединен через амин C-35 на эрибулине.

[00203] В различных вариантах реализации изобретения естественная форма эрибулина применяется для соединения с линкером и фрагментом антитела, показана ниже:



[00204] В некоторых вариантах реализации изобретения промежуточное соединение, которое является предшественником линкера, подвергают взаимодействию с фрагментом лекарственного средства в соответствующих условиях. В определенных вариантах реализации изобретения реактивные группы применяют на лекарственном средстве и/или в промежуточном соединении или линкере. Продукт реакции между лекарственным средством и промежуточным соединением или дериватизированным лекарственным средством затем подвергают взаимодействию с антителом или антигенсвязывающим фрагментом в соответствующих условиях. В альтернативном варианте, линкер или промежуточное соединение могут сначала взаимодействовать с антителом или дериватизированным антителом, а затем реагировать с лекарственным средством или дериватизированным лекарственным средством.

[00205] Существует множество различных реакций для ковалентного присоединения лекарственных средств и/или линкеров к фрагменту антитела. Это часто достигается реакцией одного или более аминокислотных остатков молекулы антитела, включая аминокислоты лизина, свободные карбоксильные группы глутаминовой кислоты и аспарагиновой кислоты, сульфгидрильные группы цистеина и различные фрагменты ароматических аминокислот. Например, неспецифическое ковалентное присоединение может быть осуществлено с применением карбодиимидной реакции для связывания карбокси (или амино) группы на соединении с амино или (карбокси) группой на фрагменте антитела. Кроме того, бифункциональные агенты, такие как диальдегиды или имидоэфир, также могут быть применены для связывания аминокислотной группы на соединении с аминокислотной группой на фрагменте антитела. Также для прикрепления

лекарственного средства к связывающим агентам доступна реакция основания Шиффа. Этот способ включает окисление периодата лекарственного средства, которое содержит гликолевые или гидроксильные группы, образуя таким образом альдегид, который затем подвергают взаимодействию со связывающим агентом. Присоединение происходит

5 путем образования основания Шиффа с аминогруппами связывающего агента. Изотиоцианаты также могут быть применены в качестве сопрягающих агентов для ковалентного прикрепления лекарственных средств к связывающим агентам. Другие методы известны специалисту в данной области техники и находятся в рамках данного описания.

10 Содержание лекарственного средства

[00206] Содержание лекарственного средства представлено р, а также упоминается в данном документе как соотношение лекарственного средства к антителу (DAR). Содержание лекарственного средства может составлять от 1 до 20 фрагментов лекарственного средства на фрагмент антитела. В некоторых вариантах реализации

15 изобретения р представляет собой целое число от 1 до 20. В некоторых вариантах реализации изобретения р представляет собой целое число от 1 до 10, от 1 до 9, от 1 до 8, от 1 до 7, от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3 или от 1 до 2. В некоторых вариантах реализации изобретения р представляет собой целое число от 2 до 10, от 2 до 9, от 2 до 8, от 2 до 7, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4 или от 2 до 3. В некоторых вариантах реализации

20 изобретения р представляет собой целое число от 3 до 4. В других вариантах реализации изобретения р составляет 1, 2, 3, 4, 5 или 6, предпочтительно 3 или 4.

[00207] Содержание лекарственного средства может быть ограничено количеством сайтов присоединения на фрагменте антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент линкера (L) ADC прикрепляется к фрагменту антитела через

25 химически активную группу на одном или более аминокислотных остатках на фрагменте антитела. Например, линкер может быть присоединен к фрагменту антитела через свободную амина, имино, гидроксильную, тиольную или карбоксильную группу (например, к N- или C-концу, к эpsilon-аминогруппе одного или более остатков лизина, к свободной карбоксильной группе одного или более остатков глутаминовой кислоты

30 или аспарагиновой кислоты или к сульфгидрильной группе одного или более остатков цистеина). Сайт, к которому присоединен линкер, может быть остатком естественного происхождения в аминокислотной последовательности фрагмента антитела или может быть введен в фрагмент антитела, например, с помощью рекомбинантной технологии ДНК (например, путем введения остатка цистеина в аминокислотную

35 последовательность) или биохимии белка (например, путем восстановления, регулированием рН или гидролизом).

[00208] В некоторых вариантах реализации количество молекул лекарственного вещества, которые можно конъюгировать с фрагментом антитела, ограничено количеством свободных остатков цистеина. Например, если присоединяемая группа

40 представляет собой тиольную группу цистеина, антитело может содержать только одну или несколько тиольных групп цистеина, или может содержать только одну или несколько достаточно реакционноспособных тиольных групп, к которым можно присоединить линкер. Как правило, антитела не содержат многих свободных и реакционноспособных тиольных групп цистеина, которые могут быть связаны с

45 фрагментом лекарственного средства. Действительно, большинство тиольных остатков в антителах существуют в виде дисульфидных мостиков. Чрезмерное присоединение линкер-токсина к антителу может дестабилизировать антитело путем уменьшения остатков цистеина, доступных для образования дисульфидных мостиков. Следовательно,

оптимальное соотношение лекарственное средство:антитело должно увеличивать активность ADC (путем увеличения количества присоединенных фрагментов лекарственного средства на антитело) без дестабилизации фрагмента антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения оптимальное соотношение может

составлять около 3-4.

[00209] В некоторых вариантах реализации изобретения линкер, присоединенный к фрагменту антитела через фрагмент Mal, дает отношение около 3-4. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер, присоединенный к фрагменту антитела через альтернативный фрагмент (например, фрагмент OSu), может обеспечивать менее оптимальное соотношение (например, более низкое соотношение, такое как около 0-3). В некоторых вариантах реализации изобретения линкер, содержащий короткую спейсерную единицу (например, короткую спейсерную единицу ПЭГ, такую как (ПЭГ)₂ или (ПЭГ)₄, или короткую алкильную спейсерную единицу, такую как (CH₂)₅) обеспечивает соотношение около 3-4. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер, который содержит более длинную спейсерную единицу (например, (ПЭГ)₈), может обеспечить менее оптимальное соотношение (например, более низкое соотношение, например, около 0-3). В некоторых вариантах реализации изобретения линкер, содержащий пептидный расщепляемый фрагмент, обеспечивает соотношение около 3-4. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер, который содержит альтернативный расщепляемый фрагмент (например, расщепляемый дисульфид или расщепляемый сульфонамид), может обеспечить менее оптимальное соотношение (например, меньшее соотношение, например, около 0-3). В некоторых вариантах реализации изобретения ADC, содержащий Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB-эрибулин, присоединенный к антителу, такому как антитело к FRA (например, MORAb-003) имеет соотношение около 3-4. В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение около 3-4 наблюдается с ADC, содержащим Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB-эрибулин, присоединенный к другому антителу, такому как антитело к her2 (например, трастузумабу). В некоторых вариантах реализации изобретения оптимальное соотношение, наблюдаемое с ADC, содержащим линкер-токсин Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB-эрибулин, является антитело-независимым.

[00210] В некоторых вариантах реализации изобретения фрагмент антитела подвергают воздействию восстановительных условий до конъюгации с целью получения одного или более свободных остатков цистеина. Антитело, в некоторых вариантах реализации изобретения, можно восстановить с помощью восстанавливающего агента, например, дитиотрейтола (ДТТ) или трис(2-карбоксиил)фосфина (ТСЕР) при частично или полностью восстановительных условиях с целью получения реакционноспособных тиольных групп цистеина. Неспаренные цистеины могут быть получены путем частичного восстановления с ограниченными молярными эквивалентами ТСЕР, что предпочтительно уменьшает межцепочечные дисульфидные связи, которые связывают легкую цепь и тяжелую цепь (по одной паре на спаривание H-L) и две тяжелые цепи в шарнирной области (две пары на спаривание H-H в случае IgG1 человека), оставляя внутрицепочечные дисульфидные связи интактными (Stefano и соавт. (2013 год) Methods Mol. Biol., 1045:145-71). В вариантах реализации изобретения дисульфидные связи внутри антител восстанавливаются электрохимически, например, с использованием рабочего электрода, который создает переменное восстановительное и окисляющее напряжение. Этот подход может обеспечить связывание восстановления дисульфидной связи в режиме реального времени с аналитическим устройством (например, электрохимическим

детекторным устройством, ЯМР-спектрометром или масс-спектрометром) или устройством химического разделения (например, жидкостным хроматографом (например, ВЭЖХ) или электрофорезом (см., например, публикацию США №20140069822)). В некоторых вариантах реализации изобретения антитело подвергают воздействию денатурирующих условий с целью выявления реакционноспособных нуклеофильных групп на аминокислотных остатках, например, лизине или цистеине.

[00211] Содержание лекарственного средства ADC может контролироваться по-разному, например, с помощью: (i) ограничения молярного избытка промежуточного вещества лекарственное средство-линкер или линкерного реагента по отношению к антителу; (ii) ограничения времени или температуры реакции конъюгации; (iii) частичных или ограничивающих восстановительных условий для модификации тиола цистеина; и/или (iv) конструирования с помощью рекомбинантных методов аминокислотной последовательности антитела, так что количество и положение остатков цистеина модифицировано для контроля количества и/или положения присоединений линкер-лекарственное средство.

[00212] В некоторых вариантах реализации изобретения свободные остатки цистеина вводят в аминокислотную последовательность фрагмента антитела. Например, могут быть получены антитела, сконструированные с помощью цистеина, при этом одна или более аминокислот исходного антитела замещены аминокислотой цистеина. Любая форма антитела может быть сконструирована таким образом, то есть мутирована. Например, фрагмент Fab исходного антитела может быть сконструирован для образования сконструированного с помощью цистеина Fab, называемого "ThioFab". Аналогично, исходное моноклональное антитело может быть сконструировано с образованием "ThioMab". Мутация в одном сайте дает один искусственно введенный цистеиновый остаток в ThioFab, тогда как мутация в одном сайте дает два искусственно введенных цистеиновых остатка в ThioMab из-за димерной природы антитела IgG. ДНК, кодирующая вариант аминокислотной последовательности исходного полипептида, может быть получена различными способами, известными в данной области техники (см., например, способы, описанные в WO 2006/034488). Эти способы включают, но без ограничений, приготовление с помощью сайт-направленного (или опосредованного олигонуклеотидами) мутагенеза, ПЦР-мутагенеза и кассетного мутагенеза ранее приготовленной ДНК, кодирующей полипептид. Варианты рекомбинантных антител также могут быть сконструированы также с помощью манипуляции с рестрикционным фрагментом или с помощью ПЦР с перекрывающимися синтетическими олигонуклеотидами. ADC формулы I содержат, но без ограничений, антитела, которые имеют 1, 2, 3, или 4 искусственно введенных аминокислотных остатков цистеина (Lyon и соавт. (2012 год) *Methods in Enzymol.* 502:123-38). В некоторых вариантах реализации один или более свободных остатков цистеина уже присутствуют в фрагменте антитела без применения инженерии, и в этом случае существующие свободные остатки цистеина можно применять для конъюгирования фрагмента антитела с фрагментом лекарственного средства.

[00213] В некоторых вариантах реализации высокое содержание лекарственного средства (например, $p > 5$), может привести к агрегации, нерастворимости, токсичности или потере способности некоторых конъюгатов антитело-лекарственное средство проникать в клетку. Более высокое содержание лекарственного средства также может отрицательно влиять на фармакокинетику (например, клиренс) определенных ADC. В некоторых вариантах реализации изобретения более низкое содержание лекарственного средства (например, $p < 3$) может снизить активность некоторых ADC против клеток,

экспрессирующих цель и/или случайных клеток. В некоторых вариантах реализации изобретения содержание лекарственного средства для ADC по данному изобретению варьируется от 1 до около 8; от около 2 до около 6; от около 2 до около 5; от около 3 до около 5; или от около 3 до около 4.

5 [00214] Когда более чем одна нуклеофильная группа реагирует с промежуточным соединением лекарственного средства-линкера или реагентом фрагмента линкера с последующим реагентом фрагмента лекарственного средства, в реакционной смеси, содержащей множественные копии фрагмента антитела и фрагмента линкера, затем полученный продукт может представлять собой смесь соединений ADC с распределением
10 одного или более фрагментов лекарственного средства, прикрепленных к каждой копии фрагмента антитела в смеси. В некоторых вариантах реализации изобретения содержание лекарственного средства в смеси ADC, образующихся в результате реакции конъюгации, варьирует от 1 до 20 фрагментов лекарственного средства, прикрепленных на фрагмент антитела. Среднее количество фрагментов лекарственного средства на фрагмент
15 антитела (то есть среднее содержание лекарственного средства или среднее значение ρ) может быть вычислено любым общепринятым способом, известным в данной области техники, например, с помощью масс-спектрометрии (например, обращенно-фазовой ЖХ-МС) и/или высокоэффективной жидкостной хроматографии (например, НИС-ВЭЖХ). В некоторых вариантах реализации изобретения среднее количество фрагментов
20 лекарственного средства на фрагмент антитела определяют с помощью хроматографии с гидрофобным взаимодействием-высокоэффективной жидкостной хроматографией (НИС-ВЭЖХ). В некоторых вариантах реализации изобретения среднее число фрагментов лекарственного средства на фрагмент антитела определяют обращенно-фазовой жидкостной хроматографией-масс-спектрометрией (ЖХ-МС). В некоторых вариантах
25 реализации изобретения среднее количество фрагментов лекарственного средства на фрагмент антитела составляет от около 3 до около 4; от около 3,1 до около 3,9; от около 3,2 до около 3,8; от около 3,2 до около 3,7; от около 3,2 до около 3,6; от около 3,3 до около 3,8; или от около 3,3 до около 3,7. В некоторых вариантах реализации изобретения среднее количество фрагментов лекарственного средства на фрагмент
30 антитела составляет от около 3,2 до около 3,8. В некоторых вариантах реализации изобретения среднее количество фрагментов лекарственного средства на фрагмент антитела составляет около 3,8. В некоторых вариантах реализации изобретения среднее количество фрагментов лекарственного средства на фрагмент антитела составляет от 3 до 4; от 3,1 до 3,9; от 3,2 до 3,8; от 3,2 до 3,7; от 3,2 до 3,6; от 3,3 до 3,8; или от 3,3 до
35 3,7. В некоторых вариантах реализации изобретения среднее количество фрагментов лекарственного средства на фрагмент антитела составляет от 3,2 до 3,8. В некоторых вариантах реализации изобретения среднее количество фрагментов лекарственного средства на фрагмент антитела составляет 3,8.

[00215] В некоторых вариантах реализации изобретения среднее количество
40 фрагментов лекарственного средства на фрагмент антитела составляет от около 3,5 до около 4,5; от около 3,6 до около 4,4; от около 3,7 до около 4,3; от около 3,7 до около 4,2; или от около 3,8 до около 4,2. В некоторых вариантах реализации изобретения среднее количество фрагментов лекарственного средства на фрагмент антитела составляет от около 3,6 до около 4,4. В некоторых вариантах реализации изобретения
45 среднее количество фрагментов лекарственного средства на фрагмент антитела составляет около 4,0. В некоторых вариантах реализации изобретения среднее количество фрагментов лекарственного средства на фрагмент антитела составляет от 3,5 до 4,5; от 3,6 до 4,4; от 3,7 до 4,3; от 3,7 до 4,2; или от 3,8 до 4,2. В некоторых

вариантах реализации изобретения среднее количество фрагментов лекарственного средства на фрагмент антитела составляет от 3,6 до 4,4. В некоторых вариантах реализации изобретения среднее количество фрагментов лекарственного средства на фрагмент антитела составляет 4,0.

5 [00216] В различных вариантах реализации изобретения термин "около", применяемый в отношении среднего количества фрагментов лекарственного средства на фрагмент антитела, составляет +/- 10%.

[00217] Отдельные соединения ADC или "виды" могут быть идентифицированы в смеси с помощью масс-спектропии и разделены с помощью СВЭЖХ или ВЭЖХ, например, хроматографии с гидрофобным взаимодействием (HIC-ВЭЖХ). В некоторых вариантах реализации изобретения из конъюгационной смеси можно выделить однородный или почти однородный ADC с одинаковым значением содержания, например, посредством электрофореза или хроматографии.

10 [00218] В некоторых вариантах реализации изобретения содержание лекарственного средства и/или среднее содержание лекарственного средства около 4 обеспечивает полезные свойства. В некоторых вариантах реализации изобретения содержание лекарственного средства и/или среднее содержание лекарственного средства менее чем около 4 может приводить к неприемлемо высокому уровню неконъюгированных видов антител, которые могут конкурировать с ADC за связывание с целевым антигеном и/или обеспечивать снижение эффективности лечения. В некоторых вариантах реализации изобретения содержание лекарственного средства и/или среднее содержание лекарственного средства более чем около 4 может приводить к неприемлемо высокому уровню неоднородности продукта и/или агрегации ADC. Содержание лекарственного средства и/или среднее содержание лекарственного средства более чем около 4 может также влиять на стабильность ADC из-за потери одной или более химических связей, необходимых для стабилизации фрагмента антитела.

[00219] В некоторых вариантах реализации изобретения ADC имеет Формулу I:

$Ab-(L-D)_p$ (I)

в которой:

30 (i) Ab представляет собой интернализирующееся антитело к рецептору фолиевой кислоты альфа или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариabельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 23, и вариabельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 24;

35 (ii) D представляет собой эрибулин;

(iii) L представляет собой расщепляемый линкер, содержащий Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB; и

(iv) p представляет собой целое число от 3 до 4.

40 [00220] В других вариантах реализации изобретения ADC имеет Формулу I:

$Ab-(L-D)_p$ (I)

где:

(i) Ab представляет собой интернализирующееся антитело к рецептору человеческого эпидермального фактора роста 2 типа или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариabельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 27, и вариabельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 28;

(ii) D представляет собой эрибулин;

(iii) L представляет собой расщепляемый линкер, содержащий Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB; и

(iv) p представляет собой целое число от 3 до 4.

[00221] В некоторых вариантах реализации изобретения p представляет собой 4.

[00222] Данное изобретение включает в себя способы получения описанных ADC. Вкратце, ADC содержат антитело или антигенсвязывающий фрагмент в качестве фрагмента антитела, фрагмента лекарственного средства и линкера, который соединяет фрагмент лекарственного средства и фрагмент антитела. В некоторых вариантах реализации изобретения ADC можно получить с применением линкера, содержащего реакционноспособные функциональные группы для ковалентного присоединения к фрагменту лекарственного средства и фрагменту антитела. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения цистеиновый тиол фрагмента антитела может образовывать связь с реакционноспособной функциональной группой линкера или промежуточного соединения лекарственное средство-линкер (например, малеимидный фрагмент) с образованием ADC. Получение ADC может быть выполнено любым способом, известным специалисту в данной области техники.

[00223] В некоторых вариантах реализации изобретения ADC получают путем контактирования фрагмента антитела с линкером и фрагментом лекарственного средства последовательным образом, таким образом что фрагмент антитела сначала ковалентно связывается с линкером, а затем предварительно сформированное промежуточное соединение антитело-линкер реагирует с фрагментом лекарственного средства. Промежуточное соединение антитело-линкер может подвергаться этапу очистки или не может подвергаться этапу очистки перед контактированием с фрагментом лекарственного средства. В других вариантах реализации изобретения ADC получают путем контактирования фрагмента антитела с соединением линкер-лекарственное средство, предварительно сформированным путем взаимодействия линкера с фрагментом лекарственного средства. Предварительно сформированное соединение линкер-лекарственное средство может или не может подвергаться этапу очистки перед контактированием с фрагментом антитела. В других вариантах реализации изобретения фрагмент антитела контактирует с линкером и фрагментом лекарственного средства в одной реакционной смеси, позволяя одновременное образование ковалентных связей между фрагментом антитела и линкером и между линкером и фрагментом лекарственного средства. Этот способ получения ADC может включать реакцию, в которой фрагмент антитела контактирует с фрагментом антитела перед добавлением линкера к реакционной смеси и наоборот. В некоторых вариантах реализации изобретения ADC получают путем взаимодействия фрагмента антитела с линкером, присоединенным к фрагменту лекарственного средства, такому как Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB-эрибулин, в условиях, допускающих конъюгирование.

[00224] ADC, полученные в соответствии со способами, описанными выше, могут подвергаться этапу очистки. Этап очистки может включать любые биохимические способы, известные в данной области техники для очистки белков, или любую комбинацию их способов. Они включают, но без ограничения, тангенциальную поточную фильтрацию (ТПФ), аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию, любую хроматографию на основе заряда или изоэлектрической точки, хроматографию со смешанным режимом, например, СНТ (керамический гидроксипатит), хроматографию с гидрофобным взаимодействием, эксклюзионную хроматографию, диализ, фильтрацию, селективное осаждение или любую их комбинацию.

Терапевтические применения и композиции

[00225] В данном документе описаны способы применения описанных ADC для лечения субъекта, имеющего расстройство, например, онкологическое расстройство. ADC можно вводить отдельно или в сочетании со вторым терапевтическим агентом и могут вводиться в любой фармацевтически приемлемой композиции, дозировке и режиме дозирования. Эффективность лечения ADC может быть оценена как по токсичности, так и по показателям эффективности и соответствующим образом скорректирована. Измерения эффективности включают, но не ограничиваются ими, наблюдаемый *in vitro* или *in vivo* цитостатический и/или цитотоксический эффект, уменьшенный объем опухоли, ингибирование роста опухоли и/или пролонгированное выживание.

[00226] Известны способы определения того, оказывает ли ADC цитостатический и/или цитотоксический эффект на клетку. Например, цитотоксическую или цитостатическую активность ADC можно измерить путем: обработки клеток млекопитающих, экспрессирующих целевой белок ADC в клеточной культуральной среде; культивирования клеток в течение периода от около 6 часов до около 5 дней; и измерение жизнеспособности клеток. Исследования *in vitro* на клетках также могут быть применены для измерения жизнеспособности (пролиферации), цитотоксичности и индукции апоптоза (активации каспазы) ADC.

[00227] Для определения того, оказывает ли конъюгат антитело-лекарственное средство цитостатический эффект, может быть применен анализ включения тимидина. Например, раковые клетки, экспрессирующие целевой антиген с плотностью 5000 клеток/лунка 96-луночного планшета, могут быть культивированы в течение 72-часового периода и подвергаются воздействию 0,5 мкКи ^3H -тимидина в течение последних 8 часов 72-часового периода. Включение ^3H -тимидина в клетки культуры измеряется в присутствии и отсутствии ADC.

[00228] Для определения цитотоксичности могут быть измерены некроз или апоптоз (запрограммированная гибель клеток). Некроз обычно сопровождается повышенной проницаемостью плазматической мембраны; клеточным отеком и разрывом плазматической мембраны. Апоптоз обычно характеризуется пузырением мембраны, конденсацией цитоплазмы и активацией эндогенных эндонуклеаз. Определение любого из этих эффектов на раковые клетки указывает на то, что ADC полезен при лечении рака.

[00229] Жизнеспособность клеток может быть измерена, например, путем определения в клетке поглощения красителя, такого как нейтральный красный, трипановый синий, кристаллический фиолетовый или ALAMARTM синий (см., например, Page и соавт. (1993 год) Intl. J. Oncology 3:473-6). В таком анализе клетки инкубируют в средах, содержащих краситель, клетки промывают, а оставшийся краситель, отражающий клеточное поглощение красителя, измеряют спектрофотометрически. В некоторых вариантах реализации изобретения *in vitro* активность полученных ADC оценивают, применяя анализ с кристаллическим фиолетовым. Кристаллический фиолетовый представляет собой триарилметановый краситель, который накапливается в ядре жизнеспособных клеток. В этом анализе клетки подвергаются воздействию ADC или контрольных агентов в течение определенного периода времени, после чего клетки окрашивают кристаллическим фиолетовым, тщательно промывают водой, затем солибилизируют 1% SDS и считывают спектрофотометрически. Белоксвязывающий краситель сульфородамин В (SRB) также может быть применен для измерения цитотоксичности (Skehan и соавт., 1990 год) J. Natl. Cancer Inst. 82:1107-12).

[00230] Апоптоз можно количественно определить, например, путем измерения

фрагментации ДНК. Доступны коммерческие фотометрические способы количественного определения фрагментации ДНК *in vitro*. Примеры таких анализов, включая TUNEL (который обнаруживает включение меченых нуклеотидов в фрагментированной ДНК) и анализы на основе ИФА, описаны в Biochemica (1999 год) №2, стр. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

[00231] Апоптоз можно также определить путем измерения морфологических изменений в клетке. Например, как и при некрозе, потеря целостности плазматической мембраны может быть определена путем измерения поглощения определенных красителей (например, флуоресцентного красителя, такого как, например, акридиновый оранжевый или бромид этидия). Способ измерения числа апоптотических клеток был описан Duke and Cohen, *Current Protocols in Immunology* (Coligan и соавт., ред. (1992 год) стр. 3. 17. 1-3. 17. 16). Клетки также могут быть помечены красителем ДНК (например, акридиновым оранжевым, бромидом этидия или иодидом пропидия) и клетками, которые наблюдаются на наличие конденсации и скопления хроматина вдоль внутренней ядерной мембраны. Другие морфологические изменения, которые можно измерить для определения апоптоза, включают, например, цитоплазматическую конденсацию, повышенное пузырение мембраны и уменьшение размера клеток.

[00232] Описанные ADC также могут быть оценены на активность неспецифического цитолиза. Активность неспецифического цитолиза может быть определена, например, анализом с применением двух клеточных линий, одной содержащей целевой антиген и одной не содержащей целевой антиген. Чтобы различать клеточные линии их предпочтительно метят. Например, клетки IGROV1 (FRA+), помеченные Nuclight™ Green (NLG) и HL-60 (FRA-), помеченные Nuclight™ Red (NLR), могут быть совместно культивированы, обработаны ADC к FRA с последующим контролем цитотоксичности. Убийство клеток, не содержащих целевой антиген при их смешивании с клетками, содержащими целевой антиген свидетельствует о неспецифическом цитолизе, тогда как убийство клеток, не содержащих целевой антиген в отсутствие клеток, содержащих целевой антиген свидетельствует об нецелевом уничтожении.

[00233] В некоторых аспектах данное описание включает способ убийства, ингибирования или модулирования роста, или нарушения метаболизма раковой клетки или ткани путем разрушения тубулина. Этот способ может применяться с любым субъектом, где нарушение тубулина обеспечивает терапевтическое преимущество. Субъекты, которые могут получать пользу от разрушения тубулина, включают, но без ограничения, те, которые имеют или могут иметь рак желудка, рак яичников (например, серозный рак яичников), рак легкого (например, немелкоклеточный рак легких), рак груди (например, трижды негативный рак молочной железы), рак эндометрия (например, серозную карциному эндометрия), остеосаркому, саркому Капоши, рак половых клеток яичка, лейкемию, лимфому (например, болезнь Ходжкина, неходжкинскую лимфому), миелому, рак головы и шеи, рак пищевода, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак мозга (например, глиобластома), рак щитовидной железы, колоректальный рак и/или рак кожи (например, меланому) или любые метастазы (Dumontet and Jordan, 2010) *Nat. Rev. Drug Discov.* 9:790-803). В различных вариантах реализации изобретения описанные ADC можно вводить в любой клетке или ткани, которая экспрессирует FRA, такой как раковая клетка или ткань, экспрессирующая FRA. Типовой вариант реализации изобретения включает в себя способ ингибирования передачи сигналов, опосредуемых FRA, или способ убийства клетки. Этот способ можно применять на любой клетке или ткани, которые экспрессируют FRA, таких как раковая клетка или метастатическое поражение. Неограничивающие примеры раков,

экспрессирующих FRA, включают в себя рак желудка, серозный рак яичников, светлоклеточный рак яичника, немелкоклеточный рак легкого, колоректальный рак, трижды негативный рак молочной железы, рак эндометрия, серозную карциному эндометрия, карциноид легких и остеосаркому. Неограничивающие примеры клеток, экспрессирующих FRA, включают клетки карциномы яичника IGROV1 и OVCAR3 человека, клетки немелкоклеточной карциномы легких NC-H2110 человека и клетки, содержащие рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую FRA или ее часть.

[00234] В различных других вариантах реализации изобретения описанные ADC можно вводить в любой клетке или ткани, которая экспрессирует her2, такой как раковая клетка или ткань, экспрессирующая her2. Типовой вариант реализации изобретения включает в себя способ ингибирования передачи сигналов, опосредуемых her2, или способ убийства клетки. Этот способ можно применять на любой клетке или ткани, которые экспрессирует her2, таких как раковая клетка или метастатическое поражение. Неограничивающие примеры раков, экспрессирующих her2, опухолей включают рак молочной железы, рак желудка, рак мочевого пузыря, карциному уротелиальных клеток, рак пищевода, рак легких, рак шейки матки, рак эндометрия и рак яичников (English и соавт. (2013 год) Mol. Diagn. Ther. 17:85-99). Неограничивающие примеры клеток, экспрессирующих her2, включают клетки желудочной карциномы NCI-N87-luc человека, клетки проточной карциномы молочной железы ZR75 и BT-474 человека и клетки, содержащие рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую her2 или ее часть.

[00235] В различных других вариантах реализации изобретения описанные ADC можно вводить любую клетку или ткань, которая экспрессирует мезотелин (MSLN), такую как раковая клетка или ткань, экспрессирующая MSLN. Типовой вариант реализации изобретения включает в себя способ ингибирования передачи сигналов, опосредуемых MSLN, или способ убийства клетки. Этот способ можно применять на любой клетке или ткани, которые экспрессирует MSLN, таких как раковая клетка или метастатическое поражение. Неограничивающие примеры раков, экспрессирующих MSLN, включают мезотелиому, рак поджелудочной железы (например, аденокарциному поджелудочной железы), рак яичников и рак легких (например, аденокарциному легких) (Wang и соавт. (2012 год) PLoS ONE 7:e33214). Неограничивающие примеры клеток, экспрессирующих MSLN включают клетки карциномы яичника OVCAR3 человека, эндометриодные клетки HEC-251 человека, плоские клетки мезотелиомы легких H226 человека и клетки, содержащие рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую MSLN или ее часть.

[00236] Типовые способы включают в себя этапы контактирования клетки с ADC, как описано в данном документе, в эффективном количестве, то есть количестве, достаточном для уничтожения клетки. Способ может быть применен на клетках в культуре, например, *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo*, или *in situ*. Например, клетки, которые экспрессируют FRA, her2 и/или MSLN (например, клетки, собранные путем биопсии опухолевого или метастатического поражения, клетки из верифицированной линии раковых клеток; или рекомбинантные клетки), могут быть культивированы *in vitro* в культуральной среде, а этап контактирования может быть осуществлен путем добавления ADC к культуральной среде. Указанный способ приведет к уничтожению клеток, экспрессирующих FRA, her2 и/или MSLN, включая, в частности, опухолевые клетки, экспрессирующие FRA, her2 и/или MSLN. В альтернативном варианте, чтобы иметь эффект *in vivo* ADC можно вводить субъекту любым подходящим способом введения (например, внутривенным, подкожным или прямым контактом с опухолевой

тканью).

[00237] Эффект *in vivo* описанной терапевтической композиции ADC может быть оценен на подходящей животной модели. Например, могут быть применены модели ксеногенного рака, при этом экспланты рака или перевиваемые ксенотрансплантатные

5 ткани вводятся в животных с ослабленным иммунитетом, таких как безтимусные мыши или мыши SCID (Klein и соавт., 1997 год) *Nature Med.*, 3:402-8). Эффективность может быть предсказана с применением анализов, которые измеряют ингибирование образования опухолей, регрессии опухолей или метастазов и тому подобного.

[00238] Также могут быть применены анализы *in vivo*, которые оценивают

10 продвижение апоптоза. В одном варианте реализации изобретения ксенотрансплантаты от мышей-опухоленосителей, получавших терапевтическую композицию, можно исследовать на наличие апоптотических очагов и сравнить с контрольными мышами, не получавшими лечение, переносщими ксенотрансплантат. Степень, в которой апоптотические очаги обнаруживаются в опухолях мышей, получавших лечение,

15 указывает на терапевтическую эффективность композиции.

[00239] Далее в данном документе описаны способы лечения рака. ADC, описанные в данном документе, могут быть введены млекопитающему, отличному от человека, или человеку в терапевтических целях. Терапевтические способы включают введение млекопитающему, имеющему опухоль, биологически эффективного количества ADC,

20 содержащего выбранный химиотерапевтический агент (например, эрибулин), связанный с нацеливающим антителом, которое связывается с экспрессируемым антигеном, который доступен для связывания или локализован на поверхности раковой клетки. Типовой вариант реализации изобретения представляет собой способ доставки химиотерапевтического агента в клетку, экспрессирующую FRA, включающий

25 конъюгирование химиотерапевтического агента с антителом, которое иммуноспецифически связывается с эпитопом FRA и подвержение клетки воздействию ADC. Типовые опухолевые клетки, которые экспрессируют FRA, для которых указаны ADC по данному изобретению, включают клетки рака желудка, серозного рака яичников, немелкоклеточного рака легких, колоректального рака, рака молочной

30 железы (например, трижды негативного рака молочной железы), карциноиды легких, остеосаркомы, рака эндометрия и карциномы эндометрия с серозной гистологией.

[00240] Другой типовый вариант реализации изобретения представляет собой способ доставки химиотерапевтического агента в клетку, экспрессирующую her2, включающий

35 конъюгирование химиотерапевтического агента с антителом, которое иммуноспецифически связывается с эпитопом her2 и подвержение клетки воздействию ADC. Типовые опухолевые клетки, которые экспрессируют her2, для которых указаны ADC по данному изобретению, включают клетки рака молочной железы, рака желудка, рака мочевого пузыря, карциномы уротелиальных клеток, рака пищевода, рака легких, рака шейки матки, рака эндометрия и рака яичников.

[00241] Другой типовый вариант реализации изобретения представляет собой способ доставки химиотерапевтического агента в клетку, экспрессирующую MSLN,

40 включающий конъюгирование химиотерапевтического агента с антителом, которое иммуноспецифически связывается с эпитопом MSLN и подвержение клетки воздействию ADC. Типовые опухолевые клетки, которые экспрессируют MSLN, для которых указаны ADC по данному изобретению, включают клетки из мезотелиомы, рака поджелудочной железы (например, аденокарциномы поджелудочной железы), рака яичников и рака легкого (например, аденокарциномы легкого).

[00242] Другим типовым вариантом реализации изобретения является способ лечения

пациента, имеющего рак или подверженного риску возникновения рака, экспрессирующего целевой антиген для фрагмента антитела ADC, такой как FRA, her2 или MSLN, содержащий введение пациенту терапевтически эффективного количества ADC по данному изобретению. В некоторых вариантах реализации изобретения пациент не реагирует или слабо реагирует на лечение антителом к FRA при введении в монотерапии и/или на лечение фрагментом лекарственного средства (например, эрибулином) при введении в монотерапии. В других вариантах реализации изобретения пациент не реагирует или слабо реагирует на лечение антителом к her2 при введении в монотерапии и/или на лечение фрагментом лекарственного средства (например, эрибулином) при введении в монотерапии. В других вариантах реализации изобретения пациент не реагирует или слабо реагирует на лечение антителом к MSLN при введении в монотерапии и/или на лечение фрагментом лекарственного средства (например, эрибулином) при введении в монотерапии. В других вариантах реализации изобретения пациент имеет непереносимость к лечению фрагментом лекарственного средства (например, эрибулином) при введении в монотерапии. Например, пациент может иметь необходимость в дозах эрибулина для лечения рака, которые приводят к системной токсичности, которую преодолевают путем целенаправленной доставки в рак, экспрессирующий целевой антиген для фрагмента антитела ADC, такой как FRA, her2 или MSLN, тем самым уменьшая нецелевое уничтожение.

[00243] Другим типовым вариантом реализации изобретения является способ уменьшения или ингибирования роста опухоли, экспрессирующей целевой антиген (например, опухоли, экспрессирующей FRA, опухоли, экспрессирующей her2 или опухоли, экспрессирующей MSLN), включающий введение терапевтически эффективного количества ADC. В некоторых вариантах реализации изобретения лечение является достаточным для уменьшения или ингибирования роста опухоли пациента, уменьшения количества или размера метастатических поражений, снижения опухолевой массы, снижения массы первичной опухоли, снижения инвазивности, продления времени выживания и/или поддержания или улучшения качества жизни. В некоторых вариантах реализации изобретения опухоль устойчива или резистентна к лечению с помощью антитела к FRA при введении в монотерапии и/или на лечение фрагментом лекарственного средства (например, эрибулином) при введении в монотерапии. В других вариантах реализации изобретения опухоль устойчива или резистентна к лечению с помощью антитела к her2 при введении в монотерапии и/или на лечение фрагментом лекарственного средства (например, эрибулином) при введении в монотерапии. В некоторых вариантах реализации изобретения опухоль устойчива или резистентна к лечению с помощью антитела к MSLN при введении в монотерапии и/или на лечение фрагментом лекарственного средства (например, эрибулином) при введении в монотерапии.

[00244] Более того, антитела по данному изобретению могут быть введены млекопитающему, отличному от человека, которое экспрессирует антиген, с которым ADC способен связываться для ветеринарных целей или как животная модель человеческого заболевания. Что касается последнего, такие животные модели могут быть полезны для оценки терапевтической эффективности описанных ADC (например, тестирование дозировок и временной динамики введения).

[00245] Далее в данном документе описано терапевтическое применение описанных ADC. Типовым вариантом реализации изобретения является применение ADC для лечения рака, экспрессирующего целевой антиген (например, рака, экспрессирующего FRA, рака, экспрессирующего her2 или рака, экспрессирующего MSLN). Также описаны

ADC для применения в лечении рака, экспрессирующего целевой антиген (например, рака, экспрессирующего FRA, рака, экспрессирующего her2 или рака, экспрессирующего MSLN). Способы идентификации субъектов, имеющих раки, которые экспрессируют FRA, her2 и/или MSLN, известны в данной области техники и могут быть применены

5 для идентификации подходящих пациентов с целью лечения описанным ADC.

[00246] Другим вариантом реализации изобретения является применение ADC в способе изготовления медицинского препарата для лечения рака, экспрессирующего целевой антиген (например, рака, экспрессирующего FRA, рака, экспрессирующего her2 или рака, экспрессирующего MSLN).

10 [00247] Терапевтические композиции, применяемые в практике вышеприведенных способов, могут быть составлены в виде фармацевтических композиций, содержащих фармацевтически приемлемый носитель, подходящий для желаемого способа доставки. Типовой вариант реализации изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую ADC по данному изобретению и фармацевтически

15 приемлемый носитель. Подходящие носители включают любой материал, который в сочетании с терапевтической композицией сохраняет противоопухолевую функцию терапевтической композиции и, как правило, не вступает в реакции с иммунной системой пациента. Фармацевтически приемлемые носители включают любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые агенты,

20 изотонические и замедляющие всасывание агенты и тому подобные, которые физиологически совместимы. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают одно или более из воды, физиологического раствора, фосфатного буферного раствора, декстрозы, глицерола, этанола, мезилатной соли и тому подобного, а также их комбинаций. Во многих случаях будет предпочтительным включать в композицию

25 изотонические агенты, например, сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит или натрия хлорид. Фармацевтически приемлемые носители могут дополнительно содержать незначительные количества вспомогательных веществ, таких как увлажняющие или эмульсифицирующие агенты, консерванты или буферы, которые увеличивают срок хранения или эффективность ADC.

30 [00248] Терапевтические составы могут быть солиобилизованы и введены любым способом, способным доставлять терапевтическую композицию в расположение опухоли. Потенциально эффективные пути введения включают, но без ограничений, внутривенное, парентеральное, внутрибрюшинное, внутримышечное, внутриопухолевое, внутрикожное, внутриоргановое, ортотопическое и тому подобное. Терапевтические

35 белковые препараты можно лиофилизировать и хранить в виде стерильных порошков, предпочтительно под вакуумом, а затем ресуспендировать в бактериостатической воде (содержащей, например, консервант бензилового спирта) или в стерильной воде перед инъекцией. Терапевтические составы могут содержать ADC или его фармацевтически приемлемую соль, например мезилатную соль.

40 [00249] Описанные в данном документе ADC могут вводиться в дозе от 0,2 мг/кг до около 10 мг/кг пациенту, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах реализации изобретения ADC вводится пациенту ежедневно, раз в два месяца или в любой промежуток времени между ними. Дозировки и протоколы введения для лечения злокачественных новообразований с применением вышеуказанных способов будут

45 варьироваться в зависимости от способа и целевого рака и будут в целом зависеть от ряда других факторов, признанных в данной области техники.

[00250] Известны различные системы доставки и могут применяться для введения одного или более ADC по данному изобретению. Способы введения ADC включают,

но без ограничения, парентеральное введение (например, внутрикожное внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное и подкожное), эпидуральное введение, внутриопухолевое введение и мукозальное введение (например, интраназальный и оральный пути). Кроме того, введение пульмональным способом может быть осуществлено, например, с применением ингалятора или распылителя и состава с аэрозольным агентом. См., например, композиции и способы для пульмонального введения, описанные в патентах США №6,019,968, 5,985,320, 5,985,309, 5,934,272, 5,874,064, 5,855,913, 5,290,540 и 4,880,078; и публикациях РСТ № WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 и WO 99/66903. ADC можно быть введена любым удобным путем, например, путем инфузии или болюсной инъекции или путем абсорбции через эпителиальные или кожно-слизистые выстилающие ткани (например, слизистую оболочку полости рта, прямой кишки и слизистой оболочки кишечника и тому подобное). Введение может быть, как системным, так и местным.

[00251] Описанные в данном документе терапевтические композиции могут быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. В некоторых вариантах реализации изобретения один или более ADC, или фармацевтических композиций поставляются в виде сухого стерилизованного лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере и могут быть ресуспендированы (например, водой или физиологическим раствором) до соответствующей концентрации для введения субъекту. Предпочтительно один или более профилактических, или терапевтических агентов или фармацевтических композиций поставляются в виде сухого стерильного лиофилизированного порошка в герметично закрытом контейнере при единичной дозе по меньшей мере 5 мг, по меньшей мере 10 мг, по меньшей мере 15 мг, по меньшей мере 25 мг, по меньшей мере 35 мг, по меньшей мере 45 мг, по меньшей мере 50 мг, по меньшей мере 75 мг или по меньшей мере 100 мг, или любое количество между данными значениями. В некоторых вариантах реализации изобретения лиофилизированные ADC или фармацевтические композиции хранят при температуре от 2°C до 8°C в оригинальной упаковке. В некоторых вариантах реализации изобретения один или более ADC или фармацевтических композиций, описанных в данном документе, поставляются в жидкой форме в герметично закрытом контейнере, например, в контейнере, указывающем количество и концентрацию агента. В некоторых вариантах реализации изобретения жидкая форма вводимой композиции поставляется в герметично закрытом контейнере по меньшей мере 0,25 мг/мл, по меньшей мере 0,5 мг/мл, по меньшей мере 1 мг/мл, по меньшей мере 2,5 мг/мл, по меньшей мере 5 мг/мл, по меньшей мере 8 мг/мл, по меньшей мере 10 мг/мл, по меньшей мере 15 мг/мл, по меньшей мере 25 мг/мл, по меньшей мере 50 мг/мл, по меньшей мере 75 мг/мл или по меньшей мере 100 мг/мл ADC. Жидкая форма может храниться при температуре от 2°C до 8°C в оригинальной упаковке.

[00252] В некоторых вариантах реализации изобретения, описанные ADC могут быть включены в фармацевтическую композицию, подходящую для парентерального введения. Раствор для инъекций может состоять из жидкой или лиофилизированной лекарственной формы в стеклянном прозрачном флаконе или флаконе из темного (оранжевого) стекла, ампуле или предварительно заполненном шприце или другом известном устройстве доставки или хранения.

[00253] Композиции, описанные в данном документе, могут быть в различных формах. К ним относятся, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, инъекционные и инфузионные растворы), дисперсии или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, липосомы и суппозитории.

Предпочтительная форма зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения.

[00254] В различных вариантах реализации изобретения лечение включает единичный болюс или повторное введение препарата ADC через приемлемый путь введения.

5 [00255] Пациенты могут быть оценены на уровне целевого антигена в данном образце (например, на уровне клеток, экспрессирующих целевой антиген), чтобы помочь в определении наиболее эффективного режима дозирования и тому подобного. Типовой вариант реализации изобретения представляет собой способ определения, будет ли
10 пациент реагировать на лечение ADC по данному изобретению, включая предоставление биологического образца от пациента и контактирование биологического образца с ADC. Типовые биологические образцы включают в себя ткань или биологическую жидкость, такую как воспалительный экссудат, кровь, сыворотку, кишечную жидкость, пробу фекалий или биопсию опухоли (например, биопсию опухоли, полученную от
15 пациента, имеющего или подверженного риску заболевания на рак, экспрессирующий целевой антиген, например, рак, экспрессирующий FRA, рак, экспрессирующий her2 или рак, экспрессирующий MSLN). В некоторых вариантах реализации изобретения образец (например, ткань и/или биологическая жидкость) может быть получен от субъекта, и подходящий иммунологический способ может быть применен для выявления и/или измерения экспрессии белка целевого антигена (например, FRA, her2 или MSLN).
20 Такие оценки также применяются с целью мониторинга во время терапии и полезны для оценки терапевтического успеха в сочетании с оценкой других параметров.

[00256] В некоторых вариантах реализации изобретения эффективность ADC может быть оценена путем контактирования образца опухоли из субъекта с ADC и оценки скорости роста или объема опухоли. В некоторых вариантах реализации изобретения,
25 в случае если определено, что ADC является эффективным, его можно вводить субъекту.

[00257] Вышеуказанные терапевтические подходы могут быть объединены с любым из множества разнообразных дополнительных хирургических, химиотерапевтических или лучевых курсами лечения.

[00258] Также в данном документе описано применение одного или более описанных
30 ADC при изготовлении лекарственного препарата для лечения рака, например, в соответствии со способами, описанными выше. В некоторых вариантах реализации изобретения, описанные в данном документе ADC применяются для лечения рака, например, в соответствии со способами, описанными выше.

[00259] В различных вариантах реализации изобретения наборы для применения в
35 лабораторных и терапевтических применениях, описанные в данном документе, входят в объем данного изобретения. Такие наборы могут содержать носитель, упаковку или контейнер, которые разделены на части чтобы вмещать один или более контейнеров, таких как флаконы, трубки и тому подобное, причем каждый из контейнеров содержит один из отдельных элементов, которые должны применяться в описанном в данном
40 документе способе, наряду с этикеткой или вкладышем, содержащей инструкции для применения, такие как применение, описанное в данном документе. Наборы могут содержать контейнер, содержащий фрагмент лекарственного средства. Данное описание также обеспечивает один или более ADC, или их фармацевтических композиций, упакованных в герметично закрытый контейнер, такой как ампула или фильтр-пакет,
45 с указанием количества агента.

[00260] Наборы могут содержать контейнер, описанный выше, и один или более других контейнеров, связанных с ним, которые содержат материалы, желательные с коммерческой и пользовательской точек зрения, включая буферы, разбавители, фильтры,

иглы, шприцы; носители, упаковки, контейнеры, флаконы и/или этикетки с надписью, и/или инструкции для применения, а также листки-вкладыши с инструкциями по применению.

[00261] Этикетка может присутствовать на контейнере или в нем для указания, что композиция применяется для конкретной терапии или нетерапевтического применения, такого как прогностическое, профилактическое, диагностическое или лабораторное применение. Этикетка может также указывать направления для применения *in vivo* или *in vitro*, такие как те, что описаны в данном документе. Указания и/или другая информация также могут быть указаны на вкладыше(шах) или этикетке(ках), которые включены в набор или находится на наборе. Этикетка может быть включена в контейнер или связана с контейнером. Этикетка может находиться на контейнере, когда буквы, цифры или другие символы, образующие этикетку, прессуются или вытравливаются на самом контейнере. Этикетка может быть связана с контейнером, в случае если она присутствует в емкости или носителе, которая также удерживает контейнер, например, в виде листа-вкладыша. Этикетка может указывать на то, что композиция применяется для диагностики или лечения состояния, такого как рак, описанный в данном документе.

[00262] Специалистам в данной области техники будет очевидно, что другие подходящие модификации и приспособления, описанных в данном документе способов изобретения очевидны, и могут быть сделаны с применением подходящих эквивалентов, не отступая от объема изобретения или описанных в данном документе вариантов реализации изобретения. Опираясь на подробное описание изобретения, оно будет более понятным со ссылкой на следующие примеры, которые включены исключительно в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения.

ПРИМЕР 1

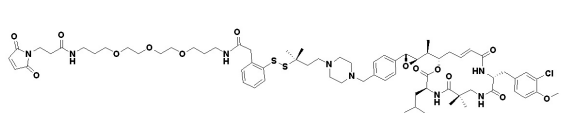
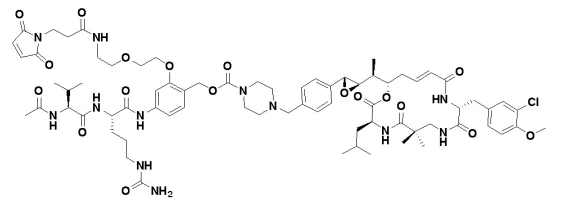
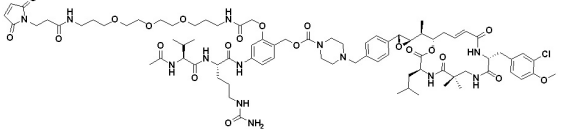
1. Материалы и способы

[00263] MORAb-003, применяемый для приготовления ADC, был из партии #AA0312.

1.1 Цитотоксины

[00264] Структуры конъюгируемых цитотоксинов приведены в Таблице 11.

Таблица 11. Конъюгируемые цитотоксины

Название соединения	Линкер	Цитотоксин	Расщепляемость	Структура
ПЭГ3-Bz-дисульфидил-диметил-криптофицин	малеими́до-ПЭГ3-Бензил-дисульфидил-диметил	криптофицин	есть	
LL2-криптофицин	LL2	криптофицин	есть	
LL3-криптофицин	LL3	криптофицин	есть	

	VCP-криптофицин	малеимидо-ПЭГ2-Val-Cit-pAB	криптофицин	есть	
5	VCP-эрибулин (ER-001159569)	малеимидо-ПЭГ2-Val-Cit-pAB	эрибулин	есть	
10	ER-001161318	малеимидо-(CH ₂) ₅ -Val-Cit-pAB	ER-001150828 (азиридин-майтансин-P3)	есть	
15	ER-001161319	малеимидо-ПЭГ2-Val-Cit-pAB	ER-001150828 (азиридин-майтансин-P3)	есть	
20					
25	ER-001159200	малеимидо-(CH ₂) ₅	майтансин DM1	нет	
30	M-MMAE	малеимидо-(CH ₂) ₅ -Val-Cit-pAB	монометилауристатин E	есть	
35	NHS-ПЭГ2-AuF	NHS-ПЭГ2	ауристатин F	нет	
40	M-DM1	SMCC	майтансин DM1	нет	
					Химия восстановленных дисульфидных мостиков
	M-0285	ПЭГ-pAB	дуостатин 3	есть	
45	M-0115	Asn-Ala	дуостатин-5	есть	
	M-172	циклогексил	дуостатин 3	нет	Химия восстановленного дисульфидного связывания

5	M-174	циклогексил	дуостатин 3	нет	Химия восстановленного дисульфидного связывания
	M-158	ПЭГ-рAB	дуостатин 10	есть	Химия восстановленного дисульфидного связывания
	M-0384	ПЭГ-тиозфир	дуостатин 14	нет	Химия восстановленного дисульфидного связывания
	M-0302	ПЭГ-Asn	дуостатин 14	нет	Химия восстановленного дисульфидного связывания
	M-292	ПЭГ-Asn	дуостатин 14	есть	Химия восстановленного дисульфидного связывания
10	M-0026	ПЭГ	дуостатин 14	есть	Химия восстановленного дисульфидного связывания
	M-0267	ПЭГ-тиозфир	дуомицин 7	нет	Химия восстановленного дисульфидного связывания
	M-0272	Asn-Ala	дуомицин 7	есть	Химия восстановленного дисульфидного связывания
	M-0260	ПЭГ-рAB	дуомицин 7	есть	Химия восстановленного дисульфидного связывания
	M-0276	Asn-Ala	дуомицин 7	есть	Химия восстановленного дисульфидного связывания
15	M-015-0913	циклогексил	дуостатин 3	нет	Ограниченное использование лизина
	M-030-0132	ПЭГ-рAB	дуостатин 6	есть	Ограниченное использование лизина
	M-0161	циклогексил	дуостатин 10	нет	Ограниченное использование лизина
	M-0157	ПЭГ-рAB	дуостатин 10	есть	Ограниченное использование лизина
	M-027-0381	тиозфир	дуостатин 14	нет	Ограниченное использование лизина
	M-0025	ПЭГ	дуостатин 14	нет	Ограниченное использование лизина
	M-0301	ПЭГ-Asn	дуостатин 14	нет	Ограниченное использование лизина
	M-030-0011	ПЭГ-рAB	дуостатин 14	есть	Ограниченное использование лизина
	M-030-0291	ПЭГ-Asn	дуостатин 14	есть	Ограниченное использование лизина
	M-0114	ПЭГ-рAB	дуостатин-5	есть	Химия восстановленных дисульфидных мостиков

Сокращения: Ala, аланин; Asn, аспарагин; Cit, цитруллин; NHS, N-гидроксисукцинимид; рAB, п-аминобензилоксикарбонил; ПЭГ, полиэтиленгликоль; SMCC, сукцинимидил-4-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилат; Val, валин; VCP, Val-Cit-рAB.

1.2 Конъюгация антитела-лекарственного средства

1.2.1 Частичное восстановление с помощью TCEP

[00265] Частично восстанавливающие условия для MORAb-003 были установлены путем изменения концентрации восстанавливающего агента трис (2-карбоксиэтил) фосфина (TCEP), не содержащего тиол, изменения концентрации антител и времени восстановления. Для MORAb-003 заменяли буфер на фосфатно-солевой буфер Дульбекко (DPBS), содержащий 1 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТК), затем концентрировали до 10 мг/мл, применяя центрифужную концентрацию с центрифужными фильтрами с границей отсечки 10 кДа по молекулярному весу задерживаемых компонентов (MWCO - molecular weight cut-off). Антитела разводили до соответствующей концентрации и добавляли TCEP в указанной конечной концентрации и легко перемешивали в течение 1 часа при комнатной температуре. TCEP удаляли путем обессоливания, применяя 5- или 10-миллилитровые вращающиеся колонки для обессоливания Zeba™ с DPBS/1 мМ ЭДТК в качестве буфера (Thermo Fisher, 40 кДа MWCO) в соответствии с протоколом производителя. Образцы анализировали на содержание свободных тиолов с помощью набора флуорометрического количественного определения тиола (Absam) в соответствии с протоколом производителя. Анализ ДСН-ПААГ-электрофореза в невосстанавливающих условиях проводили для определения степени и места разрыва дисульфидной связи, как описано в разделе 1. 3. 3. В некоторых случаях обессоленные мАт доводили до 1-2 мг/мл путем разбавления в DPBS и подвергали биотинилированию для определения способности конъюгировать и соотношения лекарственного средства-к-антителу (DAR). 10 мМ малеимидо-ПЭГ2-биотин (Thermo Fisher) в диметилсульфоксиде (ДМСО) добавляли к антителу (мАт) при молярном соотношении 10:1 и инкубировали при комнатной температуре в течение 4 часов при легком перемешивании. После конъюгации непрореагировавшее соединение удаляли путем обессоливания с применением вращающихся колонок для обессоливания Zeba™ (Thermo Fisher). Затем образцы анализировали с помощью ЖХ-МС для

определения DAR, как описано в разделе 1. 3. 4.

1.2.2 Конъюгация цитотоксинов

[00266] Частично восстановленное антитело доводили до 2,5 мг/мл в 0,5X DPBS, 0,5 мМ ЭДТК и тщательно перемешивали. Затем, если их применяли, добавляли органические сорастворители и тщательно перемешивали. В качестве сорастворителей использовали пропиленгликоль (конечная концентрация 20% и 50%), диметилсульфоксид (ДМСО) (10%), N,N-диметилформамид (20%), N,N-диметилацетамид (20%) и N,N-диметилпропионамид (20%). Малеимид-модифицированный цитотоксин (6 мМ исходный раствор в ДМСО) добавляли к антителам при молярном соотношении 1:6 (мАт: соединение) и тщательно перемешивали. Конъюгация продолжалась при комнатной температуре в течение 3,5 часов при легком перемешивании. 50% пропиленгликоль при 50% был выбран в качестве конечного органического модификатора и применялся во всех последующих реакциях конъюгации.

1.2.3 Очистка

[00267] Конъюгированное антитело очищали с помощью колонки(ок) для обессоливания 26/10 HiTrap® (GE Healthcare) с хроматографией, выполненной на жидкостной экспресс-хроматографии белков (ЖЭХБ) (GE Healthcare), для удаления непрореагировавшего малеимида-цитотоксина и пропиленгликоля. ADC MORAb-003, включая MORAb-003-mal-VCP-эрибулин (MORAb-202), были приготовлены в DPBS (буфер для составов применяли в качестве подвижного буфера во время ЖЭХБ-хроматографии).

1.3 Биофизическая характеристика

1.3.1 Анализ БХК

[00268] Готовый реагент (200 мкл) бицинхониновой кислоты (БХК) добавляли к 25 мкл серийно разведенных ADC или к 2 мг/мл стандарта бычьего гамма-глобина (Thermo Fisher), и образцы тщательно перемешивали. Образцы инкубировали при 37°C в течение 20 мин. Планшеты считывали при 595 нм на планшет-ридере SpectraMax® M5 (Molecular Devices). Данные анализировали с помощью SoftMax® Pro (версия 3. 2) с моделью 4-параметрической подгонки.

1.3.2 Анализ эксклюзионной ВЭЖХ

[00269] Агрегацию антител анализировали с помощью эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (эксклюзионной ВЭЖХ) с применением Agilent 1100. мАт разбавляли до 1 мг/мл в DPBS. Антитело (20 мкл) вводили в защитную колонку TSKgel® SuperSW (4,6 мм×3,5 см, размер пор 4 мкм, Tosoh Bioscience), а затем в колонку TSKgel® SuperSW3000 (4,6 мм×30 см, размер пор 4 мкм), элюировали из колонки 0,1 М фосфатом натрия, содержащим 0,15 М NaCl и 0,05% NaN₃, при pH 7,4 при скорости потока 0,3 мл/мин в течение 20 мин. Все данные были проанализированы с применением программного обеспечения Agilent ChemStation. Процент агрегации рассчитывался как $[PA_{\text{агрегата}}/PA_{\text{общий}}]*100$, где PA=интегрированная площадь пика.

1.3.3 Анализ ДСН-ПААГ-электрофореза

[00270] Образцы белка (0,1-10 мкг) доводили до 1X буфером для образцов, содержащим додецилсульфата лития (ДСЛ). Для невосстановленных образцов инкубацию проводили при комнатной температуре в течение 10 мин перед электрофорезом. Для восстановленных образцов добавляли дитиотреитол (ДТТ) до конечной концентрации 20 мМ и образцы нагревали до 95°C в течение 10 мин и помещали на лед перед электрофорезом. Образцы загружали в 10-, 12- или 15-луночные гели Бис-Трис для ДСН-ПААГ-электрофореза (Thermo Fisher) с 1X МОПС или 1X МЭС в качестве электродного буфера. Электрофорез проводили при 185 В (постоянное

напряжение) в течение 1 часа. Гели окрашивали красящим раствором InstantBlue (Expedeon) и обесцвечивали в воде. Документацию выполняли в системе документирования гелей UltraLum с применением оранжевых фильтров с длиной волны 600 нм.

1.3.4 Анализ СВЭЖХ/ЭРИ-МС соотношения лекарственного средства-к-антителу (DAR)

[00271] ADC были дегликозилированы, применяя PNGазы F (New England BioLabs). Буфер G7 (10 мкл) и PNGаза F (2 мкл) добавляли к мАт (90 мкл, 1 мг/мл в DPBS). Реакцию инкубировали в микроволновой печи (СЕМ) Discover в течении двух циклов (1) микроволновая мощность 10 Вт, 37°C, 10 мин, далее следует 5-минутная пауза; (2) микроволновая мощность 2 Вт, 37°C, 10 мин. Часть образца восстанавливали с помощью добавления ДТТ до конечной концентрации 20 мМ с последующей инкубацией при 60°C в течение 3 мин. Затем образцы анализировали, применяя сверхвысокоэффективную жидкостную хроматографию (СВЭЖХ) Waters Acquity и квадрупольную время-пролетную (Q-ToF - quadrupole time of flight) масс-спектрометрию Premier. Образцы (0,5-2 мкг каждого) вводили в микроколону для обессоливания MassPrep™ при 65°C, элюировали из колонки с 5-минутным уравниванием в 95% подвижной фазы А, 10-минутным градиентом (5-90% В), и 10-минутным повторным уравниванием в 95% подвижной фазы А при 0,05 мл/мин. Подвижная фаза А составляла 0,1% муравьиной кислоты в воде. Подвижная фаза В составляла 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле. Масс-спектрометр Q-ToF работал в V-режиме определения положительных ионов с детектированием в диапазоне 500-4000 м/з. Параметры источника были следующими: капиллярное напряжение, 2,25 кВ (интактное антитело)-2,50 кВ (восстановленное антитело); напряжение пробоотборного конуса, 65,0 В (интактное антитело) или 50,0 В (восстановленное антитело); температура источника, 100°C; температура десольватации, 250°C; поток газа десольватации, 550 л/час. Пик белка деконволюционировали с применением функции MassLynx® MaxEnt 1. Относительные интенсивности масс каждой неконъюгированной, однократно-конъюгированной и многократно-конъюгированной тяжелой и легкой цепи объединяли для расчета общего DAR по формуле:

$$\frac{2[I_{LC+1}+2(I_{LC+2})+3(I_{LC+3})+\dots n(I_{LC+n})]/\Sigma I_{LC\text{общ}}+2[I_{HC+1}+2(I_{HC+2})+3(I_{HC+3})+\dots n(I_{HC+n})]}{\Sigma I_{HC\text{общ}}}$$

где I_{LC+1} является массовой интенсивностью легкой цепи, конъюгированной с одним цитотоксином, I_{LC+2} является массовой интенсивностью легкой цепи, конъюгированной с двумя цитотоксинами, и так далее. I_{HC} представляют собой интенсивности соответствующих конъюгированных тяжелых цепей и $\Sigma I_{LC\text{общ}}$ и $\Sigma I_{HC\text{общ}}$ представляют собой объединенные интенсивности всех неконъюгированных и конъюгированных легких цепей и тяжелых цепей соответственно.

1.3.5 НИС-ВЭЖХ анализ DAR

[00272] В дополнение к анализу DAR с помощью анализа СВЭЖХ/электрораспылительной ионизации (ЭРИ)-МС, DAR MORAb-003-всп-эрибулин и DAR MORAb-003-0285 также анализировали с применением ВЭЖХ с гидрофобным взаимодействием (НИС-ВЭЖХ). Образцы вводили в TSKgel® Ether-5 PW, 7,5 мм ID x 7,5 см, размер пор 10 мкм, и элюировали из колонки с 3-минутным уравниванием в 100% подвижной фазы А, 15-минутным градиентом (0-100% В), 5-минутным выдерживанием в 100% В, 1-минутной заменой на 100% А и 5-минутным повторным уравниванием в 100% подвижной фазы А при 0,7 мл/мин. Подвижная фаза А

составляла 25 мМ фосфата натрия, 1,5 М сульфата аммония, pH 7,0. Подвижная фаза В составляла 25 мМ фосфата натрия, 25% изопропанола, pH 7,0. Детекцию проводили при 280 нм (контроль 320 нм). DAR определяли по формуле:

$$[AUC_{+1} + 2(AUC_{+2}) + 3(AUC_{+3}) + \dots + n(AUC_{+n})] / \Sigma AUC_{\text{общ}}$$

где AUC_{+1} является площадью под кривой для пика мАт, соответствующего ADC, конъюгированному с одним цитотоксином, AUC_{+2} является площадью под кривой для пика мАт, соответствующего ADC, конъюгированному с двумя цитотоксинами, и так далее. $\Sigma AUC_{\text{общ}}$ представляет собой объединенную площадь под кривой для всех пиков.

1.4 Анализ цитотоксичности

1.4.1 Анализ окрашивания кристаллическим фиолетовым

[00273] Клетки IGROV1 (FR^{hi}) и SJSA-1 (FR^{neg}) субкультивировали и высевали при 10000 клеток/лунку в готовую питательную среду в 96-луночных планшетах для культивирования тканей, инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение ночи (16 часов).

Как правило, реагенты для испытания серийно разводили 1:4 в планшетах для разведения с 2-миллилитровыми глубокими лунками, начиная с 1 мкМ (всего 10 разведений). 100 мкл разбавленных образцов добавляли к клеточным планшетам (при начальной концентрации образцов для испытания 500 нМ). Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение дополнительных 48 часов. Среду удаляли, планшеты промывали один раз 200 мкл DPBS, окрашивали 50 мкл 0,2% раствора кристаллического фиолетового при комнатной температуре в течение 15 мин и затем тщательно промывали водопроводной водой. Планшеты сушили на воздухе, а кристаллический фиолетовый растворяли с 200 мкл 1% раствора ДСН. Планшеты считывали при 570 нм. Данные анализировали с применением GraphPad Prism 6. Анализы проводили, применяя плотности посева 1000 клеток на лунку, а воздействие соединения составляло в общей сложности 5 дней. Когда требовалось более короткое воздействие, через 4 часа удаляли среду, содержащую цитотоксические агенты, и заменяли свежей питательной средой перед 5-дневной инкубацией. Для OVCAR3, CaOV3 и NCI-H2110, клетки высевали при 3000 клеток/лунку и инкубировали в течение 5 дней с ADC. Для конкурентных экспериментов титруемые ADC предварительно инкубировали с 2 мкМ (конечная) неконъюгированного MORAb-003 перед инкубацией с клетками.

1.4.2 Анализ неспецифического цитолиза

[00274] За день до начала исследования клетки IGROV1 Nuclight™ Green (NLG) высевали при 5000 клеток/лунку в 96-луночные круглодонные планшеты с последующим центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3 мин при комнатной температуре для обеспечения образования клеточного осадка. Планшет помещали в резервуар в Incucyte Zoom® (EssenBio science) и инкубировали при 37°C/5% CO₂ в течение ночи. Программа была настроена каждые два часа собирать изображения роста клеток и определять общее количество клеток с окрашенными в зеленый цвет ядрами и окрашенными в красный цвет ядрами, а также фазу и конфлюентность клеток. В день эксперимента ADC MORAb-003 или чистое лекарственное средство разбавляли в полной среде RPMI и серийно разводили, начиная с 400 нМ. 50 мкл раствора цитотоксина добавляли к клеткам NLG-IGROV1 и инкубировали в течение 30 мин. В течение инкубационного периода клетки HL-60 (FR^{neg}) Nuclight™ Red (NLR) разбавляли свежей средой до 2×10^5 , 1×10^5 или 5×10^4 клеток/мл. В лунки с NLG-IGROV1 добавляли 50 мкл суспензии клеток NLR-HL60 или отдельно среды с последующим центрифугированием при 1000 об/мин в течение 3 мин при комнатной температуре для обеспечения повторного образования

клеточного осадка. Планшет помещали обратно в резервуар в Incucyte Zoom (EssenBio science) и инкубировали при 37°C/5% CO₂ в течение 5 дней. Относительный рост клеток NLG-IGROV1 определяли, применяя подсчет зеленых клеток, путем сравнения с образцами без ADC или образцами, к которым добавили отдельно чистое лекарственное средство. Относительный рост клеток HL60 определяли аналогичным образом, за исключением того, что определяли количество красных клеток. Определение значений ИК₅₀ для NLG-IGROV1 и NLR-HL-60 определялось с помощью Prism (GraphPad).

1.4.3 Анализ стабильности сыворотки

[00275] 20 мкл ADC MORAb-003 тщательно смешивали с 80 мкл DPBS, нормальной объединенной сывороткой человека (Bioreclamation, партия BRH552911) или нормальной объединенной сывороткой мыши (Bioreclamation, партия MSE152591) и инкубировали при 37°C в течение 0, 4, 24 и 48 часов. После инкубации образцы замораживали и хранили при -20°C до оценивания в анализах цитотоксичности и связывания. Для анализа цитотоксичности образцы оценивали на клетках IGROV1 и SJSA-1, как описано в разделе 1.4.1. Для оценки связывания образцы оценивали, применяя анализ MSD ECL на основе раствора. Образцы инкубировали с биотинилированным рецептором фолиевой кислоты альфа и сульфо-меткой к MORAb-003 перед улавливанием на стрептавидин в планшете и детектировали с применением электрохемилюминесценции с помощью устройства MSD Sector Imager 2400.

2. Результаты

2.1 Приготовление ADC MORAb-003

[00276] Чтобы выбрать лучшую комбинацию линкера и цитотоксина для конъюгации с MORAb-003, ADC были подготовлены с помощью трех методик. В соответствии со стратегией конъюгации, изображенной на Фиг. 1, неспаренные цистеины образуются путем частичного восстановления с ограниченными молярными эквивалентами восстанавливающего агента TCEP, не содержащего тиол. Эта стратегия предпочтительно уменьшает межцепочечные дисульфидные связи, которые связывают легкую цепь и тяжелую цепь (по одной паре на спаривание H-L) и две тяжелые цепи в шарнирной области (две пары на спаривание H-H в случае IgG1 человека), оставляя внутрицепочечные дисульфидные связи интактными.

[00277] Вторая стратегия конъюгации для получения ADC MORAb-003 использовала химию восстановленных дисульфидных мостиков. Химия восстановленных дисульфидных мостиков перестраивает мостики свободных тиолов цистеиновых остатков, освобождаемых в процессе частичного восстановления, имитируя роль дисульфидной связи и тем самым сохраняя стабильность и функцию ADC.

[00278] В третьей стратегии конъюгации для получения ADC MORAb-003 применяли ограниченное использование лизина. Ограниченное использование лизина приводит к конъюгации очень ограниченного количества вычисленных 70+ гидрофильных лизинов, доступных на типичной молекуле человеческого IgG и потенциально может давать смеси продуктов ADC с более низкой гомогенностью по сравнению со стратегиями, включающими модификацию цистеина.

2.1.1 Приготовление VCP-эрибулина для ADC MORAb-003

[00279] Эрибулин (1) (10 мг, 14 мкмоль) (Фиг. 2) растворяли в N,N-диметилформамиде (ДМФА) (1мл) и хорошо перемешивали. Добавляли N,N-диизопропилэтиламин (основание Хунига или iPr₂NEt) (3,6 мкл, 21 мкмоль) и Фмок-Val-Cit-пара-аминобензил-пара-нитрофенол (Фмок-VCP-PNP) (2) (16 мг, 21 мкмоль, Concortis Biosystems, cat# VC1003). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4-

16 часов, отслеживали с помощью набора для нингидриновой реакции (Anaspec, cat# 25241) до тех пор, пока реакция не была завершена. Затем в реакционную смесь добавляли диэтиламин (Et_2NH) (0,014 мл, 0,14 мкмоль), перемешивали в течение 2 часов при 18-25°C для удаления защитной группы Фмок. Реакцию отслеживали с помощью набора для нингидриновой реакции. По окончании, растворитель выпаривали под вакуумом чтобы получить неочищенный VCP-эрибулин (3) (16 мг), очищали с применением колонки ZOBAX SB-C18 (размер пор 5 мкм, 9,4×150 мм) в системе ВЭЖХ Waters Alliance e2695 в подвижной фазе $\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN}$, содержащей 0,1% муравьиной кислоты, через градиент В 15-70%. VCP-эрибулин (3) (16 мг) растворяли в ДМФА (1 мл). Основание Хунига (7,2 мкл, 41 мкмоль) и малеимид-ПЭГ₂-NHS (4) (9,7 мг, 27 мкмоль) добавляли. Реакционную смесь перемешивали при 18-25°C в течение 3 часов. Реакционную смесь очищали с помощью ВЭЖХ ($\text{H}_2\text{O}-\text{CH}_3\text{CN}$), содержащей 0,1% муравьиной кислоты) через градиент В 15-70%. Растворитель удаляли путем лиофилизации, чтобы получить mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-п-аминобензилоксикарбонил (pAB)-эрибулин (mal-(ПЭГ)₂-VCP-эрибулин) (5).

2. 1. 2 Оптимизация условий восстановления

[00280] ADC MORAb-003 получали путем образования неспаренных цистеинов вследствие частичного восстановления с ограниченными молярными эквивалентами восстанавливающего агента трис(2-карбоксиэтил)фосфина (ТСЕР). Первоначальное исследование было выполнено на MORAb-003, в котором варьировались концентрация антитела, концентрация ТСЕР и время инкубации, с целью создания в среднем 4 конъюгируемых сайтов на молекулу антитела. Количество сайтов свободных тиолов определяли с помощью анализа флуорометрического количественного определения тиола. Результаты этого анализа приведены в таблице 12. Степень разрушения связей Н-Н и Н-L после 10 мин, 30 мин, 60 мин или 120 мин инкубации также анализировали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза (Фиг. 3). Для этого анализа невосстановленные и восстановленные образцы загружали на гель для ДСН-ПААГ-электрофореза, и электрофорез проводили при 185 В в течение 1 часа. На Фиг. 3 дорожка М соответствует стандартному белку. Дорожка 1 соответствует необработанному, невосстановленному MORAb-003. Дорожка 2 соответствует MORAb-003 (5,3 мг/мл), восстановленному в 70,6 мкМ ТСЕР. Дорожка 3 соответствует MORAb-003 (5,3 мг/мл), восстановленному в 141,2 мкМ ТСЕР. Дорожка 4 соответствует MORAb-003 (1,5 мг/мл), восстановленному в 20 мкМ ТСЕР. Дорожка 5 соответствует MORAb-003 (1,5 мг/мл), восстановленному в 40 мкМ ТСЕР. Идентичности каждой полосы указаны на нижнем правом геле. "Н" обозначает тяжелую цепь, тогда как "L" обозначает легкую цепь.

Таблица 12. Оптимизация условий восстановления MORAb-003

		10 мин		30 мин		60 мин		120 мин	
концентрация MORAb-003 мкМ (мг/мл)	концентрация ТСЕР мкМ	Свободные тиолы мкМ	Восстановленные дисульфидные связи на мАт	Свободные тиолы мкМ	Восстановленные дисульфидные связи на мАт	Свободные тиолы мкМ	Восстановленные дисульфидные связи на мАт	Свободные тиолы мкМ	Восстановленные дисульфидные связи на мАт
35,3 (5,3)	70,6	215	3,0	247,5	3,5	297,6	4,2	266,8	3,8
35,3 (5,3)	141,2	339	4,8	372,8	5,3	384,2	5,4	479,8	6,8
10 (1,5)	20	13,3	0,7	14,7	0,7	15,2	0,8	14,6	0,7
10 (1,5)	40	21,8	1,1	25,6	1,3	26,9	1,3	27,4	1,4

[00281] Анализ ДСН-ПААГ-электрофореза и содержания тиола показал, что 60-минутная инкубация 5,3 мг/мл мАт при 4-кратном молярном соотношении ТСЕР к мАт обеспечивала удовлетворительное исходное положение, поскольку, как представляется,

присутствовало ограниченное восстановление внутримолекулярных дисульфидов (что определено по содержанию свободного тиола) и оставалось очень мало невосстановленных мАт (невосстановленное мАт будет действовать как конкурентный ингибитор в исследованиях *in vitro* и *in vivo* при применении приготовленных ADC).

5 Дальнейшие исследования проводились с MORAb-003 при начальных концентрациях 5,0 мг/мл для подтверждения данного оптимизированного молярного соотношения ТСЕР к мАт с применением анализа ДСН-ПААГ-электрофореза (Фиг. 4). На Фиг. 4 дорожка 1 соответствует стандартному белку. Дорожка 2 соответствует необработанному, невосстановленному MORAb-003. Дорожка 3 соответствует MORAb-
10 003, обработанному в соотношении 1:1 MORAb-003:ТСЕР. Дорожка 4 соответствует MORAb-003, обработанному в соотношении 1:2 MORAb-003:ТСЕР. Дорожка 5 соответствует MORAb-003, обработанному в соотношении 1:3 MORAb-003:ТСЕР. Дорожка 6 соответствует MORAb-003, обработанному в соотношении 1:4 MORAb-003:ТСЕР. Также следом за восстановлением и удалением ТСЕР проводили конъюгацию с
15 применением малеимидо-ПЭГ2-биотина для того, чтобы стимулировать конъюгацию цитотоксина для приготовления ADC. Анализ DAR проводили, применяя ЖХ-МС. Результаты этих исследований приведены в таблице 13.

Таблица 13. Оптимизация условий восстановления MORAb-003 - уровни конъюгации с малеимидо-ПЭГ2-биотином

20

ТСЕР		MORAb-003		
ТСЕР:мАт	ТСЕР (мкМ)	LC	HC	DAR
1	33,3	0,29	0,34	1,26
2	66,7	0,48	0,83	2,62
3	100	0,63	1,21	3,68
25 4	133,2	0,73	1,70	4,86

LC, уровень биотина легкой цепи; HC, уровень биотина тяжелой цепи; DAR, биотин на мАт [DAR=2(LC)+2(HC)].

[00282] После конъюгации биотина анализ свободных тиолов показал, что в MORAb-
30 003-биотине нет свободных тиолов. Это указывало на то, что после восстановления дисульфидных связей конъюгация обычно происходила как при образовании тиолов, так и в результате того, что любые неконъюгированные, восстановленные дисульфиды подвергались повторному окислению для переобразования дисульфидных связей. Конечными условиями, выбранными для восстановления для генерации ADC, были
35 концентрация антитела 5,0 мг/мл, концентрация ТСЕР 110 мкМ и время инкубации 60 мин. Это приводит к мАт с DAR 4 после конъюгации.

2.1.3 Оптимизация конъюгации ADC

[00283] В качестве первого цитотоксина, применяемого для приготовления ADC, применяли криптофицин, который представляет собой гидрофобное соединение, эксперименты по оптимизации начальной конъюгации проводили с помощью
40 "суррогатного" антитела к мезотелину человека, имеющего два непарных цистеина, доступных для конъюгации (по одному на легкую цепь) в определенных положениях. Это значительно облегчает анализ эффективности конъюгации с помощью масс-спектрометрии, поскольку нужно анализировать только легкую цепь. Затем проводили титрование пропиленгликоля во время конъюгации малеимидо-LL3-криптофицина с
45 суррогатным антителом с последующим анализом эффективности конъюгации легкой цепи с помощью ЖХ-МС (таблица 14).

Таблица 14. Оптимизация концентрации пропиленгликоля в реакции конъюгации

Пропиленгликоль (%)	Конъюгированная LC Ab (%)
0	8%
20	48%
50	100%

Массы LC: неконъюгированная, 23536 Да; конъюгированная, 24367 Да.

[00284] 50% пропиленгликоль приводил к полному заполнению доступных сайтов и был выбран в качестве конечной концентрации для применения. После конъюгации не наблюдалось потери связывания мАт (данные не показаны), что указывает на то, что пропиленгликоль не оказывал вредного воздействия на антитело. Таким образом, выбранные конечные условия реакции конъюгации составляли 2,5 мг/мл конечной концентрации мАт, 6:1 молярное соотношение малеими́до-линкер-цитотоксин:мАт в 0,5X DPBS (конечная концентрация после добавления пропиленгликоля), 0,5 mM ЭДТК, 50% пропиленгликоля, pH 7,2, в течение 3,5-4 часов при комнатной температуре. В этих реакциях перед добавлением малеими́до-линкер-цитотоксина добавляют

пропиленгликоль.

2.1.4 Приготовление ADC и биофизическая характеристика

[00285] Установленные условия восстановления и конъюгации, описанные в разделе 2. 1. 2, были применены для приготовления первых 10 ADC MORAb-003, перечисленных в таблице 15. Остальные ADC, за исключением М-ММАЕ и М-DM1, были приготовлены с помощью либо восстановленных дисульфидных мостиков, либо ограниченного использования лизина. М-ММАЕ и М-DM1 были приготовлены компанией Concoctis Biosystems, Inc. и получены в конъюгированной форме.

[00286] Химия восстановленных дисульфидных мостиков строит мостики по свободным тиолам, образующимся в процессе частичного восстановления, давая один цитотоксин на восстановленный дисульфид. Согласно теории, антитело с DAR=4 будет иметь перестроенные дисульфидные мостики в H-L и шарнире, придавая ADC повышенную стабильность и однородность по сравнению с традиционными подходами конъюгации. Ограниченное использование лизина приводит к конъюгации очень ограниченного количества вычисленных 70+ гидрофильных лизинов, доступных на типичной молекуле человеческого IgG. Конъюгаты MORAb-003, приготовленные с применением данного способа, приводили к 2,0 DAR, что указывало на то, что на пару H-L был использован один лизин.

[00287] Все ADC очищали путем хроматографии с обессоливанием HiPrep 26/10 и составляли в DPBS. Анализ DAR проводили на всех приготовленных ADC с помощью ЖХ-МС и уровни агрегации определяли с помощью эксклюзионной ВЭЖХ. Результаты данных анализов DAR и агрегации перечислены в таблице 15 рядом с соответствующим ADC.

Таблица 15. Биофизический анализ ADC MORAb-003

	Название соединения	DAR	Агрегация (%)
1	ПЭГ3-Vz-дисульфидил-диметил-криптофидин	3,7-3,9	29
2	LL2-криптофидин	3,2	18-36
3	LL3-криптофидин	3,2-3,7	22-36
4	VCP-криптофидин	3,4	50
5	VCP-эрибулин	3,6	0-2,6
6	ER-001161318	3,5	3,2
7	ER-001161319	3,5	3,1
8	ER-001159200	2,8	
9	М-ММАЕ	4,0	2
10	NHS-ПЭГ2-AuF	5,0	

11	M-DM1	3,6	1,8
12	M-0285	4,0	1,2
13	M-0115	4,0	0,4
14	M-172	3,1	3,6
15	M-174	2,8	4,4
16	M-158	4,5	3,8
17	M-0384	4,2	4,2
18	M-0302	4,3	3,3
19	M-292	4,0	4,5
20	M-0026	4,2	3,3
21	M-0267	4,0	2,9
22	M-0272	3,3	1,5
23	M-0260	3,2	1
24	M-0276	4,6	6,2
25	M-015-0913	2,0	<1
26	M-030-0132	2,0	<1
27	M-0161	2,1	2,4
28	M-0157	2,0	<1
29	M-027-0381	2,0	<1
30	M-0025	2,0	1,7
31	M-0301	2,0	1,4
32	M-030-0011	2,0	<1
33	M-030-0291	2,0	<1
34	M-0255	3,6	5,9
35	M-0114	4,0	3,9

[00288] Значения DAR для всех ADC находились в предварительно определенном диапазоне (DAR между 3 и 4). Уровни агрегатов для ADC на основе криптофицина были значительно выше желаемого (>10%), тогда как малеими́до-линкер-цитотоксины на основе эрибулина (VCP-эрибулин) и на основе майтансина (ER-001161318, ER-001161319 и M-MMAE) демонстрировали приемлемые уровни агрегатов. Исследование других органических сорастворителей проводили на реакциях конъюгации MORAb-003 с применением VCP-криптофицина. Испытанными сорастворителями были ДМСО (10%), N,N-диметилформамид (20%), N,N-диметилацетамид (20%) и N,N-диметилпропионамид (20%). Уровни агрегатов после конъюгации с применением этих сорастворителей были равными или превышали уровни для 50% пропиленгликоля.

[00289] Анализ невосстанавливающего ДСН-ПААГ-электрофореза был выполнен на подмножестве ADC (Фиг. 5). Поскольку DAR для всех этих ADC было определено как 4, считалось, что эти ADC должны мигрировать как интактный IgG ~ 160 кДа, так как дисульфидные мостики должны быть перестроены в обоих H-L и обоих шарнирах. Это подмножество ADC включает в себя M-MMAE (дорожка 2), M-DM1 (дорожка 3), M-0026 (дорожка 4), M-0260 (дорожка 5), M-0267 (дорожка 6), M-0272 (дорожка 7), M-0285 (дорожка 8), M-292 (дорожка 9), M-027-0381 (дорожка 10) и M-0384 (дорожка 11) (Фиг. 5). На Фиг. 5 дорожка 1 соответствует стандартному белку.

[00290] Из этого анализа ясно, что, для ADC, созданных способом химии восстановленных дисульфидных мостиков (дорожки 4-9, 11), в дополнение к интактному ADC, имеются значительные моновалентные виды H-L (80 кДа). Это указывает на то, что, в дополнение к образованию межцепочечных мостиков в шарнире, имеется значительное образование внутрицепочечных дисульфидных мостиков в шарнире. Анализ эксклюзионной ВЭЖХ показывает, что ADC мигрируют как один интактный IgG, что указывает на то, что для этих ADC с образованными внутрицепочечными H-H мостиками тяжелые цепи ассоциированы нековалентно в конечном ADC.

2.2 Анализ in vitro активности ADC MORAb-003

2.2.1 Цитотоксичность на клетках IGROV1 и SJSA-1

[00291] Активностьприготовленных ADC in vitro оценивали с помощью анализа окрашивания кристаллическим фиолетовым, как подробно описано в разделе 1. 4. 1.

[00292] Первоначальный скрининг всех ADC MORAb-003 выполняли на клетках IGROV1 (FR^{hi(+++)}) и SJSA-1 (FR^{neg(-)}). Клетки IGROV1 имеют происхождение эпителиальной карциномы яичников человека и экспрессируют высокие уровни рецептора фолиевой кислоты альфа (FR), целевого антигена MORAb-003. Клетки SJSA-1 представляют собой линию опухолевых клеток остеосаркомы человека, у которых отсутствует рецептор фолиевой кислоты альфа. Скрининг выбранных ADC также выполнялся на клетках CaOV3 (карцинома яичника человека, FR^{med(++)}), NCI-H2110 (немелкоклеточная карцинома легких человека, FR^{med(++)}) и/или OVCAR3 (карцинома яичника человека, FR^{med(++)}). Результаты этого скрининга приведены в таблице 16.

Таблица 16. Скрининг цитотоксичности (ИК₅₀) ADC MORAb-003 на различных линиях опухолевых клеток

Название соединения	IGROV1	SJSA-1	CaOV3	NCI-H2110	OVCAR3
ПЭГ3-Bz-дисульфидил-диметил-криптофицин	0,067	0,41			
LL2-криптофицин	0,023	4,7	0,33		
LL3-криптофицин	0,086	12,7	0,19		0,094
VCP-криптофицин	0,03	~100	0,02		
VCP-эрибулин	0,054	>100	3,7	0,73	0,16
ER-001161318	0,26	>100	3,1		
ER-001161319	0,49	>100	11,3		
ER-001159200	6,5	>100	9,2		
M-MMAE	0,2	253			
NHS-ПЭГ2-AuF	0,2	>500			
M-DM1	55	132			
M-0285	0,3	>100		14	8,8
M-0115	0,54	>100			
M-172	>500	>500			
M-174	>500	>500			
M-158	>500	>500			
M-0384	2,25	2,45			
M-0302	330	>500			
M-292	1,7	>500			
M-0026	1,38	540			
M-0267	0,029	0,028			
M-0272	0,252	1,02			
M-0260	0,383	0,036			
M-0276	0,43	30			
M-015-0913	>500	>500			
M-030-0132	>500	17,3			
M-0161	>500	>500			
M-0157	>500	>500			
M-027-0381	14,5	28			
M-0025	>500	>500			
M-0301	>500	>500			
M-030-0011	61,6	>500			
M-030-0291	>500	105			
M-0255	0,12	0,46			
M-0114	144	>100			

Все значения представлены ИК₅₀ в нМ и являются средними значениями выполненных повторных экспериментов.

[00293] ADC VCP-эрибулин был эффективным (54 пМ) на клетках IGROV1 и оказывал низкое уничтожение клеток SJSA-1. Для этих клеточных линий ADC VCP-эрибулин демонстрировал более высокую активность и специфичность по сравнению с ADC с эквивалентными значениями DAR, такими как М-ММАЕ и М-DM1. ADC VCP-эрибулин также демонстрировал высокую цитотоксичность на дополнительных линиях опухолевых клеток, экспрессирующих FR, происходящих из яичника (CaOV3 и OVCAR3) и немелкоклеточной карциномы легких (NC-H2110).

[00294] ADC VCP-эрибулина, LL2-криптофицина, LL3-криптофицина, VCP-криптофицина, ER-001161318, ER-001161319 и ER-001159200 показали специфическую цитотоксичность ($> 2\text{-log}$ специфичности) на клетках CaOV3 (FR^{med(++)}). Множество этих ADC проявили субнаномолярную активность. Конъюгаты криптофицина также демонстрировали высокие уровни активности (23 пМ - 86 пМ) на клетках IGROV1, но, за исключением VCP-криптофицина, также демонстрировали заметную цитотоксичность на клетках SJSA-1. Расщепляемые конъюгаты майтансина ER-001161318 и ER-001161319 проявляли промежуточную активность на клетках IGROV1 (0,26 нМ и 0,49 нМ) и незначительное нецелевое уничтожение клеток SJSA-1.

[00295] Все конъюгаты, полученные путем ограниченного использования лизина, не демонстрировали никакой специфичности и далее не оценивались. Все расщепляемые конъюгаты, приготовленные с помощью технологии восстановленных дисульфидных мостиков дуостаз-3 (М-0285), дуостатина-5 (М-0115) и дуостатина-14 (М-292 и М-0026) демонстрировали специфическую цитотоксичность на клеточной линии IGROV1, незначительную цитотоксичность на клеточной линии SJSA-1. Конъюгаты дуостатина-3 и дуостатина-5, производные ауристатина, имели немного более высокую активность, чем конъюгаты дуостатина-14, который является производным майтансина. Эффективности и специфичности были сопоставимы с контрольным конъюгатом М-ММАЕ, который применяет линкер Val-Cit-pAB (VCP), присоединенный к монометилу Е. Все нерасщепляемые конъюгаты, приготовленные с помощью химии восстановленных дисульфидов, не обладали достаточной активностью или специфичностью, и далее не анализировались.

2.2.2. Цитотоксичность на клеточной линии рака яичника человека CaOV3, экспрессирующей рецептор фолиевой кислоты

[00296] Активность выбранных ADC MORAb-003 также определяли на линиях опухолевых клеток яичника человека OVCAR3 и CaOV3, а также на клеточной линии HMPЛ человека NCI-H2110 (таблица 16). На клеточной линии яичника человека CaOV3 конъюгаты криптофицина демонстрировали заметно более высокую активность, чем конъюгат VCP-эрибулин, в отличие от наблюдаемых на клетках IGROV1. Это может быть связано с более низким уровнем экспрессии рецептора фолиевой кислоты альфа в клетках CaOV3 по сравнению с IGROV1 или с более высокой активностью криптофицина в этих клетках по сравнению с эрибулином. Конъюгаты на основе майтансина ER-001161318, ER-001161319 и ER-001159200 все показывали эффективности подобные или более низкие, чем VCP-эрибулин.

2.3 Неспецифический цитолиз VCP-эрибулина, ER-001161318 и М-0285

[00297] Чтобы оценить активность неспецифического цитолиза, анализ был настроен с применением двух меченных клеточных линий. В этом анализе клетки IGROV1 (FR^{hi}), меченные Nuclight™ Green, и HL-60 (FR^{neg}), меченные Nuclight™ Red, совместно

культивировали в разных соотношениях количества клеток и обрабатывали титрами ADC MORAb-003 VCP-эрибулином, ER-001161318 или M-0285. VCP-эрибулин представляет собой ADC, приготовленный на основе эрибулина, содержащий

представляемый линкер малеимидо-ПЭГ₂-Val-Cit-pAB, тогда как ER-001161318 представляет собой ADC, приготовленный на основе майтансина, содержащий расщепляемый линкер малеимидо-(CH₂)₅-Val-Cit-pAB и M-0285 представляет собой ADC, приготовленный на основе дуостатина, содержащий расщепляемый линкер ПЭГ-pAB. Цитотоксичность отслеживали с помощью системы визуализации клеток Incucyte Zoom®. Результаты данного анализа неспецифической цитотоксичности приведены в

таблице 17 и на Фиг. 6A-C.

Таблица 17. Активность неспецифического цитолиза VCP-эрибулина на со-культуре FR-положительных и FR-отрицательных клеточных линий

ЭК ₅₀ (нМ)			
IGROV-1	HL-60	HL-60 (со-культура с IGROV-1)	HL-60 (эрибулин)
0,0005972	39,74	0,2399	0,1702

[00298] Когда клетки HL-60 (FR^{neg}) культивировали при соотношении 2:1 к клеткам IGROV1 (FR^{hi}), обработка MORAb003-VCP-эрибулином приводила к 2-log увеличению уничтожения клеток HL-60 по сравнению с клетками HL-60 отдельно (таблица 17 и Фиг. 6A). Эти данные свидетельствуют о том, что клетки, отрицательные на наличие целевого рецептора фолиевой кислоты альфа (FR), более эффективно уничтожаются MORAb003-VCP-эрибулином при совместном культивировании с клетками, положительными на наличие целевого FR, упоминаются в данном документе как неспецифический цитолиз. Неспецифический цитолиз отличается от нецелевого уничтожения, которое определяется как самостоятельное уничтожение клеток, отрицательных на наличие цели, в отсутствие и независимо от совместного культивирования с клетками, положительными на наличие цели. Наблюдаемое увеличение неспецифического цитолиза также было почти идентично увеличению, наблюдаемому после обработки клеток HL-60 свободным эрибулином, что указывает на потенциальный механизм неспецифического эффекта. Не желая быть связанными соответствием какой-либо теории, авторы полагают, что MORAb003-VCP-эрибулин может быть расщеплен в или вблизи FR-позитивных клеток IGROV1, которые также подвергаются апоптозу и высвобождают свободный эрибулин в культуру. Высвобожденный цитотоксин может уничтожить FR-негативные клетки HL-60.

[00299] Напротив, для MORAb003-ER-001161318 наблюдался лишь незначительный сдвиг (Фиг. 6B) и не наблюдалось никакого сдвига для MORAb003-0285 (Фиг. 6C). Когда соотношение HL-60:IGROV1 было снижено с 2:1 до 1:2, для MORAb003-ER-001161318 наблюдалось заметное уничтожение клеток HL-60 по сравнению с клетками HL-60 отдельно, в то время как для MORAb003-0285 неспецифический эффект все еще оставался низким, хотя и детектируемым. Эти данные показывают, что на предмет неспецифического цитолиза оцененные ADC MORAb-003 могут ранжироваться как VCP-эрибулин > ER-001161318 > M-0285.

2.4 Анализ стабильности сыворотки

[00300] Учитывая длительный период полужизни ADC в кровотоке in vivo и потенциал токсичности, если цитотоксины высвобождаются в кровоток, ADC должны демонстрировать стабильность в сыворотке. ADC MORAb-003 VCP-эрибулин, ER-001161319 и M-0285 были предварительно инкубированы в сыворотке человека или мыши при 37°C в течение 48 часов, а затем оценены в анализе цитотоксичности на

клетках IGROV1 и SJSA-1. ER-001161319 представляет собой ADC, созданный на основе майтансина, содержащий тот же расщепляемый линкер, что и VCP-эрибулин, малеимидо-ПЭГ₂-Val-Cit-pAB. Контроли ФСБ и сыворотка были включены для коррекции любых эффектов сыворотки на выполнение анализа. Результаты этого исследования приведены в таблице 18.

Таблица 18. Стабильность выбранных ADC MORAb-003 в сыворотке

Анализ цитотоксичности на клетках, ЭК ₅₀ , нМ										
		MORAb003-VCP Эрибулин			MORAb003-ER001161319			MORAb003-0285		
	Время	ФСБ	Сыворотка человека	Сыворотка мыши	ФСБ	Сыворотка человека	Сыворотка мыши	ФСБ	Сыворотка человека	Сыворотка мыши
IGROV 1	0 ч-ФСБ	0,021	0,013	0,02	0,28	0,15	0,2	0,074	0,089	НО
	0 ч-Сыворотка	0,022	0,014	0,01	0,15	0,15	0,2	0,063	0,078	0,049
	4 ч	0,03	0,018	0,019	0,14	0,17	0,25	0,065	0,075	0,049
	24 ч	0,024	0,019	НО	НО	0,27	0,9	0,059	0,074	0,044
	48 ч	0,022	0,021	0,03	0,21	0,73	2,56	0,043	0,05	0,051
SJSA-1	0 ч-ФСБ	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
	0 ч-Сыворотка	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
	4 ч	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
	24 ч	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10
	48 ч	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10

Заштрихованные ящики указывают на значительное снижение активности сравнительно образца T=0.

В то время, как VCP-эрибулин и M-0285 были стабильными в течение по меньшей мере 48 часов в обеих сыворотках, ER-001161319 демонстрировал значительное снижение активности через 48 часов. Это может быть связано с азиридин-карбаматной связью с майтансином, которая ранее не была описана в литературе. Форма высвобождаемого соединения может не обладать высокой эффективностью, поскольку не наблюдалось увеличения цитотоксичности на клетках SJSA-1.

2.5 Исследования in vitro с MORAb003-VCP-эрибулином

2.5.1 НИС-ВЭЖХ анализ DAR и гетерогенности продукта

[00301] MORAb003-VCP-эрибулин и MORAb003-0285 анализировали с помощью НИС-ВЭЖХ с целью оценки DAR альтернативным способом и изучения гетерогенности

продукта, а также содержания неконъюгированного антитела (конкурента). Показано, что MORAb003-VCP-эрибулин имеет виды DAR 0, 2, 4 и 6, что предусмотрено способом, применяемым для восстановления и конъюгации (Фиг. 7А). Наблюдалось очень небольшое количество видов с DAR=0. Общий DAR, основанный на расчетах AUC, составил 3,80, что соответствует значениям, определенным ЖХ-МС. На НИС-ВЭЖХ MORAb003-0285 мигрировал как единственный пик, что указывает на один вид DAR (Фиг. 7В). Это было определено как DAR 4. 0.

2.5.2 Специфичность по конкурентному анализу

[00302] Антигенная специфичность цитотоксичности MORAb-003-VCP-эрибулина была продемонстрирована для конъюгата VCP-эрибулин с помощью формата конкурентного анализа (Фиг. 8). В этом эксперименте титры MORAb-003-VCP-эрибулина (начальная концентрация 100 нМ) совместно инкубировали с 2 мкМ неконъюгированного MORAb-003. Неконъюгированный MORAb-003 обеспечивал 2-log сдвиг активности на клетках IGROV1, аналогичный результатам, полученным с IMGN853, ADC к человеческому рецептору фолиевой кислоты альфа-майтанину от Immunogen, находящемуся в данный момент на II-й фазе клинических испытаний, на клетках KB (Moore и соавт., 2015 Американское общество клинической онкологии (ASCO - American Society of Clinical Oncology) ежегодное собрание, Реферат 5518).

2.5.3 Цитотоксичность на клетках НМРЛ NCI-H2110

[00303] Цитотоксичность на клеточной линии НМРЛ человека NCI-H2110, как для MORAb003-VCP-эрибулина, так и для MORAb003-0285, определяли с помощью анализа окрашивания кристаллическим фиолетовым. Результаты этого анализа приведены в таблице 16. MORAb003-VCP-эрибулин имел ИК₅₀ 0,73 нМ, тогда как MORAb003-0285 имел ИК₅₀ 14 нМ.

2.6 In vivo исследования

2.6.1 Максимальная переносимая доза (МПД) MORAb-003-VCP-эрибулина (MORAb-202) на линии мышей CD-1

[00304] Мышам CD-1, ранее не получавшим лечения, вводили внутривенно 200 мкл MORAb-202 в соответствии со схемой из таблицы 19. Вес тела измеряли в день дозирования до ввода дозы, через 24 часа после дозы и три раза в неделю в последующее время. Животных наблюдали для клинического хорошего самочувствия на протяжении всей продолжительности исследования. Через две недели после дозирования измеряли и регистрировали конечную массу тела. В конце исследования мыши, подверженные эвтаназии, (а также если какая-либо мышь была подвергнута эвтаназии или найдена мертвой во время исследования) были обработаны для вскрытия. Органы были обследованы на признаки повреждения тканей.

Таблица 19. План исследования

Группа	# Мышей	Лечение	Доза (мг/кг)	Схема	Способ введения
1	3	Носитель*	0	одиночный болюс	в/в
2		MORAb-202	10		
3			20		
4			40		
5			80		

[00305] По сравнению с контрольной группой, получавшей ФСБ, ни в одной из групп лечения не наблюдалось значимой потери массы тела, или же любых результатов клинических исследований, свидетельствующих о токсичности во время лечения. Масса тела отдельных мышей приведена в таблице 20, а среднее по группе и СОС приведены

в таблице 21. Кинетика изменения массы тела для каждой группы (среднее значение по группе и СОС) изображены на Фиг. 9. MORAb-202 при дозах до 80 мг/кг через внутривенное введение болюса не вызывало токсичности. Следовательно, МПД выше 80 мг/кг.

5 Таблица 20

10

15

20

25

30

35

40

45

5

10

15

20

25

30

35

40

45

Дни После Лечения	Контроль ФСБ			MORA6-202 10 мг/кг			MORA6-202 20 мг/кг			MORA6-202 40 мг/кг			MORA6-202 80 мг/кг		
	A-Y1	A-Y2	A-Y3	B-Y1	B-Y2	B-Y3	C-Y1	C-Y2	C-Y3	D-Y1	D-Y2	D-Y3	E-Y1	E-Y2	E-Y3
X															
0	22.50	20.60	21.20	22.60	23.50	21.80	27.40	26.20	21.00	23.80	23.30	21.70	21.80	26.50	25.80
1	23.60	21.50	22.00	22.80	23.80	23.00	28.80	27.50	21.40	23.60	23.50	21.80	23.10	27.80	27.80
2	23.30	21.90	22.00	23.30	24.00	22.90	29.30	29.00	22.10	23.60	24.60	21.80	23.30	28.30	28.30
4	23.30	21.90	22.00	23.30	23.90	23.30	30.20	31.00	23.00	24.40	24.10	22.70	23.50	29.50	28.60
7	23.90	23.10	22.70	24.80	25.20	24.90	29.60	32.00	24.00	25.10	25.50	23.40	23.30	30.40	30.10
9	24.60	22.50	22.80	24.90	25.30	25.00	30.80	31.70	23.40	25.80	25.20	23.70	23.60	31.00	30.20
11	24.20	23.40	23.20	24.30	25.10	24.30	31.00	32.40	23.80	25.30	25.00	23.80	23.10	29.10	29.40
14	24.00	23.50	24.40	25.80	25.60	25.70	33.20	32.40	24.10	25.70	25.30	28.30	21.70	28.40	28.90

Таблица 21

5
10
15
20
25
30
35
40
45

дни после инъекции	ФСБ		MORAb-202 10 мг/кг			MORAb-202 20 мг/кг			MORAb-202 40 мг/кг			MORAb-202 80 мг/кг		
	среднее (г)	сос	среднее (г)	сос	n	среднее (г)	сос	n	среднее (г)	сос	n	среднее (г)	сос	n
0	21.4	0.6	22.6	0.5	3	24.9	2.0	3	22.9	0.6	3	24.7	1.5	3
1	22.4	0.6	23.2	0.3	3	25.9	2.3	3	22.9	0.7	3	26.2	1.6	3
2	22.4	0.5	23.4	0.3	3	26.8	2.4	3	23.3	0.8	3	26.6	1.7	3
4	22.4	0.5	23.5	0.2	3	28.1	2.5	3	23.7	0.5	3	27.2	1.9	3
7	23.2	0.4	25.0	0.1	3	28.5	2.4	3	24.7	0.6	3	27.9	2.3	3
9	23.3	0.7	25.1	0.1	3	28.6	2.6	3	24.9	0.6	3	28.3	2.3	3
11	23.6	0.3	24.6	0.3	3	29.1	2.7	3	24.7	0.5	3	27.2	2.1	3
14	24.0	0.3	25.7	0.1	3	29.9	2.9	3	25.8	0.3	3	26.3	2.3	3

2.6.2 Максимальная переносимая доза эрибулина у мышей CD-1

[00306] Мышам CD-1, ранее не получавшим лечения, вводили внутривенно 200 мкл эрибулина в соответствии со схемой из таблицы 22. Вес тела измеряли три раза в неделю, включая измерение перед введением дозы в каждый день дозирования и через 24 часа после каждой дозы. Животных наблюдали для клинического хорошего самочувствия на протяжении всей продолжительности исследования (две недели после последней дозы). Измеряли и регистрировали конечную массу тела. В конце исследования мыши, подверженные эвтаназии, (а также если какая-либо мышь была подвергнута эвтаназии или найдена мертвой во время исследования) были обработаны для вскрытия. Органы были обследованы на признаки повреждения тканей.

Таблица 22. План исследования

Группа	# Мышей	Лечение	Доза (мг/кг)	Схема	Способ введения
1	3	ФСБ	0	q4dx3	в/в
2		Эрибулин	0,4		
3			0,8		
4			1,6		
5			3,2		

[00307] У животных, которым вводили эрибулин в дозах до 1,6 мг/кг, с применением режима дозирования q4dx3 (один раз каждые четыре дня, всего 3 дозы), не наблюдали никакой значимой потери веса тела или результатов клинических исследований, свидетельствующих о токсичности. Введение 3,2 мг/кг по той же схеме вызывало у всех трех мышей пилоэрекцию после второй дозы. Наблюдалась серьезная потеря веса (потеря 23% у одной мыши, #552, после второй дозы, 17% и 8% у остальных, #551 и #552, после третьей дозы) по сравнению с контролем ФСБ. Макроскопических изменений в органах мышей при вскрытии не наблюдалось. Масса тела отдельных мышей приведена в таблице 23, а среднее по группе и СОС приведены в таблице 24. Кинетика изменения массы тела для каждой группы (среднее по группе и СОС) изображены на Фиг. 10.

[00308] Эрибулин при дозах до 1,6 мг/кг с применением режима дозирования q4dx3 не вызывал токсичности, тогда как 3,2 мг/кг вызывало серьезную потерю веса. Таким образом, МПД эрибулина в этом исследовании составляет 1,6 мг/кг, q4dx3.

Таблица 23

5

10

15

20

25

30

35

40

45

День X	ФСБ			эрибулин 0.4 мг/кг			эрибулин 0.8 мг/кг			эрибулин 1.6 мг/кг			эрибулин 3.2 мг/кг		
	A:Y1	A:Y2	A:Y3	B:Y1	B:Y2	B:Y3	C:Y1	C:Y2	C:Y3	D:Y1	D:Y2	D:Y3	E:Y1	E:Y2	E:Y3
0	26.50	24.40	23.40	22.40	24.60	23.10	23.90	25.50	25.10	21.90	24.40	23.70	24.30	25.00	22.00
1	28.13	25.11	24.36	21.84	24.02	22.43	23.03	23.60	24.46	21.13	24.10	24.15	22.31	23.47	20.57
4	25.60	25.10	24.40	22.70	24.00	24.00	23.80	24.40	24.50	21.70	24.10	23.30	20.90	22.20	17.50
5	26.40	24.80	24.50	22.30	24.10	23.40	24.10	24.00	24.80	21.50	24.50	24.10	20.90	22.70	16.90
8	27.50	25.70	24.50	23.30	23.70	25.20	24.00	24.80	25.90	21.90	24.50	24.20	21.80	23.90	9003.00 ⁴
9	27.50	25.50	24.40	22.90	23.40	25.40	24.00	24.70	25.30	21.80	24.80	24.30	20.20	23.00	
11	27.50	25.60	24.40	22.60	23.90	25.60	24.70	25.10	26.00	22.20	25.70	24.70	20.00	23.30	
13	27.40	26.80	25.40	23.70	23.90	26.50	25.30	25.60	26.60	22.80	25.80	25.20	21.40	23.70	
16	27.30	26.80	26.20	24.70	24.10	26.70	25.40	25.80	26.40	23.40	26.70	26.10	23.60	24.30	
18	27.00	27.40	27.30	24.30	24.90	27.90	26.20	26.00	27.90	24.70	27.90	26.20	25.90	25.90	
20	28.10	27.60	26.50	26.10	25.70	26.50	25.40	26.20	26.10	25.40	26.00	26.00	26.80	26.00	

Каждый столбец отображает отдельное животное.

*9003: подвергали эвтаназии при потере веса > 20%.

Таблица 24

5

10

15

20

25

30

35

40

45

дни после инъекции	ФСБ		эрибрулин 0.4 мг/кг			эрибрулин 0.8 мг/кг			эрибрулин 1.6 мг/кг			эрибрулин 3.2 мг/кг			
	среднее (г)	сос	n	среднее (г)	сос	n	среднее (г)	сос	n	среднее (г)	сос	n	среднее (г)	сос	n
0	24.8	0.9	3	23.4	0.6	3	24.8	0.5	3	23.3	0.7	3	23.8	0.9	3
1	25.9	1.2	3	22.8	0.7	3	23.7	0.4	3	23.1	1.0	3	22.1	0.8	3
4	25.0	0.3	3	23.6	0.4	3	24.2	0.2	3	23.0	0.7	3	20.2	1.4	3
5	25.2	0.6	3	23.3	0.5	3	24.3	0.3	3	23.4	0.9	3	20.2	1.7	3
8	25.9	0.9	3	24.1	0.6	3	24.9	0.6	3	23.5	0.8	3	22.9	0.9	2
9	25.8	0.9	3	23.9	0.8	3	24.7	0.4	3	23.6	0.9	3	21.6	1.1	2
11	25.8	0.9	3	24.0	0.9	3	25.3	0.4	3	24.2	1.0	3	21.7	1.3	2
13	26.5	0.6	3	24.7	0.9	3	25.8	0.4	3	24.6	0.9	3	22.6	0.9	2
16	26.8	0.3	3	25.2	0.8	3	25.9	0.3	3	25.4	1.0	3	24.0	0.3	2
18	27.2	0.1	3	25.7	1.1	3	27.4	0.6	3	26.3	0.9	3	25.9	0.0	2
20	27.4	0.5	3	26.8	0.9	3	27.2	0.9	3	26.8	1.1	3	26.4	0.3	2

2.6.3 Оценка минимальной эффективной дозы MORAb003-VCP-эрибулина

(MORAb-202) на модели НМРЛ человека NCI-H2110 у мышей CB17-SCID

[00309] НМРЛ человека, клетки NCI-H2110, пассаж 47, имплантировали подкожно 30 мышам CB17 SCID (самка, в возрасте от 5 до 6 недель, весом 20 грамм). Через 14

дней после имплантации мышей распределяли случайным образом на пять групп. Средний объем опухоли в каждой группе в день лечения (день 0) варьировал от 154 до 175 мм³ (таблица 27). Мышей, включенных в исследование, лечили MORAb003-VCP-эрибулином (MORAb-202) (партия# NB2900-87E 10/07/15) при 1, 2,5 или 5 мг/кг, MORAb-003-0285 (партия# 042-150-002) в качестве контроля при 5 мг/кг, или ФСБ, в соответствии с планом исследования (таблица 25). Каждая группа была исключена из исследования, когда объем опухоли у любого животного в группе составлял >2000 мм³. Последняя группа была прервана на 61-й день.

Таблица 25. План исследования

Группа	# Мышей	Лечение	Доза (мг/кг)	Схема	Способ введения
1	5	ФСБ	0	одиночный болюс	в/в
2	5	MORAb-003-VCP-эрибулин	1		
3	5	MORAb-003-VCP-эрибулин	2,5		
4	4 ¹	MORAb-003-VCP-эрибулин	5		
5	5	MORAb003-0285	5		

1 Четыре мыши в этой группе. Одна мышь была исключена из этой группы из-за ошибки введения препарата, которая была подтверждена отсутствием соединения в сыворотке животного на основе данных электрохемилюминесцентного иммуноанализа (ЭХЛА).

[00310] Объемы опухолей отдельных мышей приведены в таблице 26, а среднее по группе и СОС приведены в таблице 27. Кинетика роста опухоли для каждой группы (среднее по группе и стандартная ошибка среднего, СОС) приведены на Фиг. 11, а объемы опухолей у отдельных мышей, а также среднее по группе и СОС приведены на Фиг. 12. Основываясь на объемах опухолей на 17-й день (когда наблюдался первый объем опухоли >2000 мм³), MORAb-202 вызывал ингибирование роста опухоли (TGI - tumor growth inhibition) на 47% при 1 мг/кг (p=0,002 по сравнению с физиологическим раствором), 96% TGI при 2,5 мг/кг (p < 0,0001 по сравнению с физиологическим раствором). Однако, регрессированные опухоли восстанавливаются через одну-две недели после окончания лечения. У мышей, обработанных 5 мг/кг MORAb-202, опухоль не обнаружена. Эти мыши оставались без опухоли свыше 60-ти дней после лечения однократной дозой. MORAb-003-0285 вызывало 89,7% TGI при 5 мг/кг (p < 0,0001 по сравнению с физиологическим раствором).

[00311] Масса тела отдельных мышей приведена в таблице 28, а среднее по группе и СОС приведены в таблице 29. Кинетика изменения массы тела для каждой группы (среднее по группе и СОС) изображены на Фиг. 13.

[00312] По сравнению с контролем, ни в одной из групп лечения не наблюдалось значимой потери массы тела.

[00313] MORAb-202 оказал значимый эффект на рост опухоли NCI-H2110. Регрессия опухоли была достигнута путем болюсного лечения при 2,5 мг/кг с 94% TGI (по сравнению с ФСБ). Следовательно, минимальная эффективная доза MORAb-202, испытанная на этой модели, составляет 2,5 мг/кг. Полное уничтожение опухоли было достигнуто однократной дозой 5 мг/кг. Рост опухоли не наблюдался более 60-ти дней.

Таблица 26. Объемы опухолей

дни после рандомизации	ФСБ				MORAB-202 1 мг/кг								MORAB-202 2.5 мг/кг								MORAB-202 5 мг/кг								003-0285 5 мг/кг							
	164	195	137	300	80	178	218	133	118	150	187	189	92	120	236		110	202	159	146	65	208	241	243	97											
0																																				
3	368	413	279	587	171	178	207	104	106	216	144	97	65	69	148		40	115	68	68	83	259	358	292	164											
5	327	481	285	555	190	161	193	83	95	215	75	51	37	35	56		14	52	22	37	54	160	168	239	105											
6	467	758	541	894	275	257	258	139	160	348	61	52	58	33	57		7	28	25	20	43	197	235	247	129											
7	642	815	621	1055	395	317	306	182	167	476	64	54	53	36	57		8	48	16	20	52	192	255	266	128											
10	891	1238	895	1328	662	506	494	230	285	708	24	37	35	15	71		0	0	0	0	39	155	240	181	86											
12	993	1274	983	1519	1115	638	655	371	361	865	40	21	51	9	69		0	0	0	0	32	106	206	223	83											
14	981	1410	1131	1695	971	848	812	402	418	901	41	30	37	0	89		0	0	0	0	31	115	235	157	79											
17	1320	1723	1319	2089	1466	955	980	727	592	946	46	33	64	0	161		0	0	0	0	28	114	346	251	74											
19						838	1030	856	602	953	56	37	90	0	282		0	0	0	0	27	144	438	359	94											
24											102	37	197	0	702		0	0	0	0	46	391	1244	824	187											
26											168	102	319	0	790		0	0	0	0	103	564	1470	1030	287											
28											269	54	474	9	990		0	0	0	0	125	703	1898	1112	375											
31											362	105	558	13	1187		0	0	0	0	225	1144	2427	1413	657											
33											496	124	588	9	1461		0	0	0	0																
35											573	212	669	16	1847		0	0	0	0																
38											764	348	952	20	2367		0	0	0	0																
40																	0	0	0	0																
42																	0	0	0	0																
45																	0	0	0	0																
47																	0	0	0	0																
52																	0	0	0	0																
54																	0	0	0	0																
59																	0	0	0	0																
61																	0	0	0	0																

Каждый столбец отображает отдельное животное.

Таблица 27

дни после рандомизации	ФСБ		МОРАВЬ-202 1 мг/кг			МОРАВЬ-202 2.5 мг/кг			МОРАВЬ-202 5 мг/кг			МОРАВЬ-003-0285 5 мг/кг		
	СРЕДНЕЕ	СОС	N	СРЕДНЕЕ	СОС	N	СРЕДНЕЕ	СОС	N	СРЕДНЕЕ	СОС	N	СРЕДНЕЕ	СОС
0	175.2	36.41527	5	159.4	17.68781	5	164.8	25.8917	5	154.25	16.95792	4	170.8	37.46065
3	363.6	69.3831	5	162.2	24.14101	5	104.6	17.7581	5	72.75	13.88661	4	231.2	48.4055
5	367.6	66.21275	5	149.4	26.13343	5	50.8	7.242607	5	31.25	7.500133	4	145.2	31.14683
6	587	108.7468	5	232.4	37.74183	5	52.2	5.005179	5	20	4.140008	4	170.2	37.81015
7	705.6	109.7441	5	289.6	55.74694	5	52.8	4.611415	5	23	7.76666	4	178.6	40.08123
10	1002.8	122.532	5	444.6	85.61518	5	36.4	9.499597	5	0	0	4	140.2	35.30937
12	1176.8	100.25	5	578	95.18355	5	38	10.62087	5	0	0	4	130	36.5513
14	1237.6	138.8994	5	676.2	109.4307	5	39.4	14.30871	5	0	0	4	123.4	34.69758
17	1583.4	146.0629	5	840	76.78507	5	60.8	27.09899	5	0	0	4	162.6	58.96373
19				855.8	72.16584	5	93	49.35207	5	0	0	4	212.4	79.06236
24							207.6	127.8177	5	0	0	4	538.4	219.5123
26							275.8	138.3498	5	0	0	4	690.8	249.2466
28							359.2	177.874	5	0	0	4	842.6	310.8641
31							445	208.4929	5	0	0	4	1173.2	373.2365
33							535.6	255.2269	5	0	0	4		
35							663.4	318.1881	5	0	0	4		
38							890.2	402.5237	5	0	0	4		
40										0	0	4		
42										0	0	4		
45										0	0	4		
47										0	0	4		
52										0	0	4		
54										0	0	4		
59										0	0	4		
61										0	0	4		

Таблица 28

дни после рандомизации			ФСБ				МКОРАБ-2012.1 мг/кг			МКОРАБ-2012.2.5 мг/кг			МКОРАБ-2012.5 мг/кг			МКОРАБ-003-0285.5 мг/кг								
0	19.1	18.2	18.4	18.9	18.8	19.1	18.6	19.3	20.6	18.4	17.8	18.1	18	19.8	16.3	17.6	18.7	16.1	19.7	20.5	17.4	18	17.4	18.8
3	19.6	18.2	18.9	18.9	19.3	19.3	18.4	20.2	20.9	18.6	18.4	19.1	18.6	19.9	16.4	17.5	18.8	15.9	19.9	20.8	17	18.1	16.3	18.5
6	19.7	18.4	18.4	19.1	19.1	19	18.3	20.3	21.3	19	18.5	19.4	18.7	20	16.4	17.5	19.3	16.3	19.6	20.8	17.7	18.2	16.8	18.7
7	19.7	18	18.9	18.8	18.9	18.9	18	20	21.2	18.9	18.7	18.7	18.7	19.7	16.5	17.4	19.4	16.5	19.2	20.6	17.7	18.5	16.8	19
10	19.7	18	19.2	18.5	19.1	18.4	18	20.1	20.9	19	19.3	19.7	18.8	19.8	16.6	17.6	19.4	16.7	20	20.5	18.2	18.6	17.5	20.3
12	19.8	17.7	19.1	18.4	19	18.3	17.8	20.5	20.9	19.5	18.9	20	19.7	20.2	17.2	17.9	19.6	16.9	20.2	20.4	18.3	18.8	18.1	20.4
14	18.8	17.4	18.4	18.2	17.5	17.9	17.7	20.3	21.2	19.9	18.8	19.6	19	19.3	17	17.5	19.3	17	19.2	20	18.2	18.9	18.4	19.7
17	18.8	17.2	18.3	17.5	17.2	17.4	17.7	20.4	20.7	19.2	18.8	19.8	19.7	19.2	17.3	17.9	20	17.3	19.7	19.8	17.9	18.9	18.6	19.5
19						16.7	17.2	19.9	20.7	18.9	18.3	19.8	18.7	19.5	16.8	18.1	20	17.1	20.2	19.7	18	19.3	18.4	19.6
24											18.8	20.2	19.2	19.9	16.9	18.5	20.7	17.5	20.2	20.1	18.5	20	19.1	18.9
26											18.9	19.6	18.9	19.5	16.5	18.3	20.7	17.6	19.7	20.6	18.4	19.9	18.6	19.1
28											18.8	19.6	19.5	19.6	16.6	18.6	21.3	17.6	20.1	20.8	18.5	19.9	18.8	19.5
31											18.9	20.1	19.6	20.7	17	18.6	20.4	17.9	20.9	20.7	18.2	20.9	19.6	19.5
33											18.9	19.8	19.4	21.2	17.6	18.8	19.6	18.2	21.3					
35											19.2	19.7	19.5	20.7	17.4	18.7	20.2	18.1	19.6					
38											19.6	20	19.7	20.6	18	18.8	20.4	19	17.2					
40																19.4	20.4	18.7	19.3					
42																19.9	20.4	18.8	20.6					
45																19.8	21	18.3	21.7					
47																19.7	20.7	18.3	21.1					
52																20.2	21.1	18.5	21.9					
54																20.3	21.4	18.6	22.6					
59																20	21.6	18.8	21.7					
61																20.5	22.1	19.2	21.3					

Таблица 29

дни после рандомизации	СРЕДНЕЕ		N	MORab-202 1 мг/кг			MORab-202 2.5 мг/кг			MORab-202 5 мг/кг			MORab-003-дуростатин 5мг/кг		
	СРЕДНЕЕ	СОС		СРЕДНЕЕ	СОС	N	СРЕДНЕЕ	СОС	N	СРЕДНЕЕ	СОС	N	СРЕДНЕЕ	СОС	N
0	18.68	0.165239	5	19.2	0.385328	5	18	0.554902	5	18.025	0.689078	4	18.42	0.578982	5
3	18.98	0.234959	5	19.48	0.47393	5	18.48	0.579842	5	18.025	0.769253	4	18.14	0.76975	5
6	18.94	0.245739	5	19.58	0.537015	5	18.6	0.609665	5	18.175	0.694839	4	18.44	0.667108	5
7	18.86	0.268971	5	19.4	0.549488	5	18.46	0.525953	5	18.125	0.628577	4	18.52	0.638721	5
10	18.9	0.29444	5	19.28	0.537015	5	18.84	0.585996	5	18.425	0.68618	4	19.02	0.590063	5
12	18.8	0.352933	5	19.4	0.600608	5	19.2	0.545849	5	18.65	0.678513	4	19.2	0.502108	5
14	18.06	0.267112	5	19.4	0.685817	5	18.74	0.454832	5	18.25	0.523801	4	19.04	0.352368	5
17	17.8	0.320373	5	19.08	0.673649	5	18.96	0.451533	5	18.725	0.592675	4	18.94	0.33497	5
19				18.68	0.764423	5	18.62	0.527655	5	18.85	0.670634	4	19	0.338521	5
24							19	0.579498	5	19.225	0.663539	4	19.32	0.313137	5
26							18.68	0.563279	5	19.075	0.621135	4	19.32	0.41086	5
28							18.82	0.573795	5	19.4	0.728103	4	19.5	0.407939	5
31							19.26	0.636533	5	19.45	0.638148	4	19.78	0.484329	5
33							19.38	0.585826	5	19.475	0.60047	4			
35							19.3	0.536644	5	19.15	0.416401	4			
38							19.58	0.430983	5	18.85	0.584918	4			
40										19.45	0.314619	4			
42										19.925	0.359691	4			
45										20.2	0.665164	4			
47										19.96	0.549137	4			
52										20.425	0.651414	4			
54										20.725	0.758819	4			
59										20.525	0.620064	4			
61										20.775	0.552051	4			

2.6.4 Оценка минимальной эффективной дозы эрибулина на модели НМРЛ человека

NCI-H2110 у мышей CB17-SCID

[00314] НМРЛ человека, клетки H2110, пассаж 46, имплантировали подкожно 30-ти мышам CB17 SCID (самка, в возрасте от 5 до 6 недель, весом 20 грамм). Через 11 дней после имплантации мышей распределяли случайным образом на пять групп. Пять животных с объемами опухолей, наиболее отклоняющимися от среднего, были исключены. Средний объем опухоли в каждой группе в день лечения (день 0) варьировал от 87,6 до 89,4 мм³ (таблица 32). Мышей, включенных в исследование, лечили эрибулином (партия# N1201193) при 0,05, 0,2, 0,8 или 1,6 мг/кг, либо ФСБ, в соответствии с планом исследования (таблица 30). Каждая группа была исключена из исследования, соответственно, когда внутри группы впервые наблюдали объем опухоли >2000 мм³. Исследование было прекращено на 38-й день (30 дней после последней дозы).

Таблица 30 План исследования

Группа	# Мышей	Лечение	Доза (мг/кг)	Схема	Способ введения
1	5	ФСБ	0	q4dx3	в/в
2		Эрибулин	0,05		
3			0,2		
4	4*		0,8		
5	5		1,6		

[00315] Объемы опухолей отдельных мышей приведены в таблице 31, а среднее по группе и СОС приведены в таблице 32. Кинетика роста опухоли для каждой группы (среднее по группе и СОС) изображена на Фиг. 14, а объемы опухолей у отдельных мышей, а также среднее по группе и СОС на 24-й день (когда у мышей, обработанных ФСБ, наблюдали объем опухоли >2000 мм³), изображены на Фиг. 15. Эрибулин вызывал 50,5% TGI (без наблюдаемой регрессии опухоли) при 0,05 мг/кг (p=0,0026 по сравнению с физиологическим раствором); ~ 99% TGI при 0,2, 0,8 или 1,6 мг/кг (p значение составляло < 0,0001 для всех 3 групп по сравнению с физиологическим раствором). Минимальная эффективная доза, которая вызывала регрессию опухоли, составляет 0,2 мг/кг. Однако большинство регрессированных опухолей у этих мышей (3/5 в группе 0,2 мг/кг, 4/5 в группе 0,8 мг/кг и 2/5 в группе 1,6 мг/кг) вновь выросли или оставались измеримыми на протяжении всего исследования (30 дней после последней дозы).

[00316] Масса тела отдельных мышей приведена в таблице 33, а среднее по группе и СОС приведены в таблице 34. Кинетика изменения массы тела для каждой группы (среднее по группе и СОС) изображены на Фиг. 16.

[00317] По сравнению с контрольной группой, получавшей физиологический раствор, ни в одной из групп лечения не наблюдалось значимой потери массы тела. Результаты клинических исследований, свидетельствующие о токсичности во время лечения, не наблюдались.

[00318] Эрибулин оказал значимый эффект на рост опухоли H2110 при введении в/в q4dX3 при 0,2 мг/кг. Регрессия опухоли была достигнута. Регрессия опухоли не была достигнута, когда вводили более низкую дозу (при 0,05 мг/кг). Следовательно, минимальная эффективная доза, испытанная в этом исследовании, составляет 0,2 мг/кг.

Таблица 31

5
10
15
20
25
30
35
40
45

дни после 1-й дозы	носитель					эрибулин 0.05 мг/кг					эрибулин 0.2 мг/кг					эрибулин 0.8 мг/кг					эрибулин 1.6 мг/кг				
	59	91	118	88	91	105	101	94	61	77	103	68	78	130	62	111	104	81	93	54	70	116	74	91	91
0																									
3	62	179	219	236	173	175	149	117	161	64	68	62	52	79	61	54	55	40	51	33	50	44	44	44	47
5	80	255	436	283	257	231	157	228	261	132	60	60	48	90	51	32	29	34	42	25	25	22	32	24	24
7	111	433	440	472	446	357	171	269	247	102	48	47	39	49	47	26	34	17	21	24	19	12	31	15	11
10	230	555	747	622	489	370	200	413	376	226	33	39	28	36	47	17	22	19	5	21	15	0	29	14	0
12	263	677	722	877	620	539	265	448	350	135	19	41	23	13	14	15	23	16	12	24	13	0	14	0	0
17	720	959	960	1158	885	725	514	751	620	531	0	0	0	0	13	17	38	0	0	26	0	0	0	0	0
19	862	1314	940	1097	941	869	437	908	776	837	27	39	29	29	16	0	20	18	0	27	0	0	19	0	0
24	1886	2308	1854	2760	1671	712	718	1489	1225	1040	0	15	19	23	11	14	0	20	0	33	18	0	19	0	0
26											0	24	0	11	14	0	8	14	14	15	8	0	17	0	0
28											0	7	0	14	83	0	16	20	14	17	0	0	16	0	0
31											0	16	0	10	31	0	10	15	26	29	11	0	17	0	0
33											0	27	0	13	22	0	13	8	18	44	8	0	28	0	0
35											0	19	0	16	42	0	13	0	22	50	14	0	17	0	0
38											0	19	0	14	45	0	11	13	13	54	11	0	20	0	0

Таблица 32

		ФСБ	эрибулин 0.5 мг/кг			эрибулин 0.5 мг/кг			эрибулин 0.5 мг/кг			эрибулин 0.5 мг/кг		
			СРЕДНЕЕ	СОС	И	СРЕДНЕЕ	СОС	И	СРЕДНЕЕ	СОС	И	СРЕДНЕЕ	СОС	И
дни после 1-й дозы														
0			89.4	9.34	5	87.6	8.18	5	88.2	12.56	5	88.6	10.02	5
3			173.8	30.31	5	133.2	19.74	5	64.4	4.45	5	46.6	4.31	5
5			262.2	56.43	5	201.8	24.37	5	61.8	7.43	5	32.4	2.83	5
7			380.4	67.55	5	229.2	43.40	5	46	1.79	5	24.4	2.83	5
10			528.6	85.83	5	317	43.21	5	36.6	3.17	5	16.8	3.07	5
12			631.8	101.42	5	347.4	70.14	5	22	5.07	5	18	2.34	5
17			936.4	70.46	5	628.2	48.40	5	2.6	2.60	5	16.2	7.39	5
19			1030.8	80.29	5	765.4	84.75	5	28	3.65	5	13	5.50	5
24			2095.8	195.76	5	1036.8	149.24	5	13.6	3.94	5	13.4	6.26	5
26						эрибулин 0.5 мг/кг			9.8	4.54	5	10.2	2.83	5
28									20.8	15.74	5	13.4	3.48	5
31									11.4	5.77	5	16	5.29	5
33									12.4	5.53	5	16.6	7.45	5
35									15.4	7.72	5	17	9.22	5
38									15.6	8.25	5	18.2	9.25	5

Таблица 33

5

10

15

20

25

30

35

40

45

дни после 1-й дозы	носитель				эрибулин 0.05 мг/кг				эрибулин 0.2 мг/кг				эрибулин 0.8 мг/кг				эрибулин 1.6 мг/кг								
	18.5	16.7	19.1	20.4	19.6	19.1	16.4	18.6	20.1	17.9	18.2	18.5	16.7	19.8	18.9	18.6	17.8	18.4	17.8	18.1	18.2	18.3	19.4	16.3	19.0
0	18.5	16.7	19.1	20.4	19.6	19.1	16.4	18.6	20.1	17.9	18.2	18.5	16.7	19.8	18.9	18.6	17.8	18.4	17.8	18.1	18.2	18.3	19.4	16.3	19.0
3	18.8	16.6	19.6	20.9	20.0	19.4	17.1	18.5	20.4	18.7	18.6	18.5	16.9	19.6	19.8	18.8	18.0	18.4	18.1	19.0	17.8	18.3	20.1	15.8	19.6
5	18.8	16.8	19.3	21.2	20.0	19.4	16.5	18.4	20.4	19.4	18.5	19.1	16.9	20.2	20.1	18.9	18.1	18.5	17.6	18.2	18.1	18.1	19.5	16.0	19.3
7	18.6	16.5	19.3	21.2	19.8	19.4	16.3	18.7	20.3	19.1	18.5	18.5	17.1	19.6	20.7	19.1	18.1	19.0	17.8	19.0	18.1	18.2	19.5	16.3	19.4
8	18.3	16.7	18.8	21.1	19.6	19.3	16.3	18.4	20.4	19.4	18.6	19.1	17.0	19.6	19.9	19.2	18.0	19.0	17.7	18.8	18.0	18.3	20.1	16.2	19.4
9	18.4	16.4	18.5	21.0	19.5	18.8	16.1	18.6	19.9	19.1	18.3	20.0	16.8	19.5	19.5	19.2	17.7	18.5	17.5	18.5	17.4	18.0	19.6	15.8	19.4
10	19.0	17.2	19.2	21.6	20.3	19.7	16.3	19.4	20.5	20.0	18.7	19.4	17.1	20.0	20.1	19.0	17.7	18.9	17.8	19.1	18.1	18.5	21.0	16.1	20.0
12	19.0	15.9	18.5	21.3	19.2	18.8	15.9	18.6	19.6	19.7	18.3	19.3	16.9	19.7	19.9	18.9	17.8	19.0	17.8	19.0	18.0	18.8	20.5	16.3	20.1
17	18.8	15.5	17.8	20.4	18.3	17.5	16.0	18.5	18.0	19.7	19.0	19.3	17.4	20.5	20.0	19.2	18.0	18.8	18.1	19.1	19.0	19.2	21.0	16.4	19.4
19	18.9	15.6	17.2	20.6	18.1	17.8	16.3	18.4	18.0	19.4	19.1	19.0	17.1	21.1	21.0	19.1	17.7	19.4	18.7	19.1	19.1	19.5	21.1	16.3	19.8
24	18.2	15.8	17.4	20.3	18.2	18.8	16.5	18.8	17.4	18.0	19.3	20.2	18.8	21.7	22.0	20.1	18.5	20.3	19.1	20.3	19.4	20.6	21.7	18.1	20.7
26											19.8	20.9	18.6	22.0	20.4	20.3	18.1	19.9	19.3	20.9	19.5	20.7	21.6	18.3	20.6
28											20.1	20.6	18.1	21.5	21.0	20.3	17.8	20.2	19.6	20.6	19.6	20.3	21.2	17.6	21.1
31											18.7	20.1	18.7	22.0	21.2	20.1	18.2	20.3	19.5	20.7	19.8	20.4	21.9	18.1	21.9
33											20.0	20.3	18.4	22.2	21.8	20.2	18.3	21.0	19.2	20.2	20.1	19.9	21.7	17.9	20.7
35											19.5	20.1	18.7	22.1	21.4	20.1	17.8	21.0	19.3	20.3	20.3	18.2	21.8	18.2	20.9
38											19.8	20.8	18.3	21.6	21.6	20.4	18.1	21.4	19.4	21.2	20.0	21.0	21.9	18.4	20.3

Каждый столбец отображает отдельное животное.

Таблица 34

дни после 1-й дозы	ФСБ		эрибулин 0.05 мг/кг			эрибулин 0.2 мг/кг			эрибулин 0.8 мг/кг			эрибулин 1.6 мг/кг		
	СРЕДНЕЕ	СОС	СРЕДНЕЕ	СОС	N	СРЕДНЕЕ	СОС	N	СРЕДНЕЕ	СОС	N	СРЕДНЕЕ	СОС	N
0	18.9	0.62	18.4	0.62	5	18.4	0.51	5	18.1	0.16	5	18.2	0.53	5
3	19.2	0.73	18.8	0.54	5	18.7	0.51	5	18.5	0.19	5	18.3	0.75	5
5	19.2	0.73	18.8	0.66	5	19.0	0.60	5	18.3	0.22	5	18.2	0.62	5
7	19.1	0.77	18.8	0.67	5	18.9	0.60	5	18.6	0.27	5	18.3	0.58	5
10	18.9	0.72	18.8	0.69	5	18.8	0.51	5	18.5	0.29	5	18.4	0.67	5
12	18.8	0.76	18.5	0.65	5	18.8	0.59	5	18.3	0.30	5	18.0	0.69	5
17	19.5	0.73	19.2	0.74	5	19.1	0.55	5	18.5	0.32	5	18.7	0.84	5
19	18.8	0.86	18.5	0.68	5	18.8	0.56	5	18.5	0.28	5	18.7	0.77	5
24	18.2	0.79	17.9	0.60	5	19.3	0.53	5	18.6	0.24	5	19.0	0.73	5
26						19.5	0.74	5	18.8	0.30	5	19.2	0.79	5
28						20.4	0.63	5	19.7	0.36	5	20.1	0.62	5
31						20.3	0.56	5	19.7	0.48	5	20.1	0.57	5
33						20.3	0.59	5	19.7	0.50	5	20.0	0.66	5
35						20.1	0.66	5	19.8	0.43	5	20.4	0.71	5
38						20.5	0.68	5	19.8	0.47	5	20.1	0.62	5

ПРИМЕР 2

1. Материалы и способы

[00319] MORAb003-VCP-эрибулин (MORAb-202) синтезировали путем конъюгации MORAb-003 (гуманизированного антитела к рецептору фолиевой кислоты альфа человека) с соединением MAL-ПЭГ2-Val-Cit-PAВ-эрибулин (ER-001159569), описанным в разделе 1. 1 Примера 3. Способ конъюгации описан в разделе 1. 4. 1 Примера 4.

1.1 Опухолевые модели

[00320] Линии опухолевых клеток человека, применяемые в дополнительной оценке MORAb-202 *in vitro*, включают IGROV1 (карциному яичника человека, $FR^{hi(+++)}$), OVCAR3 (карциному яичника человека, $FR^{med(++)}$), NCI-H2110 (немелкоклеточную карциному легких человека, $FR^{med(++)}$), A431-A3 (родительскую клеточную линию A431, стабильно трансфицированную мезотелином человека, $FR^{lo(+/-)}$), SJSA-1 (остеосаркому человека, $FR^{neg(-)}$) и HL-60 (лейкоз человека, $FR^{neg(-)}$). Все эти клеточные линии были получены непосредственно из Американской коллекции типовых культур (ATCC). Для исследований *in vivo* ксенотрансплантатные модели опухоли у мышей, полученные из пациентов с немелкоклеточным раком легкого, трижды негативным раком молочной железы и раком эндометрия, были созданы и поддерживались в Oncotest GmbH (Фрайбург, Германия), Oncodesign (Дижон, Франция) и EPO Berlin-Buch GmbH (Берлин, Германия), соответственно.

1.2 Анализы цитотоксичности *in vitro*

1.2.1 Анализ окрашивания кристаллическим фиолетовым

[00321] Клетки IGROV1 ($FR^{hi(+++)}$), A431-A3 ($FR^{lo(+/-)}$) и SJSA-1 ($FR^{neg(-)}$) субкультивировали и высевали при 10000 клеток/лунку в готовую питательную среду в 96-луночных планшетах для культивирования тканей, инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение ночи (16 часов). Как правило, реагенты для испытания серийно разводили 1:4 в планшетах для разведения с 2-миллилитровыми глубокими лунками, начиная с 1 мкМ (всего 10 разведений). 100 мкл разбавленных образцов добавляли к клеточным планшетах (при начальной концентрации образцов для испытания 100 нМ). Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение дополнительных 48 часов. Среду удаляли, планшеты промывали один раз 200 мкл DPBS, окрашивали 50 мкл 0,2% раствора кристаллического фиолетового при комнатной температуре в течение 15 мин и затем тщательно промывали водопроводной водой. Планшеты сушили на воздухе, а кристаллический фиолетовый растворяли с 200 мкл 1% раствора ДСН. Планшеты считывали при 570 нм. Данные анализировали с применением GraphPad Prism 6. Для OVCAR3 ($FR^{med(++)}$) и NCI-H2110 ($FR^{med(++)}$), клетки высевали при 3000 клеток/лунку и инкубировали в течение 5 дней с MORAb-202.

1.3 Исследования *in vivo*

1.3.1 Ксенотрансплантатная модель NCI-H2110

[00322] Подготовка животных: Мышей CB17 SCID (самка, в возрасте 6 недель) размещали по 5 мышей на вентилируемую клетку. Стерилизованные пищевые гранулы и бутылка с водой были доступны животным *ad lib*. Животных адаптировали в течение 5-7 дней до имплантации опухоли.

[00323] Культура клеток: Человеческие клетки NCI-H2110 размораживали из замороженной исходной культуры (NB2813-65) и культивировали в среде RPMI-1640, дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (ФБС) в 5% CO₂ при 37°C. После двух

пассажей при достижении примерно 70% конфлюэнтности клетки собирали с помощью раствора для диссоциации клеток, дважды промывали бессывороточной средой и подсчитывали.

[00324] Имплантация опухоли: Клеточную суспензию в бессывороточной среде смешивали 1:1 (об/об) с ледяным матригелем до конечной концентрации $1,0 \times 10^8$ клеток/мл. Каждой мышши вводили подкожно 100 мкл смеси при $1,0 \times 10^7$ клеток/мышшь. Для всех инъекций применяли иглу 27G. Мышей наблюдали для клинического хорошего самочувствия и опухоли измеряли цифровым штангенциркулем три раза в неделю, начиная на 3-й день после имплантации. Объем опухоли (мм^3) был рассчитан по формуле: $\text{Ш (мм)} \times \text{Д (мм)} \times \text{Г (мм)} \times \pi/6$. Когда опухоли достигали $\sim 100 \text{ мм}^3$ (в среднем от >70 до $\sim 130 \text{ мм}^3$), животных распределяли случайным образом по 4-5 на группу. 5 животных с объемами опухолей, наиболее отклоняющимися от среднего, были исключены.

[00325] План исследования: Включенным в исследование подопытным мышам вводили внутривенно 200 мкл носителя или MORAb-202 при 1,0, 2,5 и 5 мг/кг в соответствии с планом исследования (таблица 35) в день случайного распределения. Вес тела измеряли до ввода дозы и два раза в неделю во время исследования. В конце исследования измеряли и регистрировали конечную массу тела. Животных подвергали эвтаназии, когда отдельный объем опухоли превышал 2000 мм^3 . Критерии досрочного прекращения исследования до достижения максимально допустимого объема опухоли: (1) язва опухоли более 50% опухоли (об/об); (2) паралич; (3) $>20\%$ потери массы тела; и (4) 50% животных в группе поддались исключению. Любую мышшь, которая подвергалась эвтаназии или была найдена мертвой во время исследования, обрабатывали в соответствии с описанной выше процедурой исключения.

Таблица 35. План исследования

Группа	# Мышей	Лечение	Доза (мг/кг)	Схема	Способ введения
1	5	Носитель	0	одиночный болюс	в/в
2		MORAb-202	1		
3			2,5		
4			5		

1.3.2 Ксенотрансплантатные модели, полученные из пациентов (PDx - patient-derived xenograft)

1.3.2.1 PDx модель немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ): LXFA-737 (Oncotest)

[00326] Имплантация опухоли: Фрагменты опухоли НМРЛ были получены из опухолевых ксенотрансплантатов LXFA-737, серийно перевиваемые голым мышам. После удаления из донорных мышей опухоли разрезали на фрагменты (длина кромок 3-4 мм) и помещали в фосфатно-солевой буфер (ФСБ), содержащий 10% пенициллина/стрептомицина. Животных-реципиентов анестезировали путем ингаляции изофлурана и подкожно имплантировали полученную одностороннюю или двустороннюю опухоль в бок. Опухолевые ксенотрансплантаты были имплантированы одной или двумя опухолями на мышшь с частотой приживания $< 65\%$. В случае двустороннего взятия одна из этих опухолей была эксплантирована до случайного распределения. Животных и опухолевые имплантаты ежедневно наблюдали, пока рост солидной опухоли не был обнаружен у достаточного количества животных. При случайном распределении был определен объем растущих опухолей. Животные, отвечающие критериям случайного

распределения (то есть имеющие опухоли 50-250 мм³, предпочтительно 80-200 мм³), были распределены на экспериментальные группы, состоящие из 5-6 животных на группу, направленные на сопоставимые медианные и средние объемы опухоли группы приблизительно 100-120 мм³. Животные, не применяемые для экспериментов, подвергались эвтаназии. День случайного распределения был обозначен как 0-вой день эксперимента.

[00327] План исследования: Включенным в исследование подопытным мышам вводили внутривенно носитель, MORAb-003 при 5 мг/кг или MORAb-202 при 5 мг/кг, в соответствии с планом исследования (таблица 36) в день случайного распределения. Вес тела измеряли в каждый день дозирования до ввода дозы и два раза в неделю во время исследования. В конце исследования измеряли и регистрировали конечную массу тела. Животных подвергали эвтаназии, когда отдельный объем опухоли превышал 2000 мм³.

Таблица 36. План исследования

Группа	# Мышей	Лечение	Доза (мг/кг)	Схема	Способ введения
1	6	Носитель	0	одиночный болюс	в/в
2	6	MORAb-003	5		
3	6	MORAb-202	5		

1.3.2.2 PDx модель трижды негативного рака молочной железы (ТНРМЖ): OD-BRE-0631 (Oncodesign)

[00328] Имплантация опухоли: Девяти самкам мышей SWISS nude вводили подкожно в правый бок фрагменты ТНРМЖ опухоли, полученные из пациентов. Мышей-опухоленосителей подвергали эвтаназии, когда объем опухоли достигал 500-1000 мм³, а опухоли вырезали хирургическим путем. Фрагменты опухолей (30-50 мг) ортотопически имплантировали в область жировой ткани молочной железы у 34 самок мышей SWISS nude 24 до 72 часа после облучения всего тела гамма-источником (2 Гр, ⁶⁰Co, BioMER, Франция). Когда опухоли достигли среднего объема 200-300 мм³, 24 из 34 животных были распределяли случайным образом на две группы (n=12 животных) в соответствии с их индивидуальным объемом опухоли, применяя программное обеспечение Vivo Manager® (Biosystemes, Кутернон, Франция). Был проведен статистический тест (анализ дисперсии) для оценки однородности между группами. День случайного распределения был обозначен как 0-вой день эксперимента.

[00329] План исследования: На 1-й день отбирали (через один день после случайного распределения и за два дня до лечения) 3 мыши из каждой из двух групп не получавших лечение. Оставшимся подопытным мышам на 3-й день вводили внутривенно носитель или MORAb-202 при 5 мг/кг, в соответствии с планом исследования (Таблица 37). На 8-й день (через пять дней после лечения) 3 мыши из каждой из двух обработанных групп были отобраны. Сразу же после окончания опухолевую ткань собирали и фиксировали в 4% забуференном нейтральном формалине от 24 до 48 часов, а затем заключали в парафин (Histosec®, Merck, Дармштадт, Германия). Заключенный в парафин образец хранили при комнатной температуре для последующего иммуногистохимического анализа.

Таблица 37. План исследования

Группа	# Мышей	Лечение	Доза (мг/кг)	Схема	Способ введения
1	3	н/п	н/п	н/п	н/п
	9	Носитель	0	одиночный болюс	в/в

2	3	н/п	н/п	н/п	н/п
	9	MORAb-202	5	одиночный болюс	в/в

[00330] Иммуногистохимический анализ (ИГХ): Было проведено ИГХ окрашивание фиксированных в формалине, заключенных в парафин опухолевых тканей для оценки как расположения MORAb-202, так и экспрессии ассоциированных с раком фибробластов. Перед окрашиванием слайды депарафинизировали и антиген извлекали в Lab Vision™ PT Module (Thermo Scientific) в цитратном буфере (pH 6,0), предварительно нагретом до 85°C, применяя следующую программу: нагреть до 97°C; инкубировать при 97°C в течение 30 мин; и охладить до 60°C. Затем слайды переносили в бидистиллированную воду при комнатной температуре на 5 мин. Окрашивание проводили в Lab Vision™ Autostainer 360 (Thermo Scientific). Вкратце, слайды дважды промывали в 1X Трис-буферизированном физрастворе/Твин-20 (TBST - Tris-buffered saline/Tween-20) в течение 6 мин/промывка. Затем тканевые срезы инкубировали в блокирующем буфере (300 мкл) (10% козьей сыворотки (Jackson Immunoresearch Laboratory Inc., Cat No. 005-000-121), разбавленной в 3% бычьей сывороточном альбумине (БСА) - фосфатно-солевом буфере (ФСБ)) в течение 1 часа, инкубировали с конъюгированным антителом (200 мкл) (таблица 38) в течение 1 часа и промывали пять раз в 1X TBST в течение 6 мин/промывка. Слайды докрашивали DAPI в заливочных средах и накрытые покровным стеклом слайды оставляли затвердеть на 30 мин. Слайды обрабатывались на сканере Panoramic MIDI (3DHISTECH), а ИГХ изображения анализировали с помощью программного обеспечения Halo (Indica Labs). Антитела, применяемые в этом анализе, нацелены на α -гладкомышечный актин (ГМА), который является специфическим маркером для ассоциированных с раком фибробластов, и человеческий IgG, который может выявлять присутствие MORAb-202.

Таблица 38. ИГХ антитела

Антитело	Конъюгированный	Поставщик	Номер по каталогу	Партия	Исходный раствор	Рабочий раствор
α -гладкомышечный актин (ГМА)-FITC	FITC	Sigma	F3777	124M4775V	2,0 мг/мл	5,0 мкг/мл
IgG1 мыши, к изотипический контроль	AF488	Biolegend	400129	B128493	0,2 мг/мл	1:1000
антитело козы к IgG человека	AF555	Mol. Probes	A21433	1709318	н/п	1:200

1.3.2.3 PDx модели рака эндометрия: Endo-12961 и Endo-10590 (EPO Berlin)

[00331] Имплантация опухоли: Фрагменты опухоли рака эндометрия получали из серийно перевиваемых опухолевых ксенотрансплантатов Endo-12961 и Endo-10590 и хранили как исходную культуру в жидком азоте. Фрагменты опухоли имплантировали подкожно в левый бок 40 самок мышей NMRI nu/nu и наблюдали объем опухоли. Мышей с объемом опухоли 100-160 мм³ распределяли случайным образом в одну из четырех групп (группы A-D, Таблица 39). Спутниковые мыши для случайного распределения были включены в пятую группу (группа E, Таблица 39). Каждая группа состояла из 8 животных. День случайного распределения был обозначен как 0-вой день эксперимента.

[00332] План исследования: Включенным в исследование подопытным мышам вводили внутривенно ФСБ, эрибулин при 3,2 мг/кг или 0,1 мг/кг, или MORAb-202 при 5 мг/кг, в соответствии с планом исследования (Таблица 39) в день случайного распределения. Рост опухоли оценивали путем измерения двух перпендикулярных диаметров два раза в неделю, и рассчитывали объем опухоли (TV - tumor volume), относительный объем опухоли (RTV - relative tumor volume) и значения лечение/контроль (T/C - treated/control). Вес тела также оценивали два раза в неделю в качестве параметра

на токсичность, с расчетом массы тела на группу и изменениями массы тела (BWC - body weight change) по сравнению с началом лечения. Животных умерщвляли, когда отдельный объем опухоли превышал 1 см³, или в конце исследования.

Таблица 39. План исследования

Группа	# Мышей	Лечение	Доза (мг/кг)	Схема	Способ введения
A	8	ФСБ	0	одиночный болюс	в/в
B		Эрибулин	3,2		
C		Эрибулин	0,1		
D		MORAb-202	5		
E		н/п	н/п	н/п	н/п

1.4 Механизм действия

1.4.1 Трехмерная (3D) система совместной культуры в zPredicta

[00333] Все эксперименты с 3D со-культурой, содержащей мезенхимальные стволовые клетки (МСК), проводились в zPredicta с применением органоспецифических 3D-систем внеклеточного матрикса, таких как rStomach™. Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (МСК КМ) в rStomach™ были совместно культивированы с клеточной линией рака желудка Nuc Red Light MKN-74 в четырех повторностях в 48-луночном формате в течение 12 дней. Ранее было показано, что клетки MKN-74 экспрессируют достаточное количество рецептора фолиевой кислоты альфа (FR) в ответ на обработку MORAb-202, чтобы индуцировать клеточный апоптоз. Перед культивированием, МСК КМ оценивали на экспрессию целевого антигена и на маркеры дифференциации МСК (Таблица 40) с помощью проточной цитометрии.

Таблица 40. Маркеры дифференциации МСК

Популяция клеток	Маркеры
Мезенхимальные стволовые клетки (МСК)	Stro-1 ⁺ /CD105 ⁺
Преадипоциты	CD34 ⁺ /CD31 ⁻
Адипоциты	Масляный красный
Ассоциированные с раком фибробласты (CAF - cancer associated fibroblasts)	Альфа-гладкомышечный актин (αГМА), виментин
Адвентициальные клетки/перициты	NG2 ⁺ , CD13 ⁺ , CD146 ⁺
Все	FRA

[00334] Культуры rStomach™ обрабатывали либо MORAb-202, неконъюгированным антителом MORAb-003, эрибулином, или контролем, как приведено в Таблице 41.

Контроль включал необработанные и обработанные носителем (ФСБ и ДМСО) культуры. Дифференциацию МСК наблюдали с помощью световой микроскопии. Как только наблюдалась видимая дифференциация, образцы собирали для окрашивания и анализа проточной цитометрией.

Таблица 41. Лечения со-культур

Агент	Рабочая(ие) концентрация(и)
MORAb-202	10 нМ
MORAb-003 (неконъюгированное антитело)	10 нМ
Эрибулин	1,7 нМ и 0,2 нМ
ФСБ	
ДМСО	0,1%
Необработанный контроль	

1.4.2 Анализ временной динамики воздействия MORAb-202 на ассоциированные с раком фибробласты

[00335] Мышей-опухоленосителей, с подкожным ксенотрансплантатом H2110, получали, как описано в разделе 1. 3. 1. Образцы опухолей собирали в дни 0, 3, 5, 7 и 9 после введения носителя или MORAb-202 при 5 мг/кг. Собранные образцы опухолей обрабатывали на слайдах, а экспрессию ассоциированных с раком фибробластов анализировали путем ИГХ, как описано в разделе 1. 3. 2. 2.

2. Результаты

2.1 Анализы цитотоксичности in vitro

2.1.1 Цитотоксичность MORAb-202

[00336] Активность MORAb-202 in vitro оценивали с помощью анализа окрашивания кристаллическим фиолетовым, как описано в разделе 1. 2. 1. Скрининг выполняли на клетках IGROV1 (FR^{hi}(+++)), OVCAR3 (FR^{med}(++)), NCI-H2110 (FR^{med}(++)), A431-A3 (FR^{lo}(+/-)) и SJSA-1 (FR^{neg}(-)). Результаты этого скрининга представлены на Фиг. 17 и в Таблице 42.

Таблица 42. Скрининг цитотоксичности (ЭК₅₀) MORAb-202 на различных линиях опухолевых клеток

ЭК ₅₀ (нМ)				
IGROV 1 (FR+++)	OVCAR3 (FR++)	NCI-H2110 (FR++)	A431-A3 (FR+/-)	SJSA-1 (FR-)
0,01	0,16	0,74	23	> 100

[00337] MORAb-202 проявлял цитотоксичность к линиям опухолевых клеток, зависящую от экспрессии рецептора фолиевой кислоты альфа, и низкие уровни нецелевого уничтожения. MORAb-202 продемонстрировал наивысший уровень активности (0,01 нМ) на клетках IGROV1 с небольшой цитотоксичностью (> 100 нМ) на клетках SJSA-1, не содержащих рецептор фолиевой кислоты альфа. Промежуточная активность наблюдалась на клетках OVCAR3 и NCI-H2110 (0,16 нМ и 0,74 нМ).

2.2 Исследования in vivo

2.2.1 Эффективность MORAb-202 на ксенотрансплантатной модели NC1-H2110

[00338] Мышам-опухоленосителям, с подкожным H2110, внутривенно вводили носитель или MORAb-202 при 1, 2,5 и 5 мг/кг. Значимая регрессия опухоли наблюдалась после однократной дозы MORAb-202 при 5 мг/кг (Фиг. 18 и Таблица 43). Показано, что применяя эту ксенотрансплантатную модель с высоким уровнем экспрессии рецептора фолиевой кислоты альфа и введениями однократной дозы, терапевтический диапазон для MORAb-202 составляет 1 мг/кг для задержки роста опухоли (со стабильным заболеванием) и ≥ 2,5 мг/кг для регрессии опухоли. В этом исследовании MORAb-202 в дозе 2,5 мг/кг приводил к частичному ответу, а MORAb-202 в дозе 5 мг/кг приводил к полному ответу.

Таблица 43. Противоопухолевая активность MORAb-202 на ксенотрансплантатной модели NC1-H2110

	Объем опухоли, мм ³ (ингибирование роста опухоли, %)	
	День 17	День 31
Носитель (n=5)	1583,4 ± 146,1 (100)	н/п
MORAb-202, 1 мг/кг, однократная доза (n=5)	840,0 ± 76,8 (53,1)	н/п
MORAb-202, 2,5 мг/кг, однократная доза (n=5)	60,8 ± 27,1 (3,8)	1173,2 ± 373,2
MORAb-202, 5 мг/кг, однократная доза (n=4)	0,0 (0,0)	0 (0,0)

2.2.2 Эффективность MORAb-202 на PDx модели НМРЛ: LXFA-737

[00339] Мышам-опухоленосителям, с подкожным PDx НМРЛ, внутривенно вводили

носитель, MORAb-003 при 5 мг/кг или MORAb-202 при 5 мг/кг. Однократная доза MORAb-202 (5 мг/кг) приводила к значимой регрессии опухоли на этой модели, в отличие от однократной дозы неконъюгированного антитела MORAb-003 (5 мг/кг), которая не демонстрировала значимую противоопухолевую активность (Фиг. 19А). Пять из всех шести мышей, получавших MORAb-202, считались не имеющими опухолей на 32-й день исследования (Таблица 44), и четыре оставались без опухолей до 74-го дня (прекращение исследования). Дополнительно, в группе лечения не наблюдалась значимая потеря массы тела по сравнению с контрольной группой, получавшей носитель, что указывало на отсутствие токсичности во время лечения (Фиг. 19В).

Таблица 44. Противоопухолевая активность MORAb-202 на PDx модели НМРЛ

	Объем опухоли, мм ³ (ингибирование роста опухоли, %)		
	День 21	День 32	День 74
Носитель (n=6)	1004,5 (100)	1561,3 (100)	н/п
MORAb-003, 5 мг/кг, однократная доза (n=6)	860,7 (85,7)	1572,1 (100,7)	н/п
MORAb-202, 5 мг/кг, однократная доза (n=6)	22,9 (2,3)	4,7 (0,3)	418,3 (4/6 без опухоли)

2.2.3 Относительная эффективность MORAb-202 и эрибулина на PDx моделях рака эндометрия: Endo-12961 и Endo-10590

[00340] Ксенотрансплантаты Endo-12961 и Endo-10590 экспрессируют высокие уровни рецептора фолиевой кислоты альфа. Мышам-опухоленосителям, с подкожным PDx раком эндометрия, вводили внутривенно ФСБ, эрибулин при 3,2 мг/кг или 0,1 мг/кг или MORAb-202 при 5 мг/кг. Максимальная переносимая доза (МПД) эрибулина на этой модели составляет 3,2 мг/кг, тогда как 0,1 мг/кг является эквивалентной дозе эрибулина, предоставленной MORAb-202, вводимым при 5 мг/кг. На протяжении начала исследования значимая противоопухолевая активность наблюдалась после лечения MORAb-202 (5 мг/кг) и дозой МПД эрибулина (3,2 мг/кг) на обеих животных моделях, в то время как никакой значимой противоопухолевой активности не наблюдалось после лечения эрибулином при 0,1 мг/кг (Фиг. 20А и 20С). Однако, регрессированные опухоли у мышей, получавших эрибулин при 3,2 мг/кг, начали вновь расти во время исследования, тогда как у мышей, получавших MORAb-202, не наблюдалось значимого повторного роста опухоли. В этом исследовании MORAb-202 оказался значительно более эффективным, чем эрибулин. Лечение эрибулином также временно влияло на массу тела в течение первой недели после лечения (Фиг. 20В и 20D). Напротив, у животных, получавших MORAb-202, не наблюдалась потеря массы тела.

2.3 Механизм действия MORAb-202

2.3.1 ИГХ и эффективность MORAb-202 на PDx модели ТНРМЖ: OD-BRE-0631

[00341] Мышам-опухоленосителям, с подкожным PDx ТНРМЖ, вводили внутривенно носитель или MORAb-202 при 5 мг/кг. У мышей в каждой группе собирали опухолевую ткань до начала лечения (День 1) и после лечения (День 8). Анализы ИГХ собранных опухолевых тканей показали, что, после введения на 3-й день однократной дозы (5 мг/кг), MORAb-202 располагается в опухолевых клетках, экспрессирующих рецептор фолиевой кислоты альфа, через пять дней после лечения (День 8). Расположение в клетках оценивали с применением антитела к IgG человека (Фиг. 21А). Было также показано, что лечение MORAb-202 приводит к уменьшению структуры ассоциированных с раком фибробластов, что показано путем ИГХ окрашивания с антителом к α -гладкомышечному актину (ГМА)-FITC (Фиг. 21В). С точки зрения эффективности,

лечение MORAb-202 приводило к максимальной регрессии опухоли через 11 дней после лечения, измеренной по относительному объему опухоли (RTV) 0,62 (Фиг. 21С).

2.3.2 Влияние MORAb-202, MORAb-003 и эрибулина на систему 3D со-культуры

[00342] Мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (МСК КМ) в rStomach™ (zPredicta) были совместно культивированы с линией клеток рака желудка MKN-74 в течение 12 дней. Перед культивированием, МСК КМ оценивали на экспрессию рецептора фолиевой кислоты альфа и на маркеры дифференциации МСК с помощью проточной цитометрии. Культуры rStomach™ обрабатывали либо MORAb-202, конъюгированным антителом MORAb-003, эрибулином или контролем. Как только при помощи световой микроскопии наблюдалась видимая дифференциация МСК, образцы собирали для окрашивания и анализа проточной цитометрией. Результаты этих анализов изображены на Фиг. 22.

[00343] Общая продолжительность обработки 7 дней с дополнением обработки в течение этого периода была достаточной для того, чтобы произвести измеряемый эффект на дифференциацию МСК КМ человека в культуре с клетками MKN-74. Сравнительно к контролю носителя, обработка MORAb-202 (10 нМ) приводила к увеличению в популяциях МСК и адипоцитов и уменьшению в популяциях перицитов (Таблица 45). Эти данные показывают, что MORAb-202 может оказывать значительное влияние на микроокружение опухоли.

Таблица 45. Влияние MORAb-202, MORAb-003 и эрибулина на систему 3D со-культуры

Лечение	Процент живых клеток		
	МСК	Адипоциты	Перициты
ФСБ	32,3%	0,72%	14,6%
MORAb-202	43,7%	22,6%	11,4%
MORAb-003	37,1%	0,69%	24,0%
Эрибулин	29,9%	2,68%	25,8%

2.3.3 Анализ временной динамики воздействия MORAb-202 на ассоциированные с раком фибробласты

[00344] Образцы опухолей собирали у мышей-опухоленосителей, с подкожным ксенотрансплантатом H2110, в дни 0, 3, 5, 7 и 9 после введения носителя или MORAb-202 при 5 мг/кг. Собранные образцы опухолей обрабатывали на слайдах, а экспрессию ассоциированных с раком фибробластов (CAF) анализировали путем ИГХ. Структура сети CAF, как оценивали и количественно определяли путем окрашивания с антителом к α -гладкомышечному актину (ГМА)-FITC, была видна на 3-й день и 5-й день после введения однократной дозы MORAb-202 при 5 мг/кг (Фиг. 23). Однако, к 7-му дню большая часть этой структуры значительно уменьшилась.

ПРИМЕР 3

1. Материалы и способы

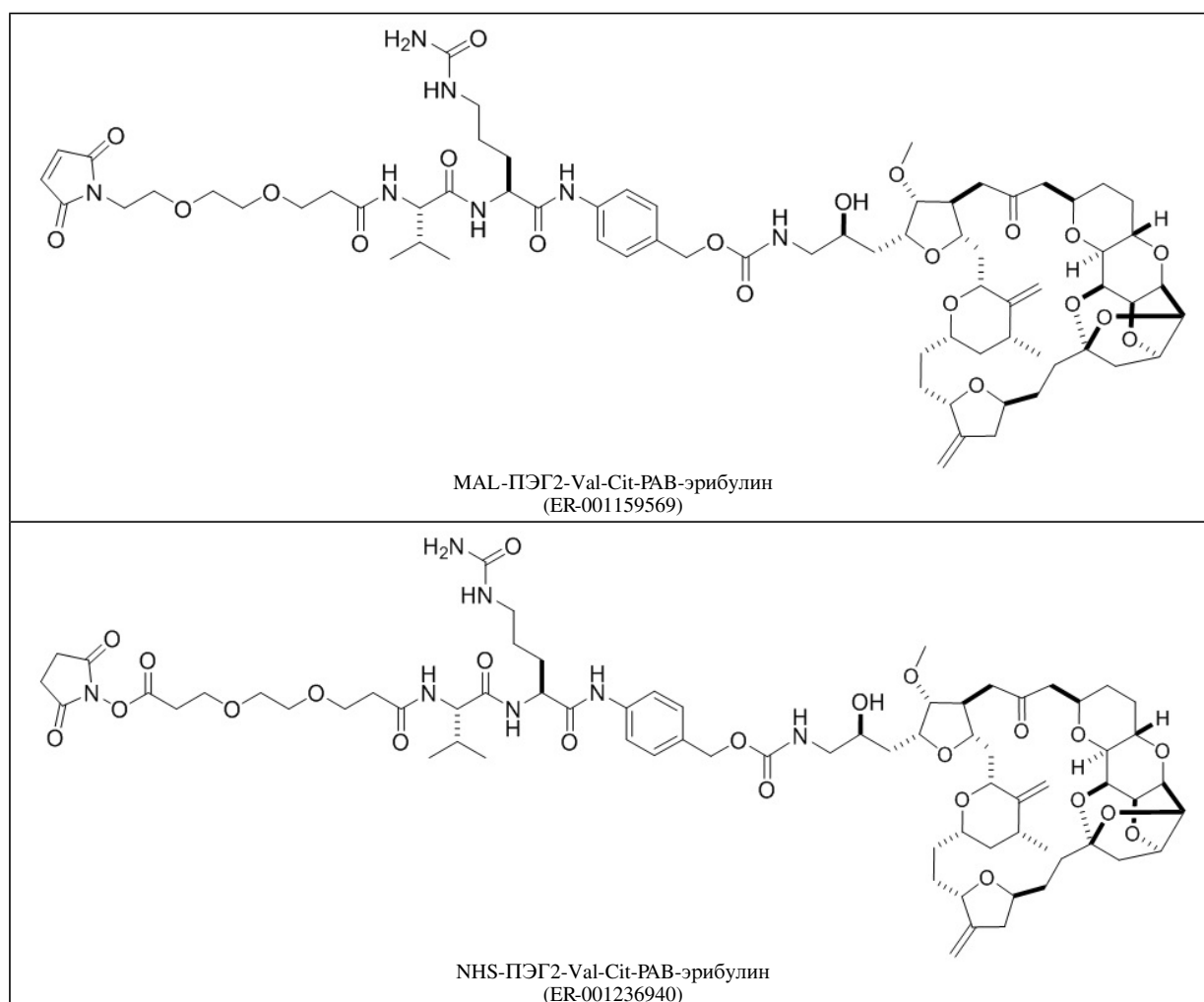
[00345] Конъюгируемые соединения эрибулина имеющие структуры, приведенные в Таблице 46, синтезировали в соответствии со следующими процедурами и применяли в приготовлении ADC (Пример 4).

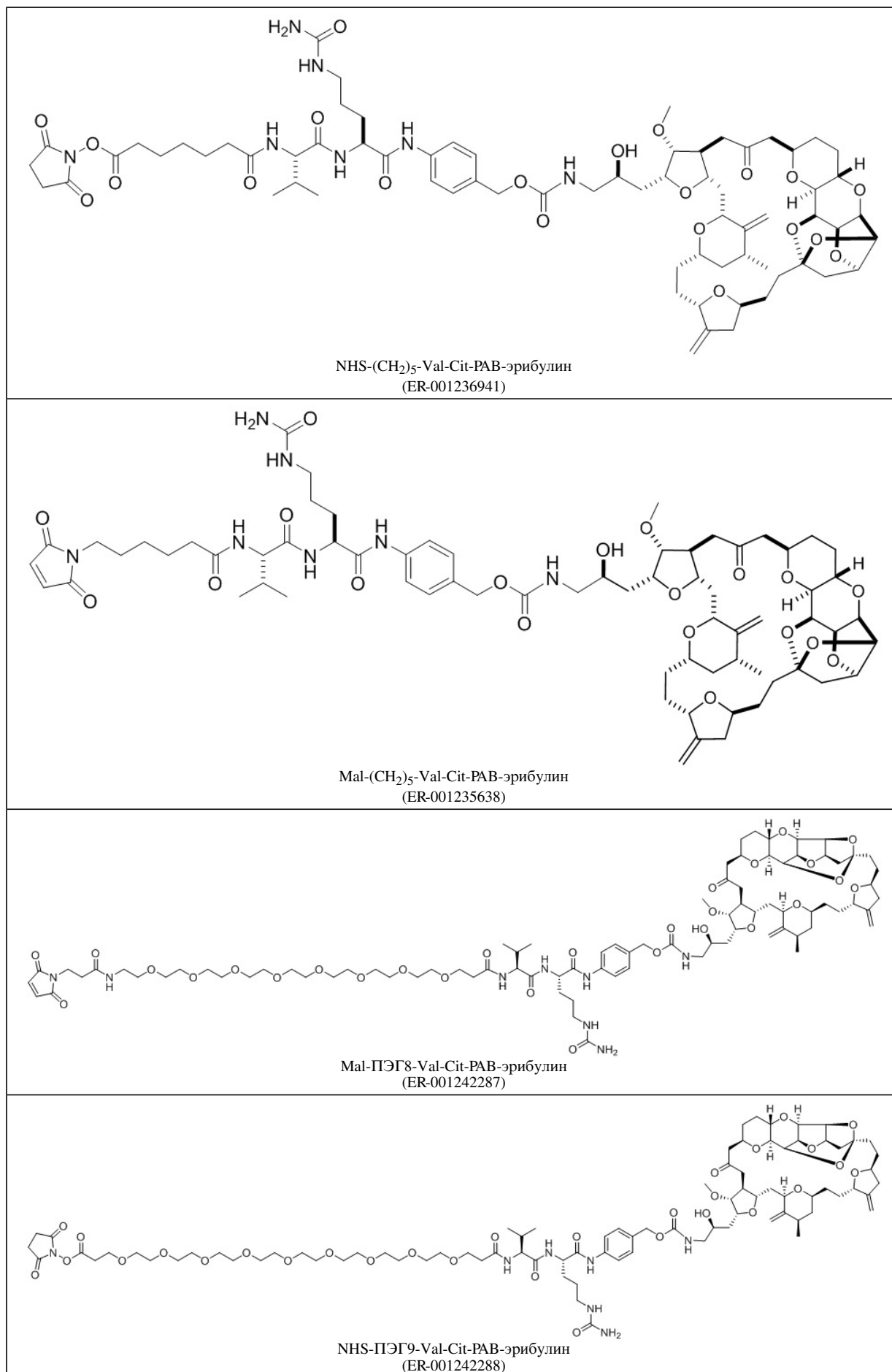
[00346] Все растворители, применяемые в реакциях синтеза, были в безводном виде (EMD Millipore). Все растворители, применяемые для клинического обследования или очистки, были степени чистоты для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (EMD Millipore). Все химические вещества были коммерчески доступными, если не указано иное. Колоночную хроматографию проводили с применением Biotage® SP4. Удаление растворителя проводили с применением либо роторного испарителя (Büchi Labortechnik AG), либо центробежного испарителя (Genevac, SP scientific).

Подготовительную жидкостную хроматографию-масс-спектрометрию (ЖХ-МС) проводили с применением Waters AutoPurification System и колонки XTerra MS C18 (5 мкм, 19 мм × 100 мм) в условиях кислой подвижной фазы. Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) были получены с применением дейтерированного хлороформа (CDCl₃),

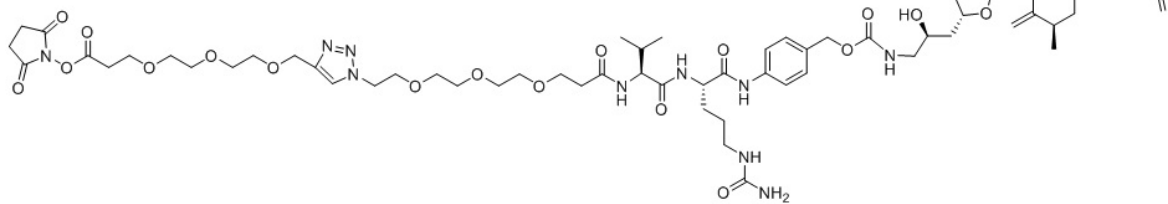
если не указано иное, и зарегистрированы при 400 или 500 МГц с применением инструмента Varian (Agilent Technologies). Масс-спектры получали с применением сверхвысокоэффективной ЖХ-МС Waters Acquity. Применяемый в данном документе термин "инертный" относится к замещению воздуха в реакторе (например, реакционном резервуаре, колбе, стеклянном реакторе) с по существу не содержащим влаги инертным газом, таким как азот или аргон. Мультиплетности указаны с применением следующих сокращений: с=синглет, д=дублет, т=триплет, кв=квартет, пентет=квинтет, секстет=секстет, м=мультиплет, дд=дублет-дублетов, ддд=дублет-дублетов-дублетов, дт=дублет-триплетов, ш. с=широкий синглет.

Таблица 46. Конъюгируемые соединения эрибулина





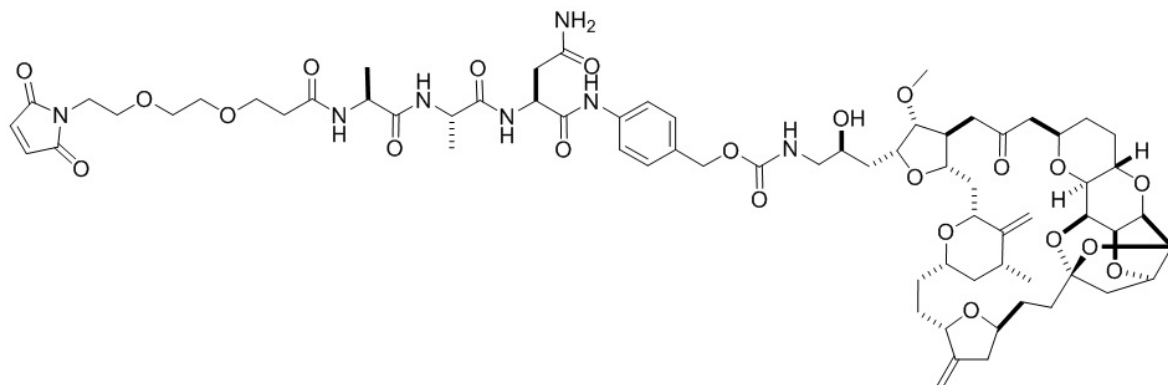
5



10

NHS-ПЭГ3-триазол-ПЭГ3-Val-Cit-РАВ-эрибулин
(ER-001243700)

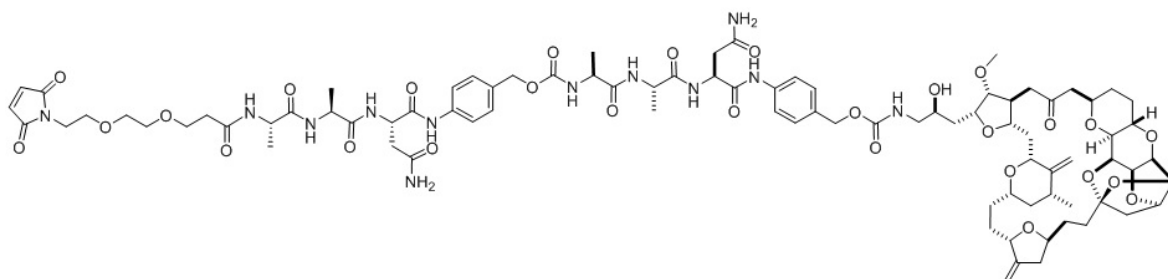
15



20

Mal-ПЭГ2-Ala-Ala-Asn-РАВ-эрибулин
(ER-001231679)

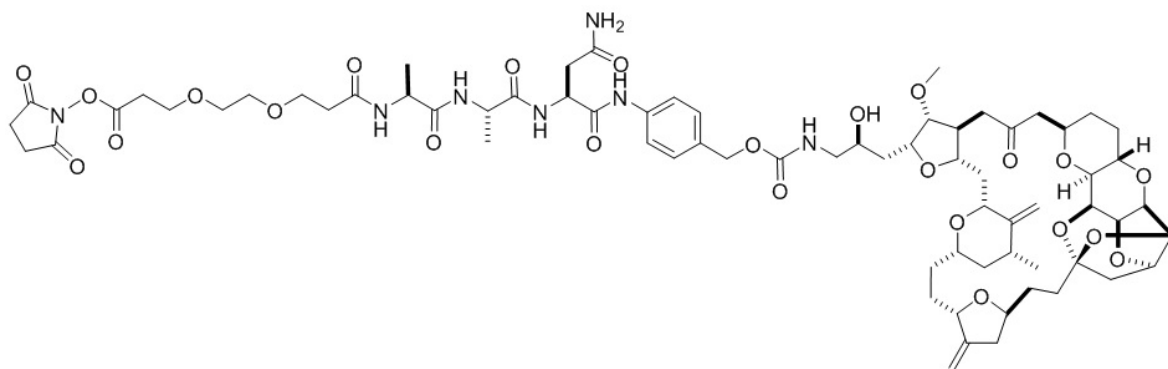
25



30

Mal-ПЭГ2-(Ala-Ala-Asn-РАВ)2-эрибулин
(ER-001231690)

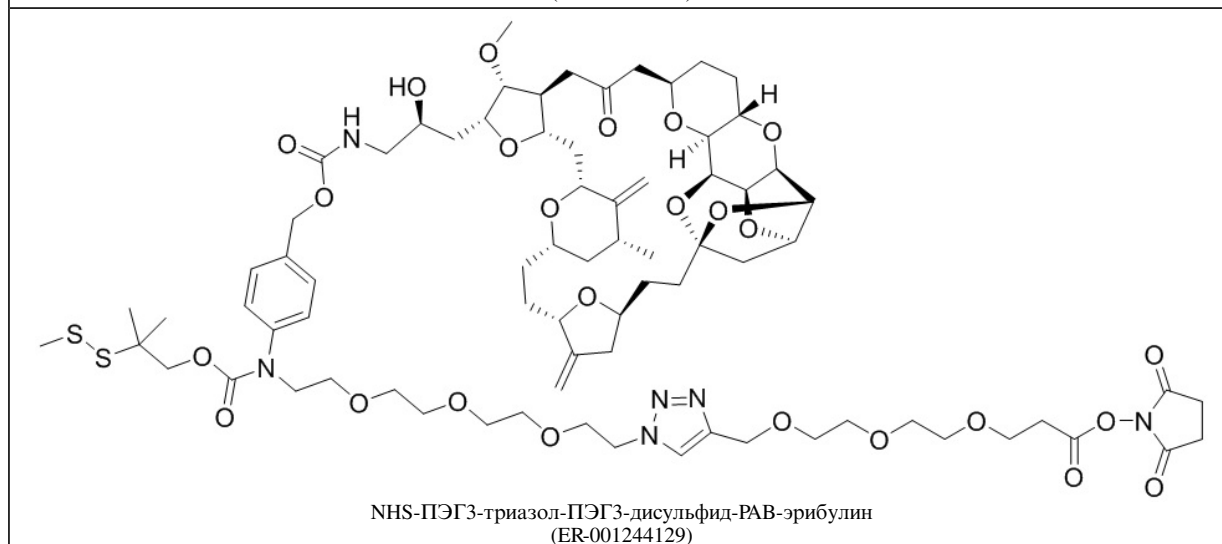
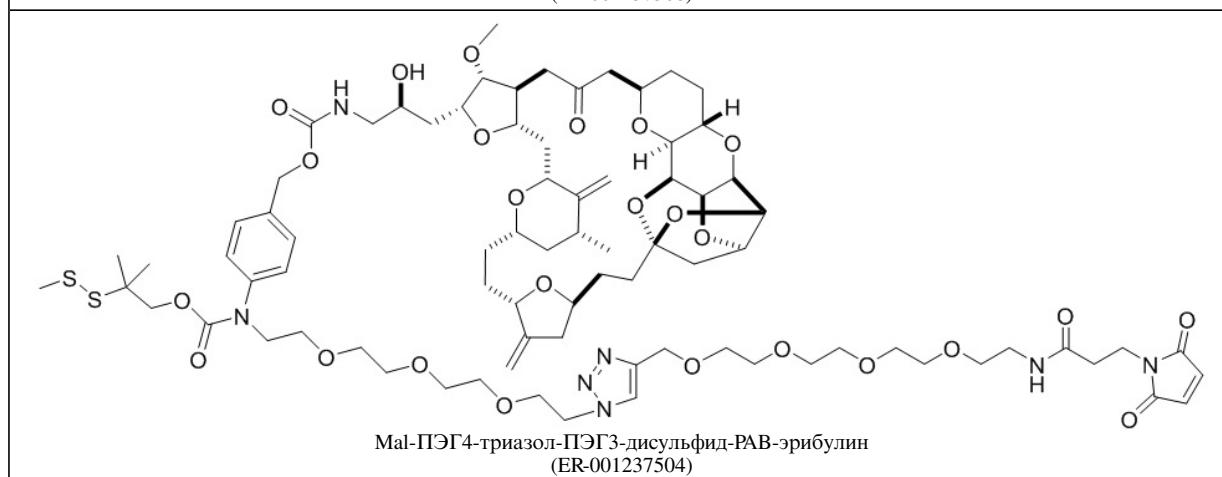
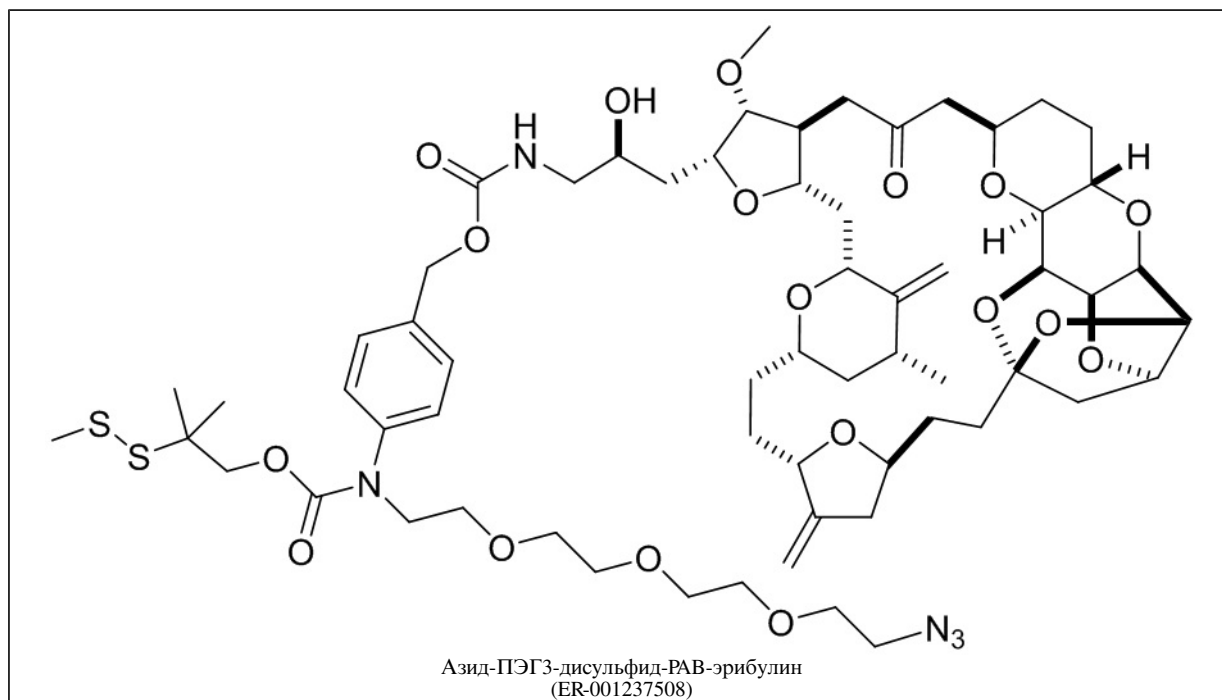
35

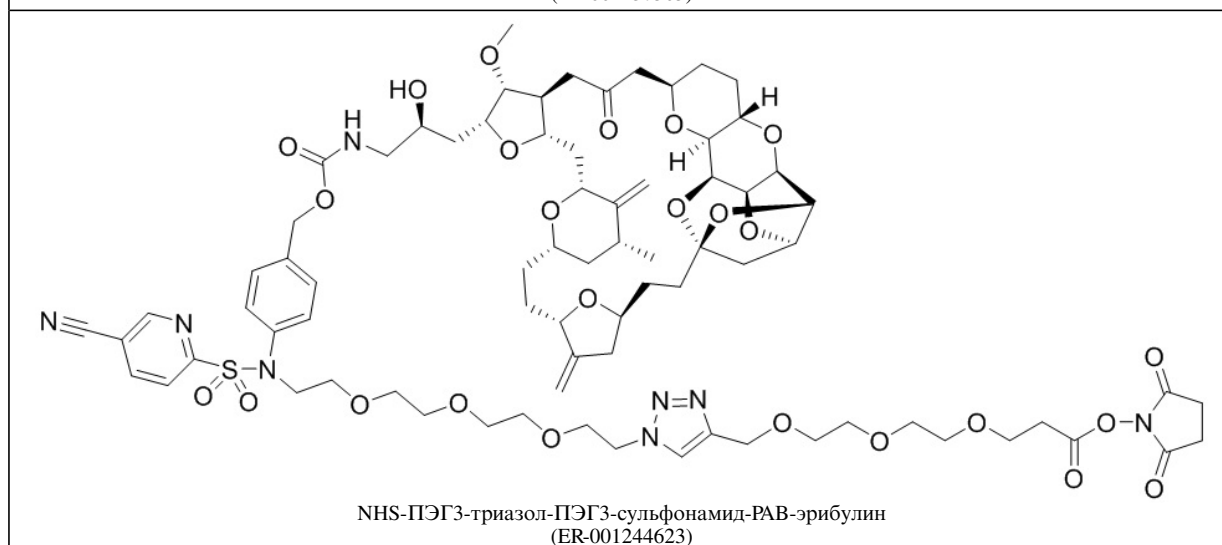
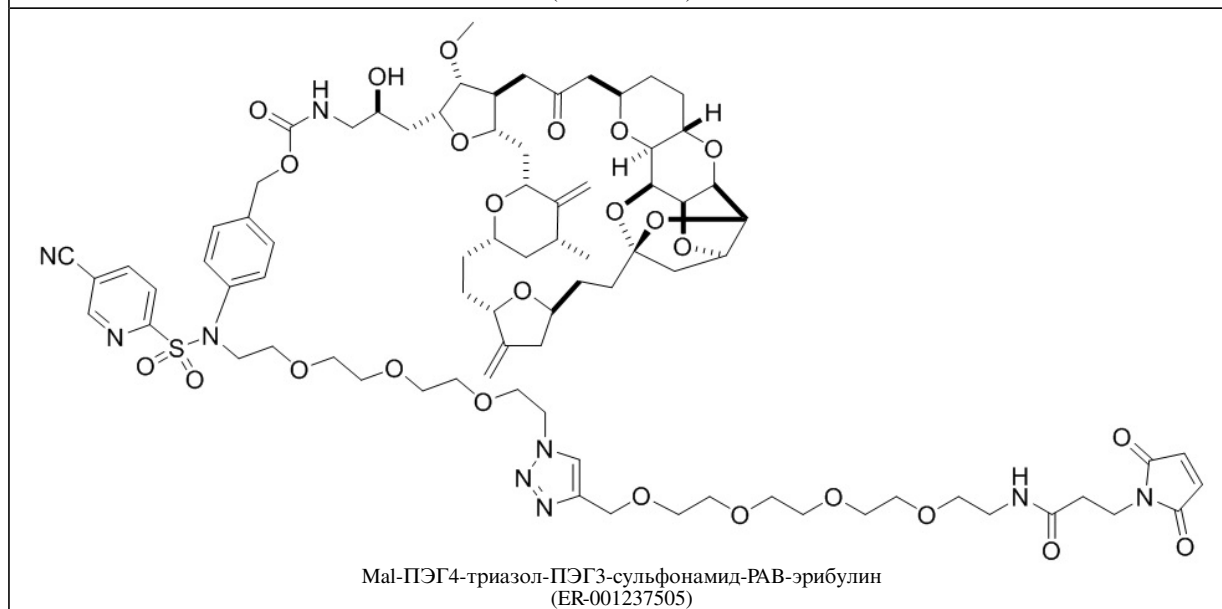
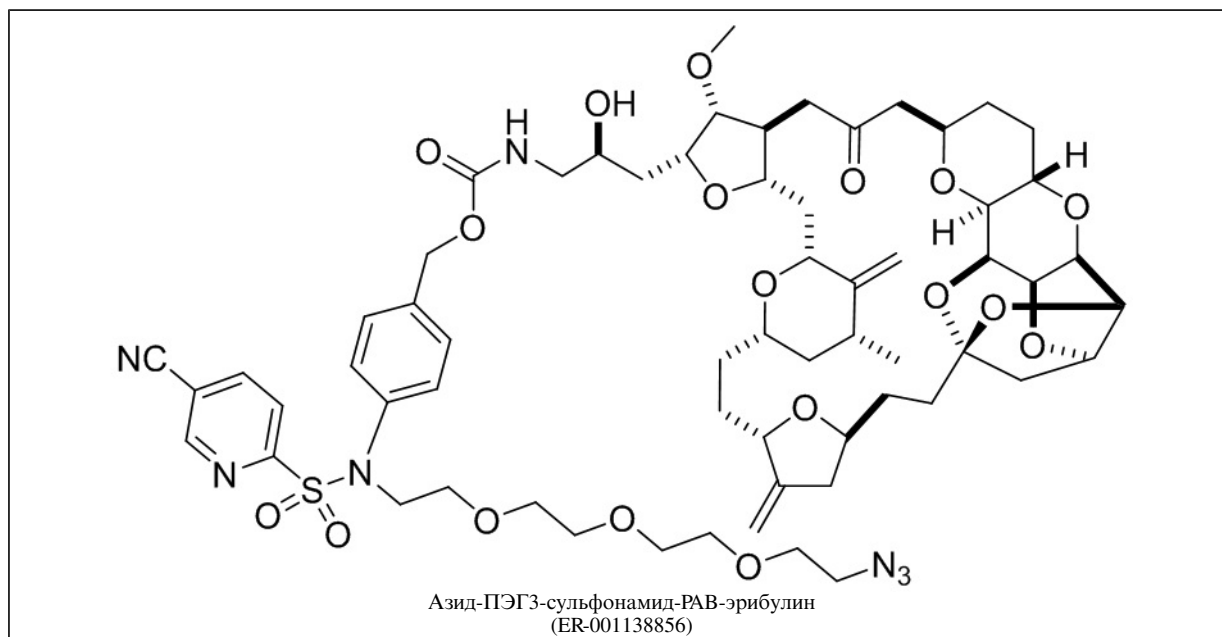


40

NHS-ПЭГ2-Ala-Ala-Asn-РАВ-эрибулин
(ER-001231691)

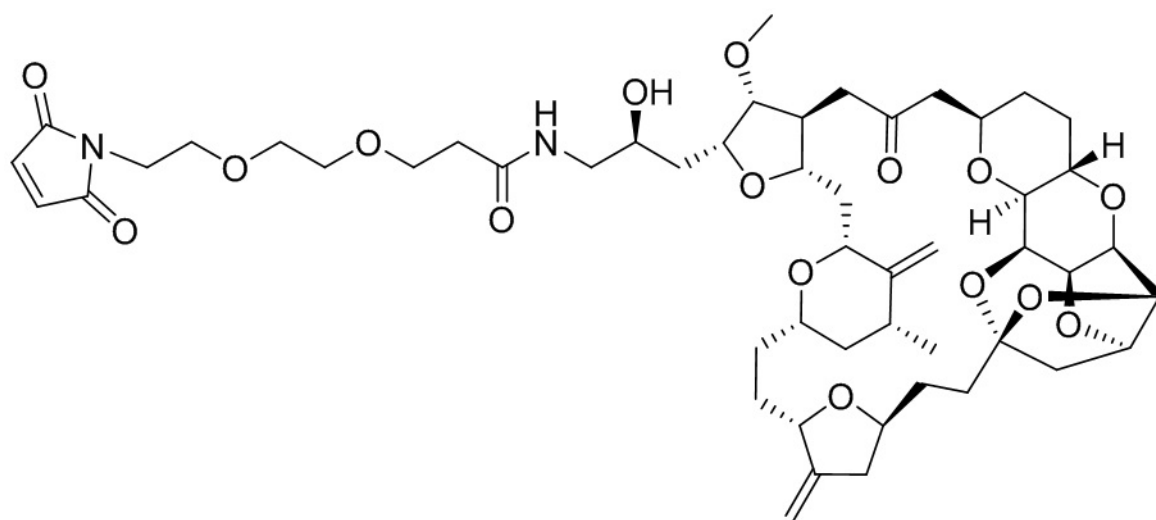
45





5

10

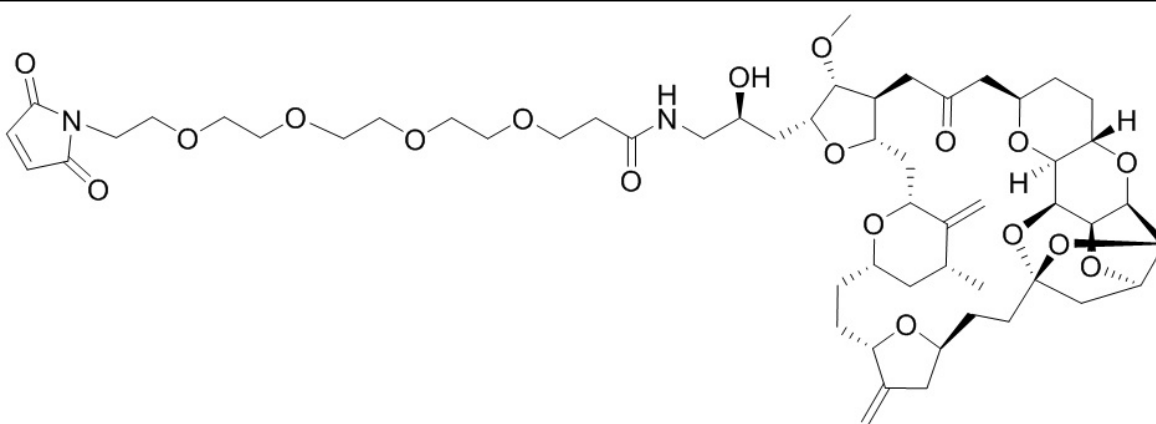


Мал-ПЭГ2-эрибулин

15

20

25

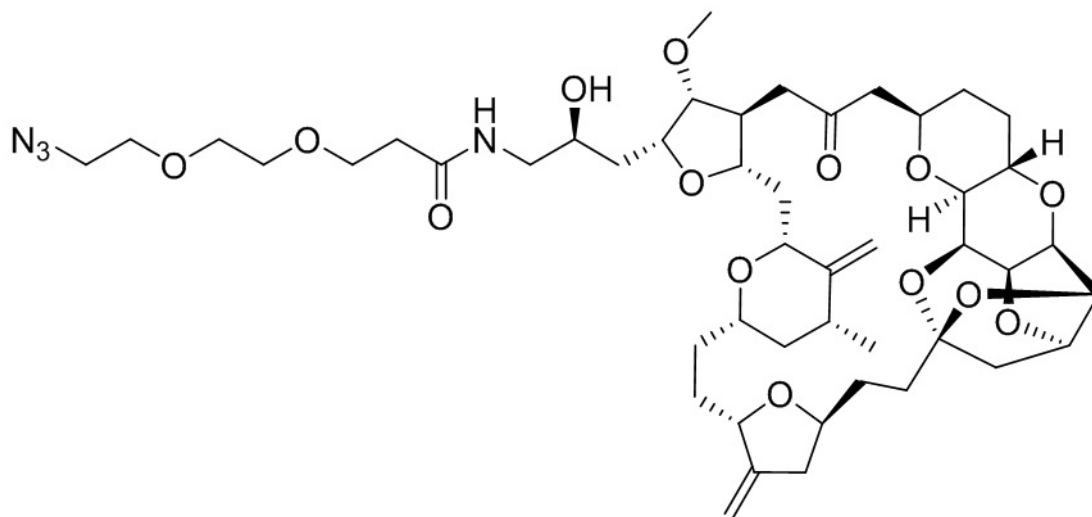


Мал-ПЭГ4-эрибулин

30

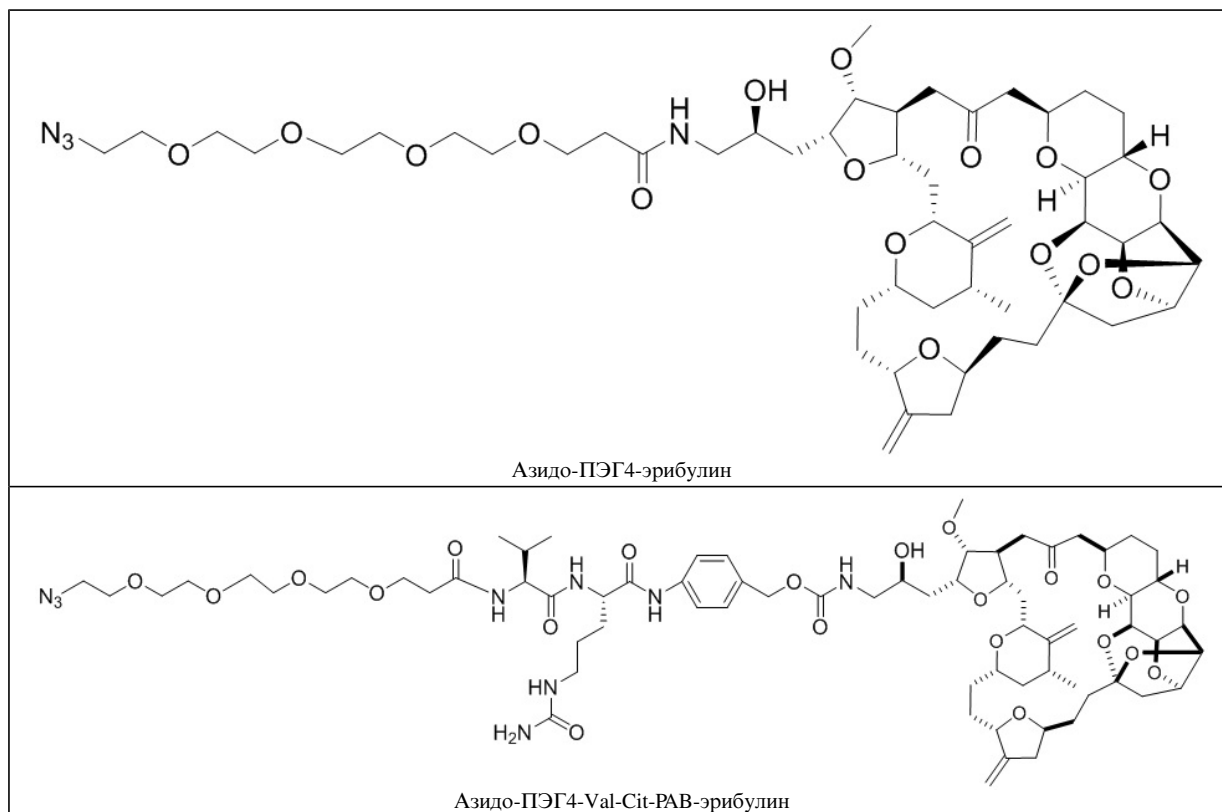
35

40



Азидо-ПЭГ2-эрибулин

45



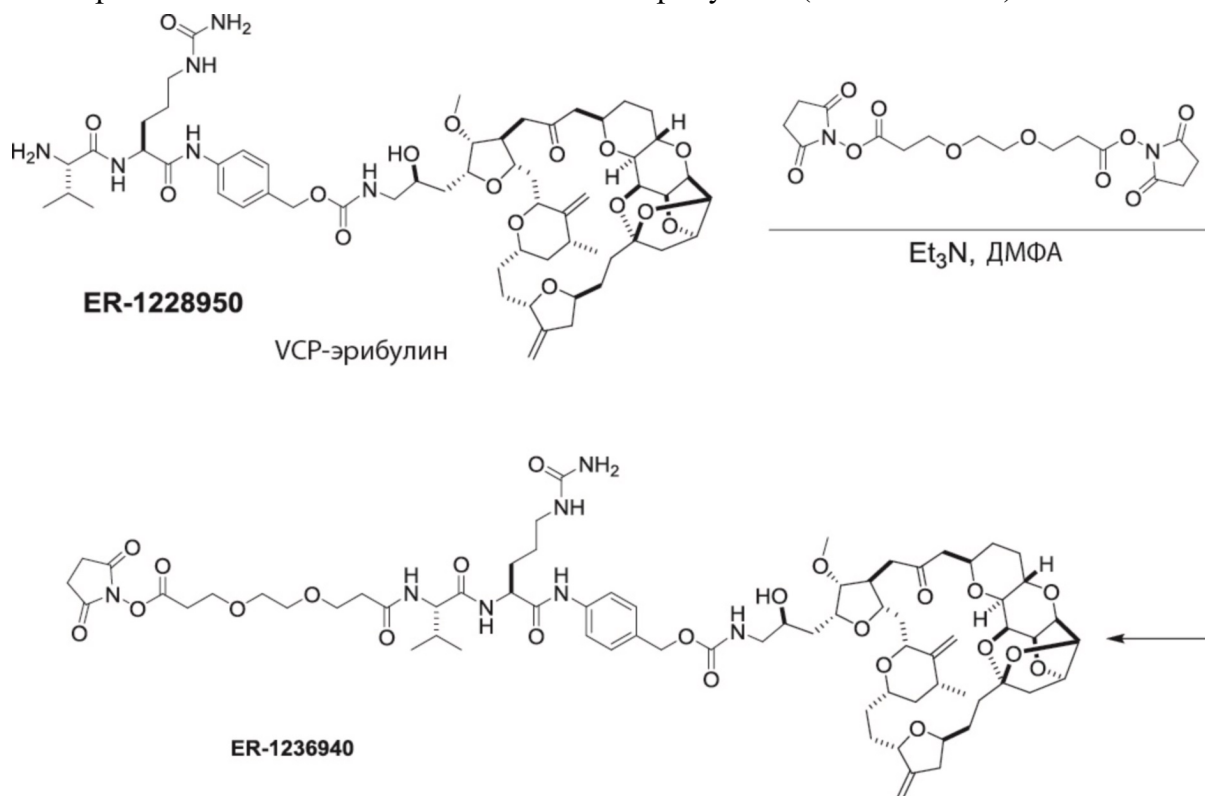
1. 1 Приготовление MAL-ПЭГ2-Val-Cit-PAB-эрибулина (ER-001159569)

[00347] Эрибулин (ER-000086526) (61,5 мг, 0,074 ммоль) растворяли в N,N-диметилформамиде (ДМФА) (6,0 мл) и затем смешивали с основанием Хунига (0,027 мл, 0,156 ммоль) и Фмок-Val-Cit-PAB-PNP (86 мг, 0,112 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов, до тех пор, пока связывание не было завершено, что было определено с помощью анализа высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). К смеси добавляли диэтиламин (0,078 мл, 0,745 ммоль) и смесь перемешивали в течение дополнительных 2 часов до завершения реакции. Растворитель удаляли выпариванием и остаток очищали с помощью флэш-хроматографии для получения Val-Cit-PAB-эрибулина (ER-001228950) в виде белого твердого вещества (60 мг, выход 71%). ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ м. д. 7,56 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,32 (д, J=8,4 Гц, 2H), 5,14 (с, 1H), 5,06 (д, J=12,4 Гц, 1H), 5,03 (с, 1H), 5,01 (д, J=12,4 Гц, 1H), 4,87 (с, 1H), 4,83 (с, 1H), 4,71 (т, J=4,4 Гц, 1H), 4,62 (т, J=4,4 Гц, 1H), 4,57 (дд, J=4,8, 8,8 Гц, 1H), 4,47 (д, J=10,8 Гц, 1H), 4,32-4,27 (м, 2H), 4,18 (дд, J=4,8, 6,4 Гц, 1H), 4,13-4,07 (м, 2H), 3,98 (т, J=10,4 Гц, 1H), 3,88-3,82 (м, 3H), 3,76-3,70 (м, 4H), 3,60 (д, J=6,0 Гц, 1H), 3,38 (с, 3H), 3,26-3,10 (м, 3H), 2,93 (дд, J=2,0, 11,2 Гц, 1H), 2,91-2,84 (м, 1H), 2,75-2,64 (м, 2H), 2,44-2,29 (м, 5H), 2,21-1,97 (м, 8H), 1,93-1,83 (м, 3H), 1,79-1,72 (м, 5H), 1,68-1,29 (м, 8H), 1,11 (д, J=6,8 Гц, 3H), 1,07-1,01 (м, 1H), 1,06 (д, J=7,2 Гц, 3H), 1,02 (д, J=7,2 Гц, 3H). ЖХ-МС (M+H) = 1135,7.

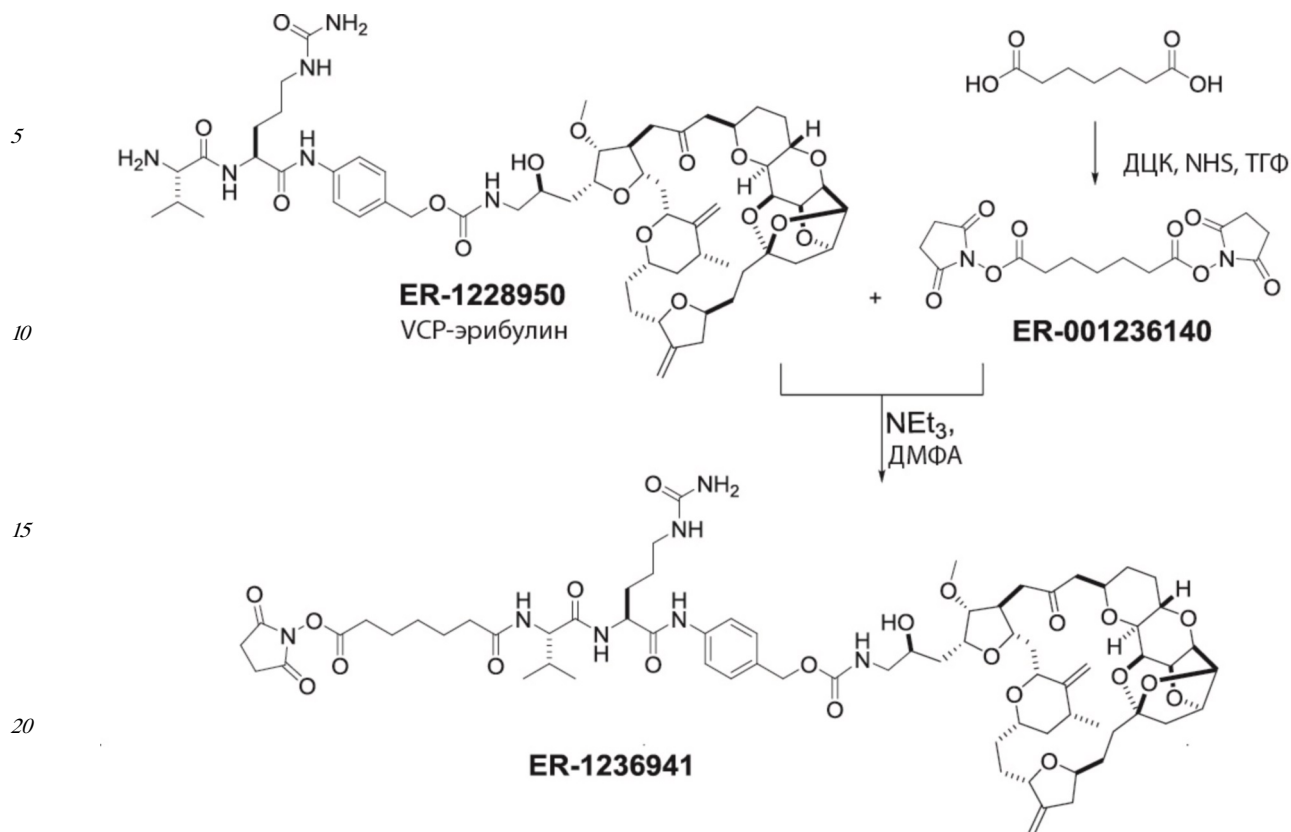
[00348] Val-Cit-PAB-эрибулин (ER-001228950) (16 мг, 14 мкмоль) растворяли в ДМФА (1 мл). N,N-диизопропилэтиламин (7,2 мкл, 41 мкмоль) и Mal-ПЭГ2-NHS (9,7 мг, 27 мкмоль) добавляли к этому раствору при комнатной температуре и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 1 часа. По завершении реакции неочищенную смесь очищали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ с применением подвижной фазы ацетонитрил-вода, содержащей 0,1% муравьиной кислоты. Собранные фракции концентрировали в вакууме при комнатной температуре на охлаждаемой водяной бане для получения Mal-ПЭГ2-Val-Cit-PAB-эрибулина (ER-001159569) (7,1 мг,

5,2 мкмоль, выход 38%). ^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) δ м. д. 7,59 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 7,31 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 6,81 (с, 2H), 5,13 (с, 1H), 5,06 (д, $J=12,4$ Гц, 1H), 5,02 (с, 1H), 5,01 (д, $J=12,4$ Гц, 1H), 4,87 (с, 1H), 4,82 (с, 1H), 4,71 (т, $J=4,0$ Гц, 1H), 4,61 (т, $J=4,4$ Гц, 1H), 4,50 (дд, $J=5,2, 9,2$ Гц, 1H), 4,47 (д, $J=10,8$ Гц, 1H), 4,32-4,27 (м, 2H), 4,19 (дд, $J=6,8, 11,6$ Гц, 1H), 4,13-4,07 (м, 2H), 3,98 (т, $J=10,4$ Гц, 1H), 3,88-3,82 (м, 3H), 3,76-3,64 (м, 6H), 3,62-3,51 (м, 6H), 3,38 (с, 3H), 3,22-3,08 (м, 4H), 2,93 (дд, $J=2,4, 9,6$ Гц, 1H), 2,92-2,84 (м, 1H), 2,76-2,63 (м, 2H), 2,52 (т, $J=6,0$ Гц, 2H), 2,44-2,29 (м, 5H), 2,21-1,97 (м, 8H), 1,93-1,83 (м, 3H), 1,80-1,66 (м, 5H), 1,66-1,28 (м, 10H), 1,11 (д, $J=6,4$ Гц, 3H), 1,07-1,01 (м, 1H), 0,99 (д, $J=6,8$ Гц, 3H), 0,97 (д, $J=6,4$ Гц, 3H). ЖХ-МС ($M+H$) = 1374,9.

1. 2 Приготовление NHS-ПЭГ2-Val-Cit-РАВ-эрибулина (ER-001236940)



[00349] Val-Cit-РАВ-эрибулин (ER-001228950) (45 мг, 0,04 ммоль) и бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил) 3,3'-(этан-1,2-диилбис(окси))дипропаноат (79 мг, 0,198 ммоль) смешивали в ДМФА (1,5 мл) и затем добавляли Et_3N (44,2 мкл, 0,317 ммоль). Смесь перемешивали в течение 18 часов до завершения реакции, что было определено с помощью анализа ВЭЖХ. Растворитель выпаривали и остаток очищали с помощью флэш-хроматографии для получения NHS-ПЭГ2-Val-Cit-РАВ-эрибулина (ER-001236940) в виде белого твердого вещества (38 мг, выход 68%). ^1H ЯМР (400 МГц, CD_3OD) δ м. д. 7,58 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 7,33 (д, $J=8,4$ Гц, 2H), 5,14 (с, 1H), 5,05 (д, $J=12,4$ Гц, 1H), 5,03 (с, 1H), 5,01 (д, $J=12,4$ Гц, 1H), 4,87 (с, 1H), 4,83 (с, 1H), 4,71 (т, $J=4,4$ Гц, 1H), 4,62 (т, $J=4,4$ Гц, 1H), 4,51 (дд, $J=4,8, 8,8$ Гц, 1H), 4,50-4,47 (м, 1H), 4,32-4,27 (м, 2H), 4,21 (дд, $J=4,8, 6,4$ Гц, 1H), 4,14-4,08 (м, 2H), 3,99 (т, $J=10,4$ Гц, 1H), 3,88-3,82 (м, 3H), 3,78-3,70 (м, 4H), 3,62 (с, 2H), 3,62-3,58 (м, 1H), 3,50-3,46 (м, 2H), 3,39 (с, 4H), 3,36 (с, 3H), 3,22-3,08 (м, 3H), 2,93 (дд, $J=2,0, 11,2$ Гц, 1H), 2,91-2,87 (м, 1H), 2,84 (с, 2H), 2,80 (с, 2H), 2,75-2,64 (м, 2H), 2,59-2,52 (м, 2H), 2,44-2,29 (м, 5H), 2,21-1,97 (м, 10H), 1,93-1,83 (м, 3H), 1,79-1,72 (м, 5H), 1,68-1,29 (м, 8H), 1,11 (д, $J=6,8$ Гц, 3H), 1,08-0,98 (м, 1H), 1,00 (д, $J=7,2$ Гц, 3H), 0,98 (д, $J=7,2$ Гц, 3H). ЖХ-МС ($M+H$) = 1421,0.

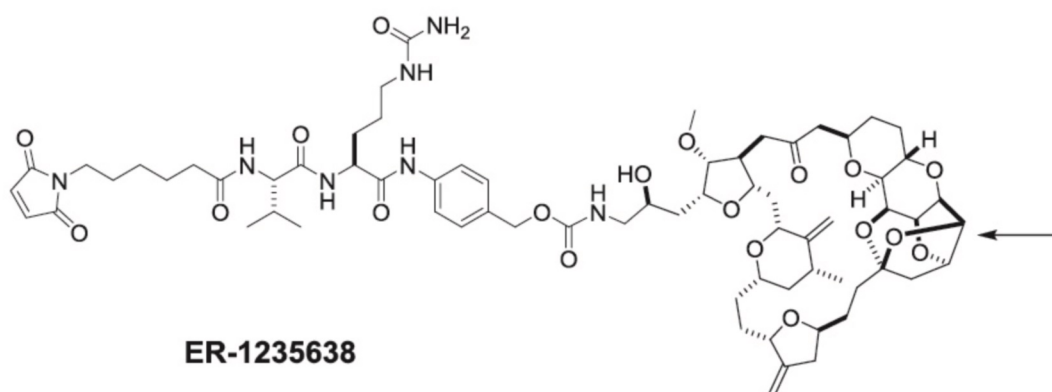
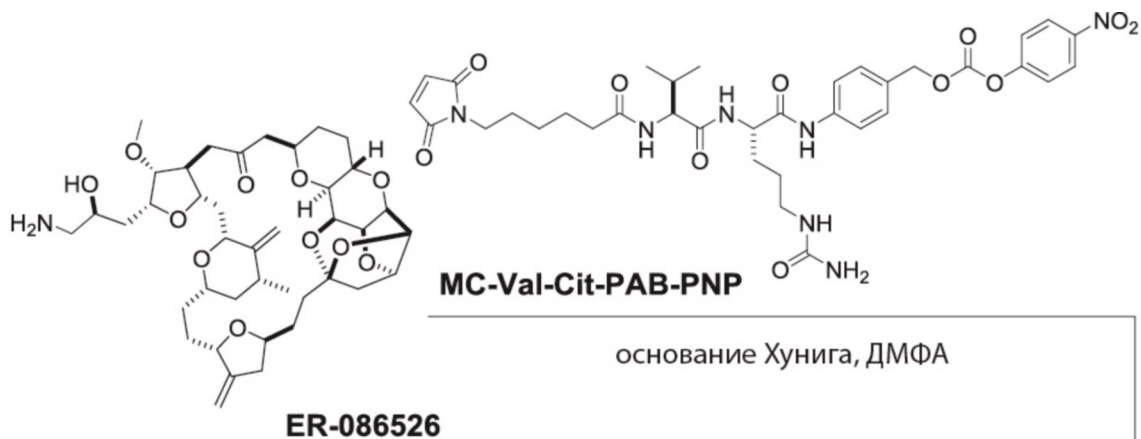
1. 3 Приготовление NHS-(CH₂)₅-Val-Cit-PAB-эрибулина (ER-001236941)

[00350] Пимелиновую кислоту (1,6 г, 9,99 ммоль) растворяли в тетрагидрофуране (ТГФ) (100 мл) и затем добавляли 1-гидроксипирролидин-2,5-дион (2,299 г, 19,98 ммоль) с последующим добавлением ДЦК (4,12 г, 19,98 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов, пока анализ ВЭЖХ не показал завершение реакции. Твердое вещество удаляли с помощью фильтрования через целитовую прокладку и промывали ТГФ (3 × 2 мл). Объединенный фильтрат концентрировали и очищали с помощью флэш-хроматографии для получения бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил) гептанedioата (ER-001236140) в виде белого твердого вещества (2,5 г, выход 71%).

¹H ЯМР (400 МГц) δ м. д. 2,83 (с, 8H), 2,64 (т, J=7,6 Гц, 4H), 1,80 (дт, J=7,6 Гц, 4H), 1,59-1,51 (м, 2H). ЖХ-МС (M+H) = 355,2.

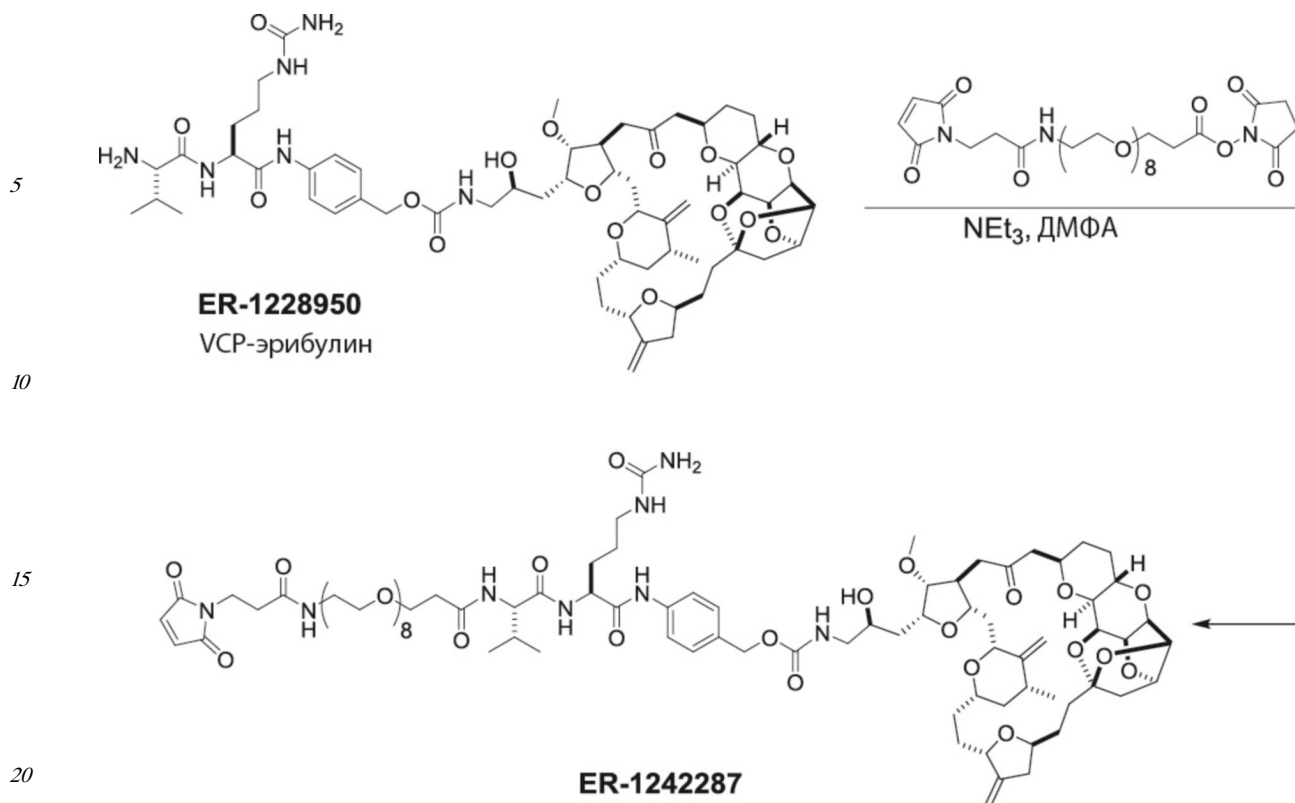
[00351] NHS-(CH₂)₅-Val-Cit-PAB-эрибулин (ER-001236941) был получен (8,5 мг, выход 47%) из VCP-эрибулина (ER-001228950) и бис(2,5-диоксопирролидин-1-ил) гептанedioата (ER-001236140) с применением той же процедуры, что описана выше для приготовления NHS-ПЭГ2-Val-Cit-PAB-эрибулина (ER-001236940). ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ м. д. 7,56 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,30 (д, J=8,4 Гц, 2H), 5,13 (с, 1H), 5,04 (д, J=12,0 Гц, 1H), 5,01 (с, 1H), 5,00 (д, J=12,4 Гц, 1H), 4,86 (с, 1H), 4,82 (с, 1H), 4,70 (т, J=4,4 Гц, 1H), 4,60 (т, J=4,4 Гц, 1H), 4,50 (дд, J=4,8, 8,8 Гц, 1H), 4,46 (д, J=10,8 Гц, 1H), 4,36-4,25 (м, 2H), 4,17 (дд, J=4,8, 6,4 Гц, 1H), 4,13-4,06 (м, 2H), 3,97 (т, J=10,4 Гц, 1H), 3,87-3,80 (м, 3H), 3,74-3,68 (м, 2H), 3,37 (с, 3H), 3,20-3,06 (м, 4H), 2,94 (дд, J=2,0, 11,2 Гц, 1H), 2,90-2,82 (м, 1H), 2,82 (с, 4H), 2,74-2,65 (м, 2H), 2,61 (т, J=8,0 Гц, 2H), 2,46-2,26 (м, 7H), 2,24-1,81 (м, 13H), 1,78-1,28 (м, 19H), 1,10 (д, J=6,8 Гц, 3H), 1,06-0,96 (м, 1H), 0,97 (д, J=7,2 Гц, 3H), 0,95 (д, J=7,2 Гц, 3H). ЖХ-МС (M+H) = 1375,1.

1. 4 Приготовление Mal-(CH₂)₅-Val-Cit-PAB-эрибулина (ER-001235638)



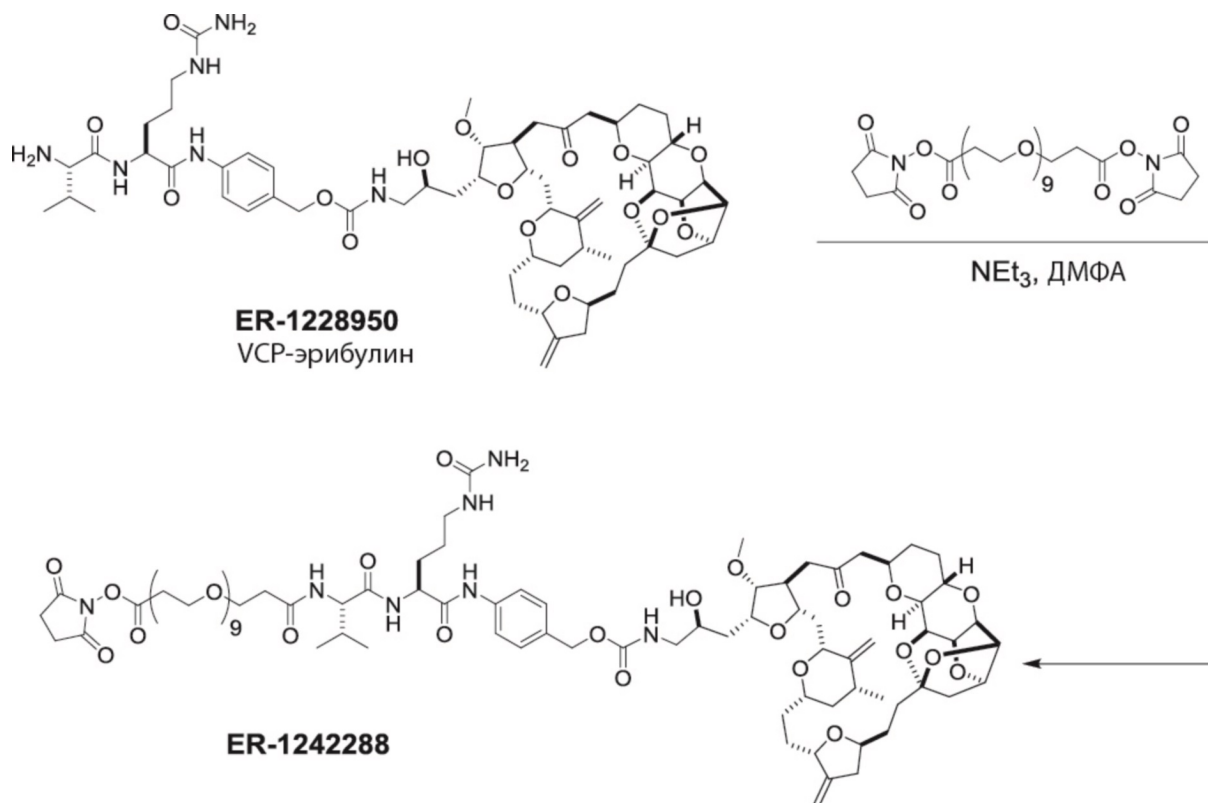
[00352] Эрибулин (ER-000086526) (10 мг, 0,012 ммоль) растворяли в ДМФА (1 мл) и смешивали с MC-Val-Cit-PAB-PNP (9,02 мг, 0,012 ммоль) и основанием Хунига (4,44 мкл, 0,025 ммоль). Затем смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 часов, пока анализ ВЭЖХ не показал завершение реакции. Реакционную смесь концентрировали и очищали с помощью флеш-хроматографии для получения Mal-(CH₂)₅-Val-Cit-PAB-эрибулина (ER-001235638) в виде белого твердого вещества (11,3 мг, выход 63%). ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ м. д. 7,57 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,31 (д, J=8,4 Гц, 2H), 6,79 (с, 2H), 5,13 (с, 1H), 5,05 (д, J=12,4 Гц, 1H), 5,02 (с, 1H), 5,00 (д, J=12,4 Гц, 1H), 4,87 (с, 1H), 4,83 (с, 1H), 4,71 (т, J=4,4 Гц, 1H), 4,61 (т, J=4,4 Гц, 1H), 4,56-4,46 (м, 3H), 4,35-4,27 (м, 2H), 4,20-4,07 (м, 4H), 3,98 (т, J=10,8 Гц, 1H), 3,87-3,83 (м, 3H), 3,73-3,70 (м, 2H), 3,48 (т, J=7,6 Гц, 2H), 3,38 (с, 3H), 3,20-3,08 (м, 4H), 2,93 (дд, J=1,6, 9,6 Гц, 1H), 2,89-2,85 (м, 1H), 2,69 (дт, J=11,2, 16,8 Гц, 2H), 2,44-2,33 (м, 5H), 2,27-1,83 (м, 13H), 1,78-1,68 (м, 5H), 1,66-1,27 (м, 14H), 1,11 (д, J=7,2 Гц, 3H), 1,07-0,98 (м, 1H), 0,98 (д, J=7,2 Гц, 3H), 0,96 (д, J=7,2 Гц, 3H). ЖХ-МС (M+H)=1328,9.

1. 5 Приготовление Mal-ПЭГ8-Val-Cit-PAB-эрибулина (ER-001242287)



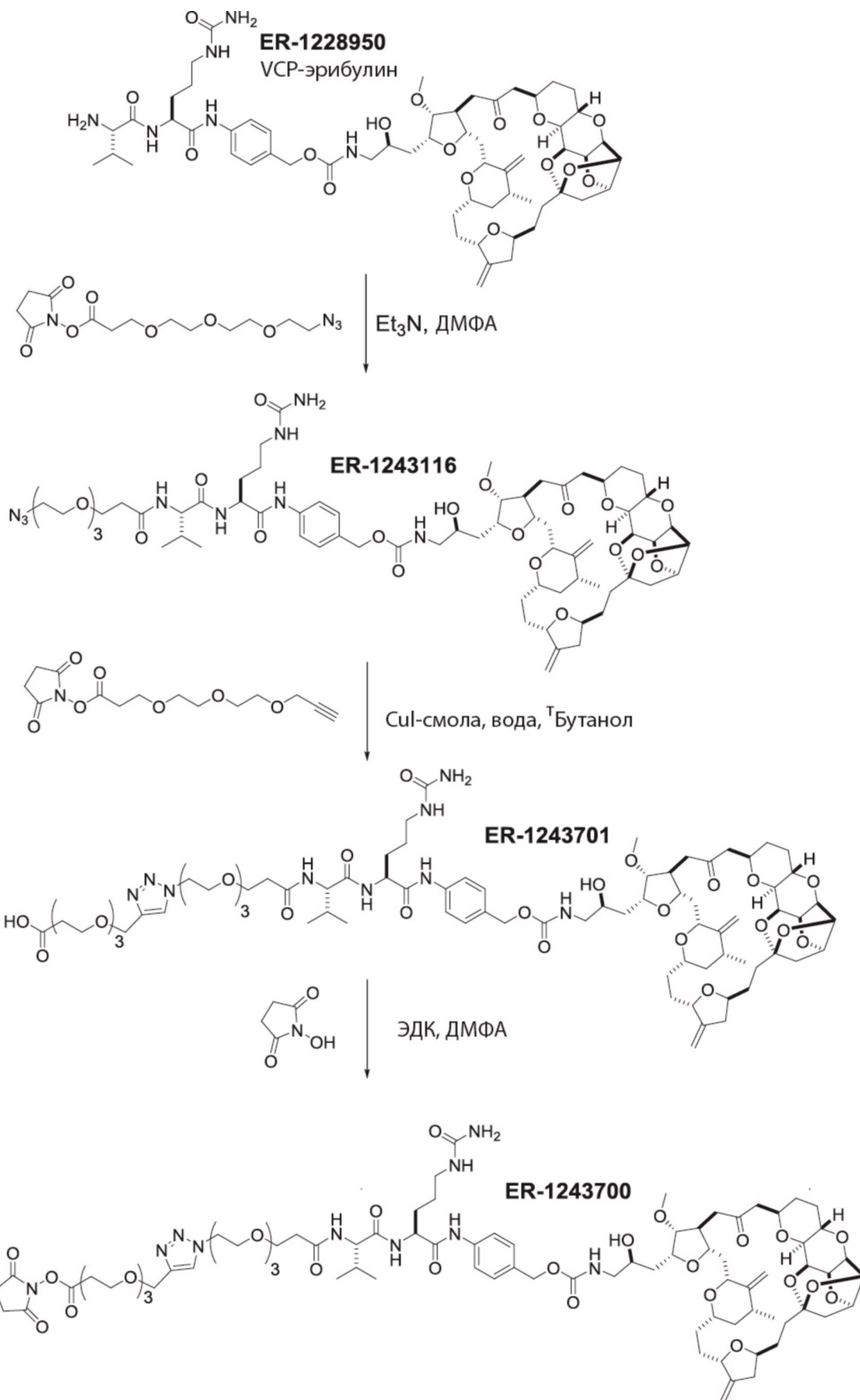
[00353] VCP-эрибулин (ER-001228950) (10 мг, 8,808 мкмоль) и 2,5-диоксопирролидин-1-ил 1-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)-3-оксо-7,10,13,16,19,22,25,28-октаокса-4-азагептриаконтан-31-оат (6,07 мг, 8,808 мкмоль) смешивали с ДМФА (1 мл) с последующим добавлением Et₃N (9,82 мкл, 0,07 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов, пока анализ ВЭЖХ не показал завершение реакции. Растворитель удаляли выпариванием и остаток очищали с помощью флэш-хроматографии для получения Mal-ПЭГ8-Val-Cit-PAВ-эрибулина (ER-001242287) в виде белого твердого вещества (3,0 мг, выход 20%). ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ м. д. 7,58 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,29 (д, J=8,4 Гц, 2H), 6,80 (с, 2H), 5,12 (с, 1H), 5,04 (д, J=12,4 Гц, 1H), 5,01 (с, 1H), 4,99 (д, J=12,4 Гц, 1H), 4,85 (с, 1H), 4,80 (с, 1H), 4,69 (т, J=4,4 Гц, 1H), 4,59 (т, J=4,4 Гц, 1H), 4,50-4,42 (м, 2H), 4,32-4,24 (м, 2H), 4,20-4,14 (м, 2H), 4,12-4,04 (м, 3H), 3,96 (т, J=10,4 Гц, 1H), 3,86-3,80 (м, 3H), 3,76-3,57 (м, 4H), 3,48 (т, J=6,0 Гц, 1H), 3,36 (с, 3H), 3,20-3,08 (м, 3H), 2,91 (дд, J=2,0, 11,2 Гц, 1H), 2,90-2,82 (м, 1H), 2,74-2,60 (м, 2H), 2,44-2,29 (м, 5H), 2,21-1,97 (м, 10H), 1,93-1,83 (м, 3H), 1,79-1,20 (м, 19H), 1,09 (д, J=6,8 Гц, 3H), 1,04-0,98 (м, 1H), 0,99 (д, J=7,2 Гц, 3H), 0,97 (д, J=7,2 Гц, 3H). ЖХ-МС (M+H) =1711,6.

1. 6 Приготовление NHS-ПЭГ9-Val-Cit-PAВ-эрибулина (ER-001242288)



[00354] NHS-ПЭГ9-Val-Cit-РАВ-эрибулин (ER-001242288) был получен (13 мг, выход 85%) из VCP-эрибулина (ER-001228950) и БисNHS-ПЭГ9 с применением той же процедуры, что описана выше для приготовления NHS-ПЭГ2-Val-Cit-РАВ-эрибулина (ER-001236940). ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ м. д. 7,61 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,32 (д, J=8,4 Гц, 2H), 5,16 (с, 1H), 5,06 (д, J=12,4 Гц, 1H), 5,01 (с, 1H), 5,00 (д, J=12,4 Гц, 1H), 4,87 (с, 1H), 4,82 (с, 1H), 4,71 (т, J=4,4 Гц, 1H), 4,61 (т, J=4,4 Гц, 1H), 4,52-4,45 (м, 2H), 4,34-4,26 (м, 2H), 4,20-4,19 (м, 1H), 4,14-4,06 (м, 2H), 3,98 (т, J=10,4 Гц, 1H), 3,88-3,80 (м, 3H), 3,76-3,70 (м, 4H), 3,66-3,58 (м, 37H), 3,38 (с, 3H), 3,24-3,10 (м, 3H), 2,93 (дд, J=2,0, 11,2 Гц, 1H), 2,91-2,84 (м, 1H), 2,84 (с, 4H), 2,76-2,64 (м, 2H), 2,58-2,50 (м, 4H), 2,46-2,28 (м, 5H), 2,22-1,96 (м, 8H), 1,91-1,82 (м, 3H), 1,79-1,68 (м, 5H), 1,64-1,24 (м, 8H), 1,11 (д, J=6,8 Гц, 3H), 1,08-0,96 (м, 1H), 0,99 (д, J=7,2 Гц, 3H), 0,97 (д, J=7,2 Гц, 3H). ЖХ-МС (M+H)=1729,7.

1. 7 Приготовление NHS-ПЭГ3-триазол-ПЭГ3-Val-Cit-РАВ-эрибулина (ER-001243700)



[00355] VCP-эрибулин (ER-001228950) (25 мг, 0,022 ммоль) растворяли в ДМФА (2,5 мл) и затем смешивали с Et₃N (24,55 мкл, 0,176 ммоль) и азид-ПЭГ3-NHS (8,34 мг, 0,024 ммоль). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов, пока

анализ ВЭЖХ не показал завершение реакции. Смесь концентрировали в вакууме и остаток очищали препаративной ВЭЖХ (MeCN и вода с 0,1% муравьиной кислотой). Фракции, содержащие азид-ПЭГ3-Val-Cit-PAВ-эрибулин, экстрагировали дихлорметаном (CH₂Cl₂) (3×20 мл), а CH₂Cl₂ выпаривали для получения азид-ПЭГ3-Val-Cit-PAВ-

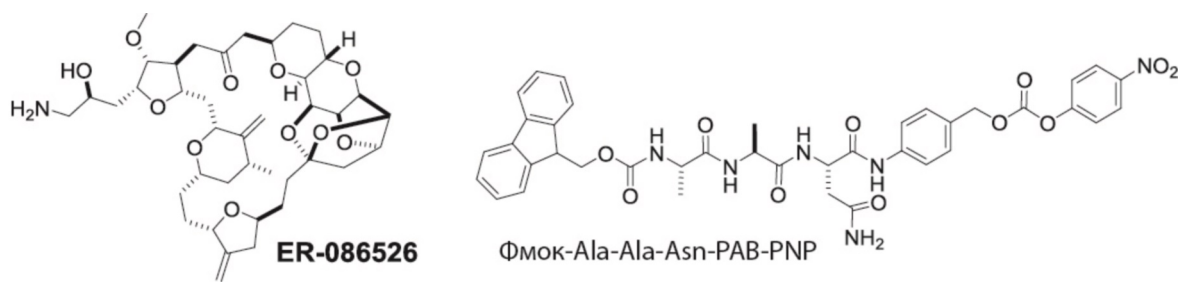
эрибулина (ER-001243116) в виде белого твердого вещества (18,9 мг, выход 63%). ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ м. д. 7,58 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,30 (д, J=8,4 Гц, 2H), 5,14 (с, 1H), 5,04 (д, J=12,4 Гц, 1H), 5,03 (с, 1H), 5,01 (д, J=12,4 Гц, 1H), 4,85 (с, 1H), 4,81 (с, 1H), 4,70 (т, J=4,4 Гц, 1H), 4,61 (т, J=4,4 Гц, 1H), 4,52-4,48 (м, 2H), 4,31-4,25 (м, 2H), 4,20-4,15 (м, 1H), 4,13-4,07 (м, 2H), 3,99 (м, J=10,4 Гц, 1H), 3,84-3,79 (м, 3H), 3,77-3,65 (м, 4H), 3,64-3,56 (м, 13H), 3,38 (с, 3H), 3,20-3,05 (м, 3H), 2,95-2,80 (м, 2H), 2,75-2,60 (м, 2H), 2,55-2,50 (м, 2H), 2,43-2,25 (м, 5H), 2,21-1,97 (м, 8H), 1,93-1,83 (м, 3H), 1,79-1,72 (м, 5H), 1,68-1,29 (м, 10H), 1,08 (д, J=6,8 Гц, 3H), 1,05-0,95 (м, 1H), 0,98 (д, J=7,2 Гц, 3H), 0,95 (д, J=7,2 Гц, 3H). ЖХ-МС (M+H)=1365,1.

[00356] Азид-ПЭГ3-VCP-эрибулин (ER-001243116) (9,6 мг, 7,035 мкмоль) и 2,5-диоксипирролидин-1-ил 3-(2-(2-(проп-2-ин-1-илокси)этокси)этокси)пропаноат (6,61 мг, 0,021 ммоль) смешивали в воде (0,6 мл) и т-бутаноле (1,8 мл). Смесь барботировали с N₂ в течение 45 мин. К смеси добавляли йодид меди на амберлист-21 (1,23 ммоль/г, 10 мг) и через смесь барботировали N₂ в течение следующих 30 мин. Затем реакцию смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 72 часов до полного потребления исходного материала. С помощью ЖХ-МС не было обнаружено никакого желаемого продукта сложного эфира NHS, а только гидролизованную карбоновую кислоту. Смесь фильтровали через короткую целитовую прокладку для удаления смолы CuI. Фильтрат концентрировали в вакууме и полученный остаток очищали препаративной тонкослойной хроматографией (преп-ТСХ) (20% MeOH/CH₂Cl₂) для получения кислоты-ПЭГ3-триазол-ПЭГ3-Val-Cit-PAВ-эрибулина (ER-001243701) в виде белого твердого вещества (3,7 мг, выход 33%). ЖХ-МС (ES) (M+H)=1581,2.

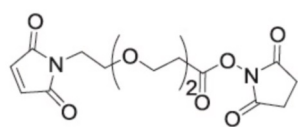
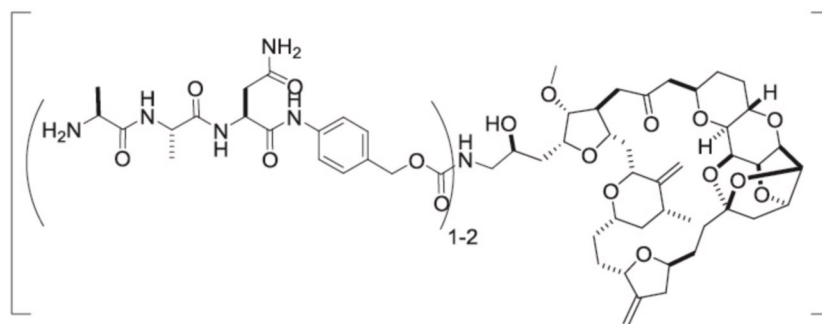
[00357] Кислота-ПЭГ3-триазол-PEG3-Val-Cit-PAВ-эрибулин (ER-001243701) (3,0 мг, 1,898 мкмоль) растворяли в ДМФА (200 мкл) и добавляли 1-гидроксипирролидин-2,5-дион (0,437 мг, 3,796 мкмоль) с последующим добавлением 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (ЭДК) (0,728 мг, 3,796 мкмоль). После перемешивания при комнатной температуре в течение 18 часов реакция прошла примерно на 50%. Добавляли ЭДК (1,46 мг, 7,8 мкмоль) и смесь перемешивали в течение следующих 18 часов, пока анализ ВЭЖХ не показал >95% конверсии в NHS-ПЭГ3-триазол-ПЭГ3-Val-Cit-PAВ-эрибулин. Смесь концентрировали в вакууме и остаток очищали преп-ТСХ (15% MeOH/CH₂Cl₂) для получения NHS-ПЭГ3-триазол-ПЭГ3-Val-Cit-PAВ-эрибулина (ER-001243700) в виде белого твердого вещества (2,2 мг, выход 69%).

¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ м. д. 8,00 (с, 1H), 7,59 (д, J=8,0 Гц, 2H), 7,31 (д, J=8,4 Гц, 2H), 5,13 (с, 1H), 5,04 (д, J=12,4 Гц, 1H), 5,02 (с, 1H), 5,00 (д, J=12,4 Гц, 1H), 4,87 (с, 1H), 4,83 (с, 1H), 4,71 (т, J=4,0 Гц, 1H), 4,63 (с, 2H), 4,61 (т, J=4,4 Гц, 1H), 4,57-4,55 (м, 2H), 4,51-4,45 (м, 1H), 4,32-4,28 (м, 2H), 4,21-4,17 (м, 2H), 4,13-4,10 (м, 2H), 3,98 (т, J=10,8 Гц, 1H), 3,88-3,80 (м, 5H), 3,75-3,70 (м, 4H), 3,68-3,55 (м, 18H), 3,45-3,40 (м, 2H), 3,38 (с, 3H), 3,20-3,08 (м, 4H), 2,93-2,80 (м, 2H), 2,75-2,50 (м, 2H), 2,68 (с, 4H), 2,48-2,30 (м, 7H), 2,28-1,92 (м, 10H), 1,90-1,68 (м, 8H), 1,65-1,27 (м, 8H), 1,11 (д, J=6,8 Гц, 3H), 1,05-0,95 (м, 1H), 0,99 (д, J=7,2 Гц, 3H), 0,97 (д, J=6,8 Гц, 3H). ЖХ-МС (M+H)=1678,3.

1. 8 Приготовление Mal-ПЭГ2-Ala-Ala-Asn-PAВ-эрибулина (ER-001231679) и Mal-ПЭГ2-(Ala-Ala-Asn-PAВ)2-эрибулина (ER-001231690)

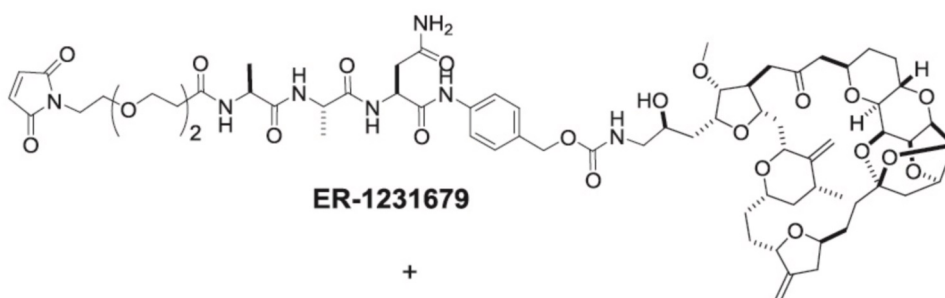


1. Основание Хунига
2. Et₂NH

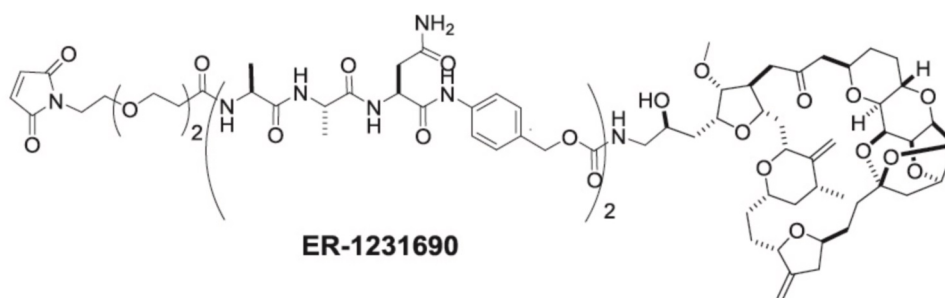


Mal-ПЭГ2-NHS

ДМФА, Et₃N



+



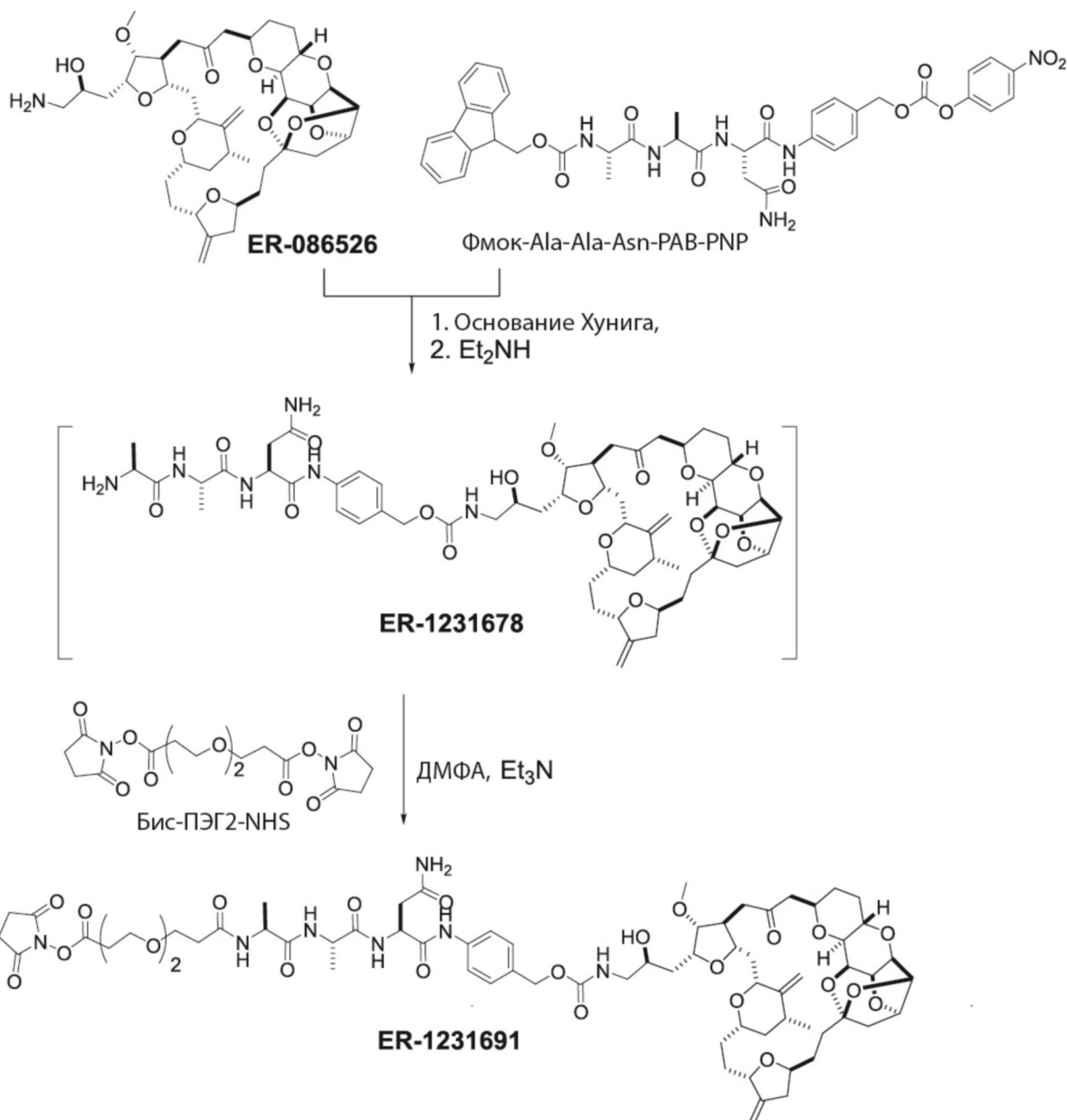
[00358] Эрибулин (ER-000086526) (10 мг, 0,014 ммоль) растворяли в ДМФА (0,5 мл) и смешивали с основанием Хунига (3,59 мкл, 0,021 ммоль). Затем добавляли (9Н-флуорен-9-ил)метил ((S)-1-(((S)-1-(((S)-4-амино-1-((4-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)метил)фенил)амино)-1,4-диоксобутан-2-ил)амино)-1-оксoproпан-2-ил)амино)-1-оксoproпан-2-ил)карбамат (15,76 мг, 0,021 ммоль) и полученный желтый раствор перемешивали при комнатной температуре в течение 3 дней, пока анализ ВЭЖХ не показал полного потребления исходного материала. К реакционной смеси добавляли диэтиламин (14,23 мкл, 0,137 ммоль), который затем перемешивали при комнатной температуре в течение

дополнительных 2 часов до тех пор, пока не было 100% расщепления Фмок защиты. Реакционную смесь концентрировали для удаления диэтиламина и остаток повторно растворяли в ДМФА (1,5 мл). Et₃N (0,015 мл, 0,11 ммоль) добавляли при комнатной температуре с последующим добавлением 2,5-диоксопирролидин-1-ил 3-(2-(2-(2,5-
 5 диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)этокси)этокси)пропаноата (9,71 мг, 0,027 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 часов до завершения реакции, что было определено с помощью анализа ЖХ-МС. Смесь концентрировали под глубоким вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии для получения Mal-ПЭГ2-Ala-Ala-Asn-РАВ-эрибулина (ER-001231679) (9,2 мг, выход
 10 49%) и Mal-ПЭГ2-(Ala-Ala -An-РАВ)2-эрибулина (ER-001231690) (6,0 мг, выход 18%) в виде бесцветных масел.

[00359] Mal-ПЭГ2-Ala-Ala-Asn-РАВ-эрибулин (ER-001231679): ¹H ЯМР (400 МГц) δ м. д. 9,23 (с, 1H), 8,00 (д, J=7,6 Гц, 1H), 7,61 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,38 (д, J=6,8 Гц, 1H), 7,24
 15 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,13 (д, J=7,2 Гц, 1H), 6,68 (с, 2H), 6,30 (ш. с, 1H), 6,04-6,00 (м, 1H), 5,77 (ш. с, 1H), 5,42 (ш. с, 1H), 5,07 (с, 1H), 5,06-4,98 (м, 2H), 4,93 (с, 1H), 4,88 (с, 1H), 4,90-4,82 (м, 1H), 4,80 (с, 1H), 4,69 (т, J=4,0 Гц, 1H), 4,60 (т, J=4,0 Гц, 1H), 4,49-4,42 (м, 1H), 4,38-4,25 (м, 4H), 4,19 (т, J=4,8 Гц, 1H), 4,15-4,08 (м, 1H), 4,03 (т, J=4,8 Гц, 1H), 3,97-3,85 (м, 3H),
 20 3,83-3,50 (м, 12H), 3,41 (с, 3H), 3,50-3,10 (м, 3H), 3,02-2,64 (м, 6H), 2,52-2,30 (м, 7H), 2,30-1,65 (м, 14H), 1,65-1,20 (м, 12H), 1,10 (д, J=6,8 Гц, 3H), 1,13-1,05 (м, 1H). ЖХ-МС (M+Na) =1396,6.

[00360] Mal-ПЭГ2-(Ala-Ala-Asn-РАВ)2-эрибулин (ER-001231690): ¹H ЯМР (400 МГц, CD₃OD) δ м. д. 7,65 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,60 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,28 (д, J=8,8 Гц, 2H), 7,23 (д, J=8,4 Гц, 2H), 6,79 (с, 2H), 5,13 (с, 1H), 5,02 (с, 1H), 5,06-4,98 (м, 4H), 4,87 (с, 1H), 4,82 (с,
 25 1H), 4,85-4,72 (м, 2H), 4,71 (т, J=4,8 Гц, 1H), 4,61 (т, J=4,4 Гц, 1H), 4,47 (д, J=11,2 Гц, 1H), 4,30-4,06 (м, 9H), 3,97 (т, J=4,8 Гц, 1H), 3,89-3,80 (м, 3H), 3,75-3,48 (м, 12H), 3,38 (с, 3H), 3,17 (д, J=6,8 Hz, 2H), 2,94-2,62 (м, 8H), 2,50-2,28 (м, 7H), 2,22-1,65 (м, 14H), 1,58-1,30 (м, 18H), 1,10 (д, J=6,8 Гц, 3H), 1,06-0,97 (м, 1H). ЖХ-МС (M+Na) =1802,8.

1.9 Приготовление NHS-ПЭГ2-Ala-Ala-Asn-РАВ-эрибулина (ER-001231691)

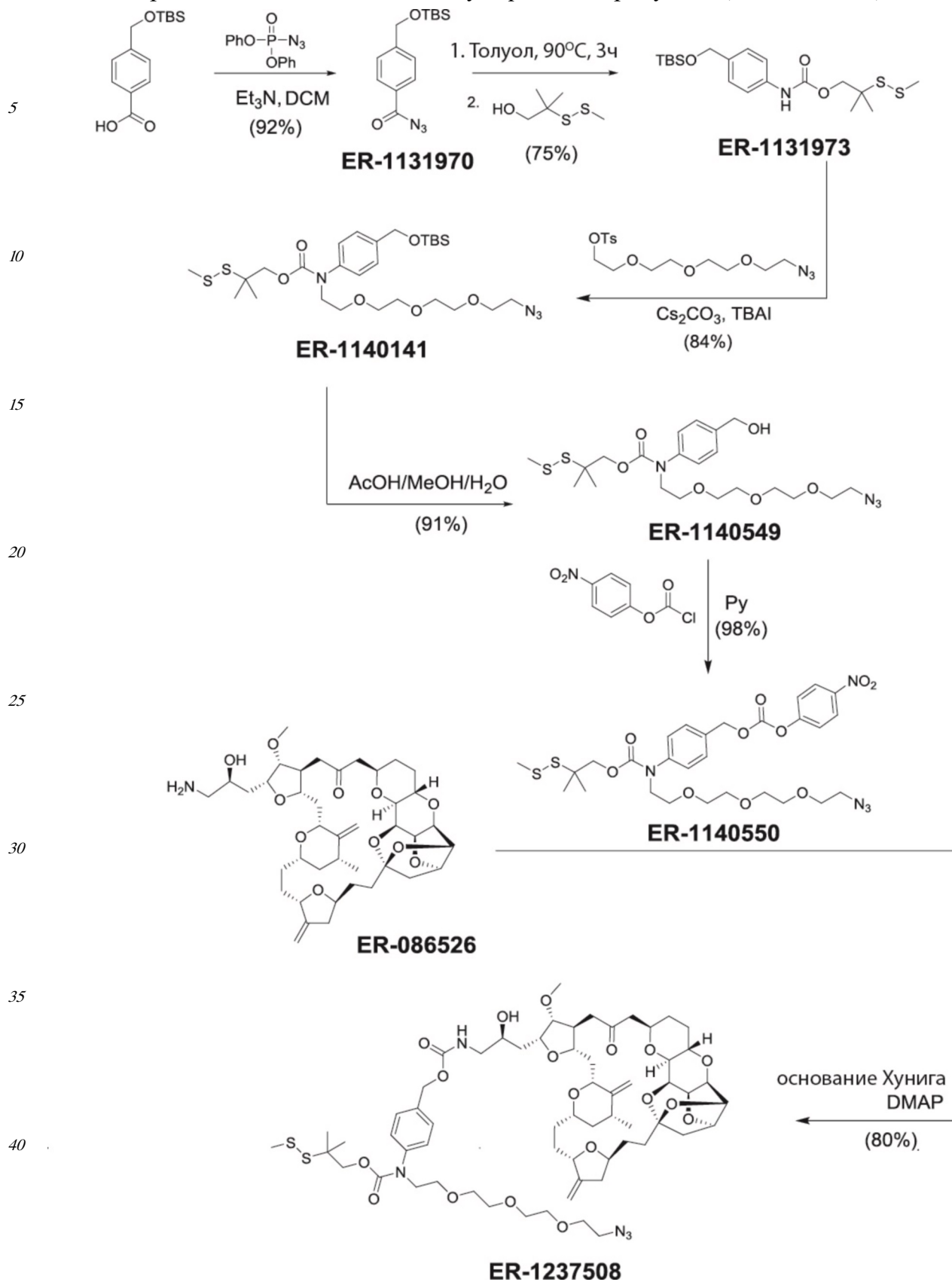


[00361] Ala-Ala-Asn-PAB-эрибулин (ER-001231678) были приготовлен (15 мг, количественный выход) из эрибулина (ER-000086526) и Фмок-Ala-Ala-Asn-PAB-PNP с применением той же процедуры, что описана выше для приготовления Val-Cit-PAB-эрибулина (ER-001228950). ЖХ-МС (М+Н) = 1135,5.

[00362] NHS-ПЭГ2-Ala-Ala-Asn-PAB-эрибулин (ER-001231691) был получен (12,4 мг, выход 64%) из Ala-Ala-Asn-PAB-эрибулина (ER-001231678) и БисNHS-ПЭГ2 с применением той же процедуры, что описана выше для приготовления NHS-ПЭГ2-Val-

Cit-PAB-эрибулина (ER-001236940). ¹H ЯМР (400 МГц) δ м. д. 9,21 (с, 1H), 7,95 (д, J=8,0 Гц, 1H), 7,62 (д, J=8,8 Гц, 2H), 7,58-7,52 (м, 1H), 7,28 (ш. с, 1H), 7,24 (д, J=8,4 Гц, 2H), 7,10 (ш. с, 1H), 6,29 (д, J=12,4 Гц, 1H), 5,83 (ш. с, 1H), 5,38 (ш. с, 1H), 5,07 (с, 1H), 5,05-4,95 (м, 2H), 4,93 (с, 1H), 4,88 (с, 1H), 4,90-4,83 (м, 1H), 4,81 (с, 1H), 4,69 (т, J=4,4 Гц, 1H), 4,60 (т, J=4,4 Гц, 1H), 4,46-4,41 (м, 1H), 4,36-4,25 (м, 4H), 4,19 (дд, J=4,8, 6,0 Гц, 1H), 4,15-4,09 (м, 1H), 4,03 (дд, J=4,8, 6,0 Гц, 1H), 3,99-3,89 (м, 3H), 3,85-3,50 (м, 10H), 3,41 (с, 3H), 3,40-3,10 (м, 3H), 3,01-2,60 (м, 10H), 2,60-2,35 (м, 7H), 2,35-1,65 (м, 14H), 1,65-1,20 (м, 14H), 1,10 (д, J=6,8 Гц, 3H), 1,15-1,03 (м, 1H). ЖХ-МС (ES) (М+Н) = 1442,7.

1. 10 Приготовление азид-ПЭГ3-дисульфид-РАВ-эрибулина (ER-001237508)



[00363] 4-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)бензойную кислоту (1,0 г, 3,754 ммоль) растворяли в дихлорметане (ДХМ) (25 мл), охлаждали до 0°C. Затем добавляли триэтиламин (0,549 мл, 3,941 ммоль), а затем -дифенилфосфоразидат (1,085 мг, 3,941 ммоль). Реакционную смесь медленно нагревали до комнатной температуры и

перемешивали в течение 14 часов. Неочищенную смесь разбавляли с этилацетатом (EtOAc)/Нер (1:1, 100 мл) и пропускали через короткую кремниевую пробку, элюируя EtOAc/Нер (50%). Растворитель удаляли под вакуумом для получения 1,10 г 4-(((трет-

бутилдиметилсилил)окси)метил)бензойной кислоты (ER-001131970). ^1H ЯМР (400 МГц) δ м. д. 7,98 (д, 2 Н, $J=8,0$ Гц), 7,40 (д, 2 Н, $J=8,0$ Гц), 4,79 (с, 2 Н), 0,94 (с, 9 Н), 0,10 (с, 6 Н).

[00364] 4-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)бензойную кислоту (ER-001131970) (1,1 г, 3,775 ммоль) растворяли в толуоле (20 мл), нагревали при 110°C в течение 3 часов. Несмотря на то, что продукт не проявился как одно пятно, анализ тонкослойной хроматографии (ТСХ) показал, что исходный материал был израсходован. Затем реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и переносили в вials, герметизировали в токе азота, и хранили в виде раствора в толуоле (1 мл=32,6 мг) при -20°C .

[00365] К раствору трет-бутил((4-изоцианатобензил)окси)диметилсилана (165 мг, 0,626 ммоль) в толуоле (5 мл) добавляли триэтиламин (0,099 мл, 0,709 ммоль), затем спирт (90,0 мг, 0,591 ммоль), и реакционную смесь перемешивали в течение 6 часов при 36°C . Ход реакции проверяли с помощью СВЭЖХ/МС. Затем добавляли насыщенный раствор гидрокарбоната натрия (NaHCO_3) (10 мл) экстрагировали EtOAc/Нер (1:1, 60 мл), промывали соляным раствором, сушили сульфатом натрия и концентрировали. Неочищенный материал очищали с помощью флэш-хроматографии (EtOAc/Нер 10% - 40%) для получения 215 мг 2-метил-2-(метилдисульфанил)пропил(4-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)фенил)карбамата (ER-001131973). ^1H ЯМР (400 МГц) δ м. д. 7,34 (д, 2 Н, $J=8,4$ Гц), 7,26 (д, 2 Н, $J=7,6$ Гц), 6,63 (ш. с, 1 Н), 4,69 (с, 2 Н), 4,17 (с, 2 Н), 2,42 (с, 3 Н), 1,35 (с, 6 Н), 0,93 (с, 9 Н), 0,08 (с, 6 Н).

[00366] 2-метил-2-(метилдисульфанил)пропил (4-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)фенил)карбамат (ER-001131973) (198 мг, 0,476 ммоль) и 2-(2-(2-(2-азидоэтоксид)этоксид)этил 4-метилбензолсульфонат (325 мг, 0,87 ммоль) растворяли в ДМФА (6,6 мл). Затем добавляли карбонат цезия (621 мг, 1,905 ммоль), а затем тетрабутиламмониййодид (45 мг, 0,122 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение 15 часов при 36°C . Ход реакции проверяли с помощью СВЭЖХ/МС. Затем добавляли насыщенный раствор NH_4Cl (30 мл), экстрагировали EtOAc/Нер (2:1, 150 мл), промывали соляным раствором (10 мл), сушили сульфатом натрия и концентрировали под вакуумом. Неочищенный материал очищали с помощью флэш-хроматографии (EtOAc/Нер 20% - 50%) для получения 248 мг 2-метил-2-(метилдисульфанил)пропил (2-(2-(2-(2-азидоэтоксид)этоксид)этил)(4-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)фенил)карбамата (ER-001140141). ^1H ЯМР (400 МГц) δ м. д. 7,28 (д, 2 Н, $J=8,4$ Гц), 7,20 (д, 2 Н, $J=8,0$ Гц), 4,73 (с, 2 Н), 4,06 (ш. с, 2 Н), 3,83 (дд, 2 Н, $J=6,4$, 5,6 Гц), 3,68- 3,56 (м, 12 Н), 3,37 (дд, 2 Н, $J=5,6$, 5,2 Гц), 2,33 (с, 3 Н), 1,14 (ш. с, 6 Н), 0,93 (с, 9 Н), 0,09 (с, 6 Н).

[00367] 2-метил-2-(метилдисульфанил)пропил (2-(2-(2-(2-азидоэтоксид)этоксид)этоксид)этил)(4-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)фенил)карбамат (ER-001140141) (81 мг, 0,131 ммоль) растворяли в смеси метанола (5 мл) и воды (0,5 мл). Затем к реакционной смеси добавляли уксусную кислоту (0,5 мл, 8,734 ммоль) и перемешивали в течение 14 часов при 38°C . Реакционную смесь охлаждали до комнатной температуры и растворитель удаляли под вакуумом. Остаток разбавляли EtOAc (30 мл), промывали водой (2x5 мл), NaHCO_3 и соляным раствором (3 мл), сушили сульфатом натрия и концентрировали под вакуумом. Неочищенный материал очищали с помощью флэш-хроматографии (EtOAc/Нер 30% - 90%) для получения 61,0 мг 2-метил-2-

(метилдисульфанил)пропил (2-(2-(2-(2-азидоэтокс)этокс)этокс)этил)(4-

(гидроксиметил)фенил)карбамата (ER-001140549). ^1H ЯМР (400 МГц) δ м. д. 7,34 (д, 2 Н, $J=8,8$ Гц), 7,26 (д, 2 Н, $J=8,0$ Гц), 4,69 (д, 2 Н, $J=4,4$ Гц), 4,06 (ш. с, 2 Н), 3,84 (дд, 2 Н, $J=6,2, 6,2$ Гц), 3,66-3,56 (м, 12 Н), 3,37 (дд, 2 Н, $J=5,2, 5,2$ Гц), 2,33 (с, 3 Н), 1,74 (ш. с, 1 Н), 1,14 (ш. с, 6 Н).

[00368] 2-метил-2-(метилдисульфанил)пропил (2-(2-(2-(2-азидоэтокс)этокс)этокс)этил)(4-(гидроксиметил)фенил)карбамат (ER-001140549) (60 мг, 0,119 ммоль) растворяли в ДХМ (2 мл) и Ру (0,019 мл, 0,239 ммоль) охлаждали до 0°C . Затем добавляли 4-

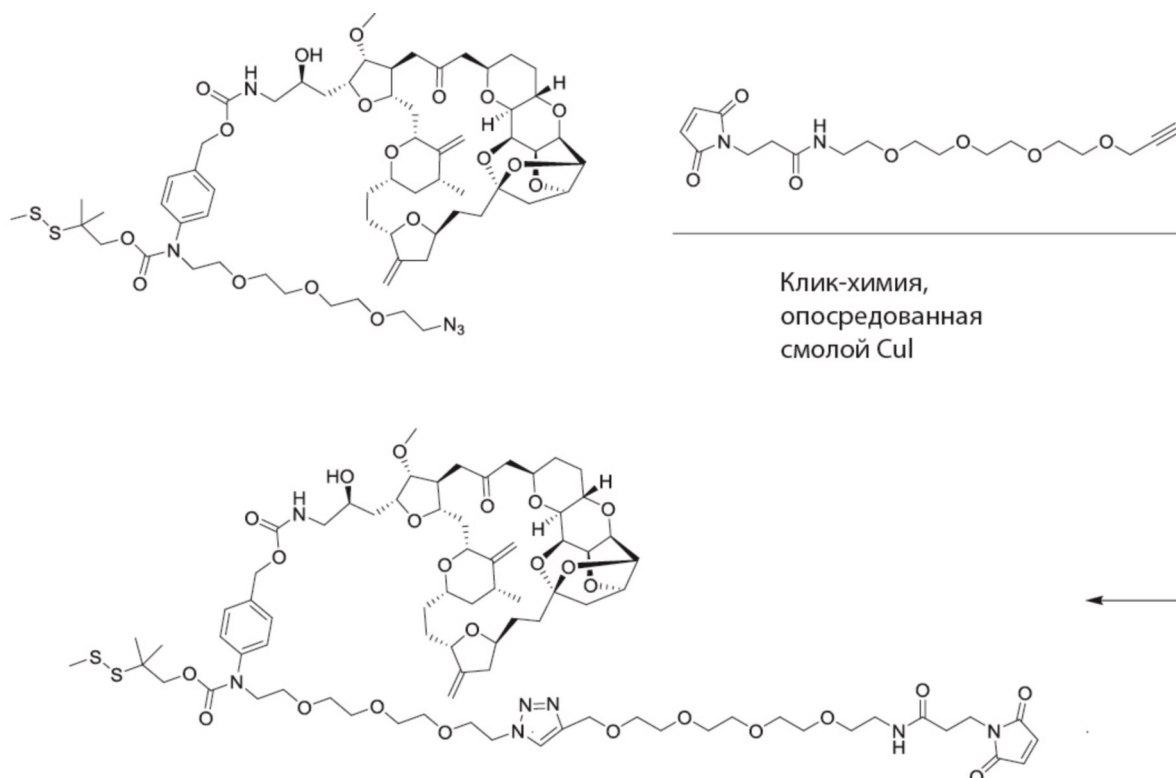
нитрофенилкарбонохлоридат (38,5 мг, 0,191 ммоль) в ДХМ (2 мл) и диметиламинопиридин (ДМАП) (2,9 мг, 0,024 ммоль), и реакцию смесь перемешивали в течение 30 мин при 0°C . Реакционную смесь медленно нагревали до комнатной температуры и перемешивали до тех пор, пока исходный материал не был потреблен (приблизительно 2,5 часа). Растворитель удаляли под вакуумом и остаток очищали путем флэш-хроматографии (EtOAc/Нер 10% - 35%) для получения 78 мг 2-метил-2-(метилдисульфанил)пропил (2-(2-(2-(2-азидоэтокс)этокс)этокс)этил)(4-(((

(4-нитрофенокси)карбонил)окси)метил)фенил)карбамата (ER-001140550). ^1H ЯМР (400 МГц) δ м. д. 8,27 (дд, 2 Н, $J=6,8, 2,4$ Гц), 7,41 (д, 2 Н, $J=8,8$ Гц), 7,37 (дд, 2 Н, $J=7,2, 2,4$ Гц), 7,33 (д, 2 Н, $J=8,8$ Гц), 5,27 (с, 2 Н), 4,08 (ш. с, 2 Н), 3,85 (дд, 2 Н, $J=5,8, 5,8$ Гц), 3,66-3,57 (м, 12 Н), 3,36 (дд, 2 Н, $J=5,2, 5,2$ Гц), 2,33 (ш. с, 3 Н), 1,19 (ш. с, 6 Н).

[00369] 2-метил-2-(метилдисульфанил)пропил (2-(2-(2-(2-азидоэтокс)этокс)этокс)этил)(4-(((4-нитрофенокси)карбонил)окси)метил)фенил)карбамат (ER-001140550) (30 мг, 0,045 ммоль) в ДХМ (3 мл, 46,625 ммоль) помещали в 25-миллилитровую колбу в токе азота и охлаждали до 0°C . Добавляли амин (40,8 мг, 0,049 ммоль) в ДХМ (2 мл) и основание Хунига (0,024 мл, 0,135 ммоль), а затем ДМАП (1,4 мг, 0,011 ммоль). Затем реакцию смесь медленно нагревали до комнатной температуры, перемешивали в течение 3 часов, концентрировали под вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии (EtOAc/Нер 50% - 100%, с последующим MeOH/EtOAc 3% - 8%) для

получения 45,0 мг чистого азид-ПЭГ3-дисульфид-РАВ-эрибулина (ER-001237508). ^1H ЯМР (400 МГц) δ м. д. 7,32 (д, 2 Н, $J=8,0$ Гц), 7,25 (д, 2 Н, $J=7,2$ Гц), 5,28 (дд, 1 Н, $J=5,6, 5,6$ Гц), 5,11-5,04 (м, 3 Н), 4,93 (с, 1 Н), 4,88 (с, 1 Н), 4,81 (с, 1 Н), 4,69 (дд, 1 Н, $J=4,4, 4,4$ Гц), 4,60 (дд, 1 Н, $J=4,2, 4,2$ Гц), 4,36 (ш. с, 1 Н), 4,33 (дд, 1 Н, $J=4,0, 2,0$), 4,29 (ддд, 1 Н, $J=9,6, 4,4, 4,4$ Гц), 4,18 (дд, 1 Н, $J=6,4, 4,4$ Гц), 4,14-4,04 (м, 3 Н), 4,03 (дд, 1 Н, $J=6,4, 4,4$ Гц), 3,97-3,89 (м, 3 Н), 3,84-3,78 (м, 3 Н), 3,67-3,56 (м, 14 Н), 3,42 (с, 3 Н), 3,40-3,35 (м, 1 Н), 3,37 (дд, 2 Н, $J=5,2, 5,2$ Гц), 3,27 (д, 1 Н, $J=3,2$ Гц), 3,20 (ддд, 1 Н, $J=12,8, 6,0, 6,0$ Гц), 2,91-2,83 (м, 2 Н), 2,70 (дд, 1 Н, $J=16,0, 10,0$ Гц), 2,52-2,40 (м, 3 Н), 2,35-2,13 (м, 9 Н), 2,10-2,06 (м, 1 Н), 2,01-1,89 (м, 4 Н), 1,78-1,64 (м, 4 Н), 1,60-1,52 (м, 4 Н), 1,49-1,28 (м, 5 Н), 1,22-1,07 (м, 6 Н), 1,09 (д, 3 Н, $J=6,0$ Гц).

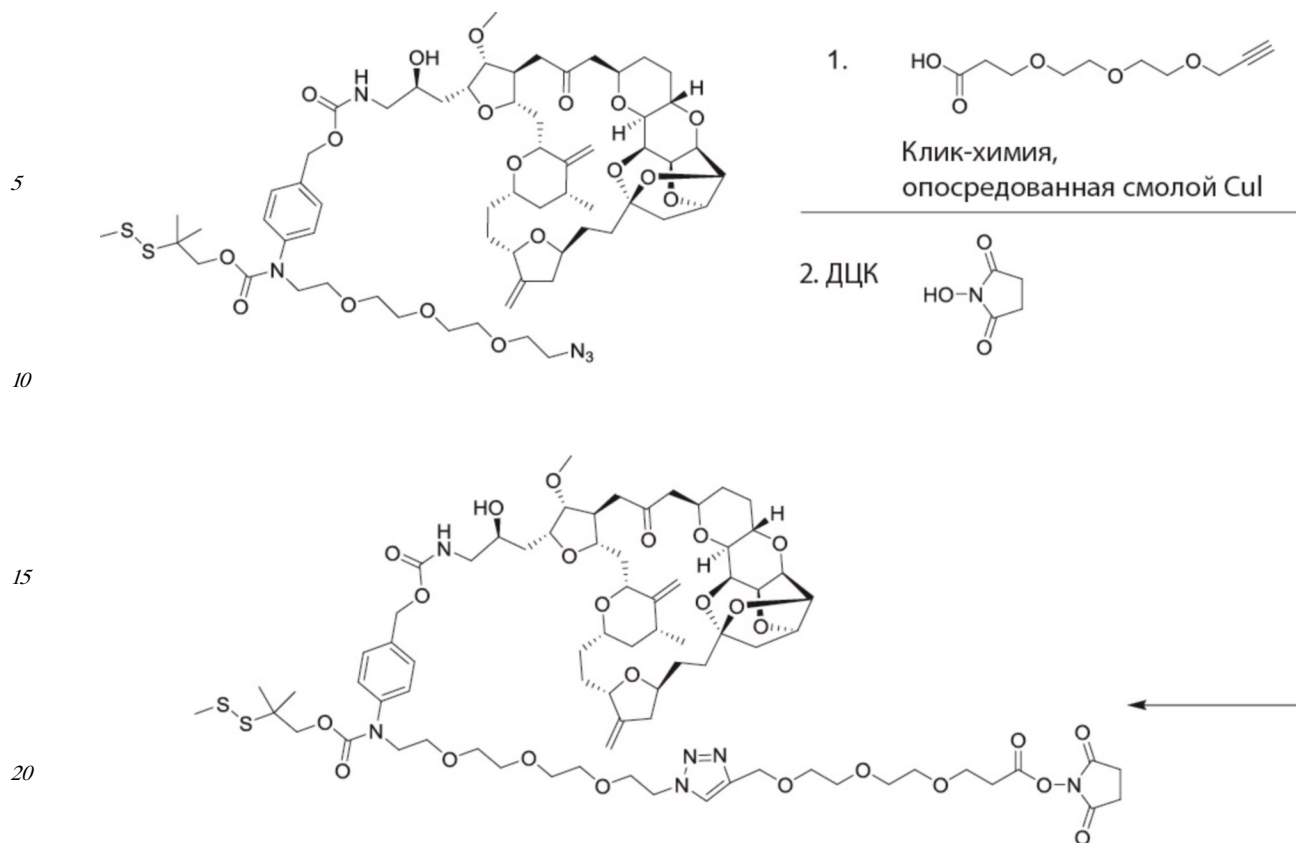
1. 11 Приготовление Mal-ПЭГ4-триазол-ПЭГ3-дисульфид-РАВ-эрибулина (ER-001237504)



[00370] Смесь азида (9,0 мг, 7,151 мкмоль) и 3-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1Н-пиррол-1-ил)-N-(3,6,9,12-тетраоксапентадек-14-ин-1-ил)пропанамида (6,8 мг, 0,018 ммоль) в трет-бутаноле (1,5 мл) и воде (0,5 мл) дегазировали в течение 45 мин. Затем добавляли йодид меди на амберлист-21 (1,23 ммоль/г, 10 мг) и дегазировали в течение дополнительных 30 мин. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов и проверяли с помощью СВЭЖХ/МС. Большая часть исходного материала была потреблена и желаемый продукт проявился как основной пик. Смесь затем отделяли от смолы и очищали на ВЭЖХ (ацетонитрил/вода с 0,05% муравьиной кислотой) для получения 1,5 мг Mal-ПЭГ4-триазол-ПЭГ3-дисульфид-РАВ-эрибулина (ER-001237504).

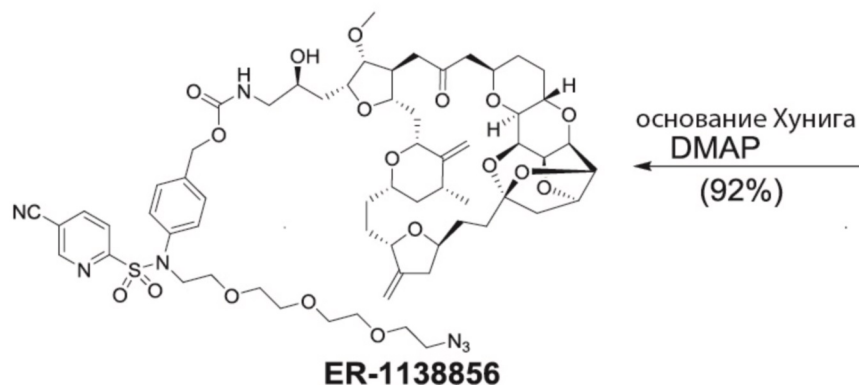
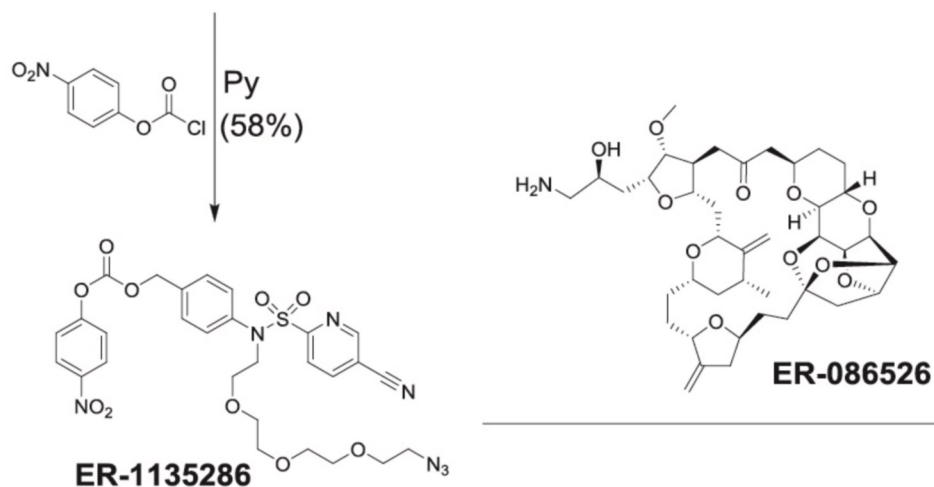
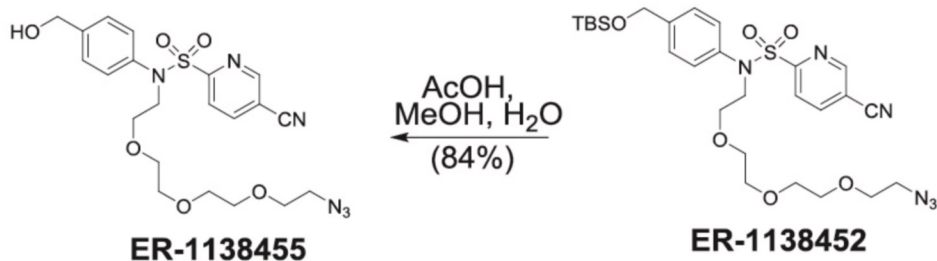
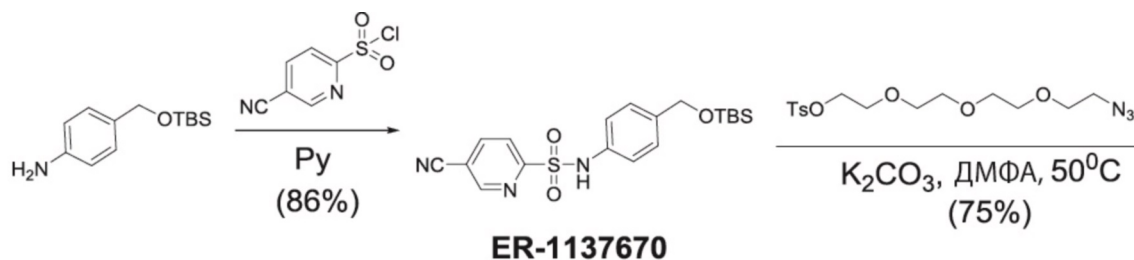
^1H ЯМР(400 МГц) δ м. д. 7,74 (с, 1 Н), 7,32 (д, 2 Н, $J=8,4$ Гц), 7,27-7,25 (м, 2 Н), 6,69 (ш. с, 2 Н), 5,43 (дд, 1 Н, $J=5,6$, 5,6 Гц), 5,14-5,06 (м, 3 Н), 4,95 (с, 1 Н), 4,89 (с, 1 Н), 4,82 (с, 1 Н), 4,70 (дд, 1 Н, $J=4,4$, 4,4 Гц), 4,66 (с, 2 Н), 4,62 (дд, 1 Н, $J=4,4$, 4,4 Гц), 4,52(дд, 1 Н, $J=5,2$, 5,2 Гц), 4,38-4,31 (м, 2 Н), 4,30 (ддд, 1 Н, $J=10,4$, 4,0, 4,0 Гц), 4,20 (дд, 1 Н, $J=6,4$, 4,4 Гц), 4,16-4,05 (м, 3 Н), 4,04 (дд, 1 Н, $J=6,4$, 4,4 Гц), 3,99-3,91 (м, 3 Н), 3,87-3,80 (м, 6 Н), 3,70-3,59 (м, 22 Н), 3,53 (дд, 2 Н, $J=5,2$, 5,2 Гц), 3,44 (с, 3 Н), 3,43-3,36 (м, 3 Н), 3,29 (д, 1 Н, $J=2,8$ Гц), 3,18 (ддд, 1 Н, $J=12,9$, 6,2, 6,2 Гц), 2,92-2,84 (м, 2 Н), 2,72 (дд, 1 Н, $J=16,0$, 10,0 Гц), 2,54-2,42 (м, 5 Н), 2,37-1,90 (м, 19 Н), 1,78-1,52 (м, 3 Н), 1,50-1,14 (м, 16 Н), 1,10 (д, 3 Н, $J=6,0$ Гц). ЖХ-МС ($M+H$) = 1642,1.

1. 12 Приготовление NHS-ПЭГ3-триазол-ПЭГ3-дисульфид-РАВ-эрибулина (ER-001244129)



[00371] Смесь азида (9 мг, 7,151 мкмоль) и 2,5-диоксопирролидин-1-ил 3-(2-(2-(проп-2-ин-1-илокси)этокси)этокси)пропаноата (4,5 мг, 14,30 мкмоль) в трет-бутаноле (1 мл) и воде (0,5 мл) дегазировали в течение 45 мин. Затем добавляли йодид меди на амберлист-21 (1,23 ммоль/г, 10 мг, 7,151 мкмоль) и дегазировали в течение дополнительных 30 мин. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов и проверяли с помощью СВЭЖХ/МС. Большая часть исходного материала была потреблена и желаемый продукт проявился как основной пик. Затем смесь отделяли от смолы фильтрованием, экстрагировали с ДХМ (15 мл), промывали соляным раствором (3 × 3 мл), сушили сульфатом натрия и концентрировали под вакуумом. Остаток (5 мг, 3,39 мкмоль) подвергали азеотропной перегонке с толуолом, растворяли в ТГФ (1 мл) и охлаждали до 0 °С. Добавляли ДЦК (4,2 мг, 0,02 ммоль) с последующим добавлением 1-гидрокси-2,5-диона (2,2 мг, 0,019 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов. Большая часть исходного материала была потреблена и желаемый продукт проявился как основной пик, что определено СВЭЖХ/МС. Затем реакционную смесь концентрировали и очищали на препаративной ТСХ (ДХМ/и-пропанол, 8%) для получения 2,5 мг NHS-ПЭГ3-триазол-ПЭГ3-дисульфид-РАВ-эрибулина (ER-001244129) в виде бесцветного масла. ¹H ЯМР (400 МГц, CD₂Cl₂) δ м. д. 7,72 (с, 1 Н), 7,32 (д, 2 Н, J=8,8 Гц), 7,25 (д, 2 Н, J=8,8 Гц), 5,08-5,04 (м, 3 Н), 4,93 (с, 1 Н), 4,85 (с, 1 Н), 4,78 (с, 1 Н), 4,64 (дд, 1 Н, J=4,4, 4,4 Гц), 4,58 (с, 2 Н), 4,55 (дд, 1 Н, J=4,4, 4,4 Гц), 4,48 (дд, 2 Н, J=5,0, 5,0 Гц), 4,32 (д, 1 Н, J=6,6 Гц), 4,27-4,22 (м, 2 Н), 4,14 (дд, 1 Н, J=6,6, 4,8 Гц), 4,10-4,01 (м, 3 Н), 4,00 (дд, 1 Н, J=6,8, 4,4 Гц), 3,92-3,78 (м, 9 Н), 3,65-3,53 (м, 19 Н), 3,44-3,39 (м, 4 Н), 3,37 (с, 3 Н), 3,26 (д, 1 Н, J=3,2 Гц), 3,13 (ддд, 1 Н, J=12,4, 6,0, 6,0 Гц), 2,91-2,73 (м, 11 Н), 2,70-2,64 (м, 2 Н), 2,54-2,41 (м, 3 Н), 2,38-1,80 (м, 16 Н), 1,74-1,52 (м, 3 Н), 1,41-1,13 (м, 10 Н), 1,07 (д, 3 Н, J=6,4 Гц). ЖХ-МС (M+H) = 1572,3.

1. 13 Приготовление азид-ПЭГ3-сульфонамид-РАВ-эрибулина (ER-001138856)



[00372] 4-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)анилин (315 г, 1,327 ммоль) растворяли в ДХМ (10 мл), охлаждали до 0°C. Затем добавляли пиридин (0,268 мл, 3,317 ммоль) с последующим добавлением 5-цианопиридин-2-сульфонилхлорида (365 мг, 1,801 ммоль) в ДХМ (10 мл) в течение 15 мин. Реакционную смесь медленно нагревали до комнатной температуры в течение 1 часа и перемешивали в течение 2 часов. Реакционную смесь разбавляли EtOAc (50 мл), промывали соляным раствором, сушили сульфатом натрия и концентрировали под вакуумом для получения 610 мг (103%) N-(4-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)фенил)-5-цианопиридин-2-

сульфонамида (ER-001137670). Неочищенный продукт был достаточно чистым, хотя и окрашенным. ^1H ЯМР (400 МГц) δ м. д. 8,94 (дд, 1 Н, $J=1,8, 0,6$ Гц), 8,10 (дд, 1 Н, $J=8,4, 2,0$ Гц), 7,99 (дд, 1 Н, $J=8,0, 0,8$ Гц), 7,18 (д, 2 Н, $J=8,2$ Гц), 7,15 (ш. с, 1 Н), 7,11 (дд, 2 Н, $J=6,8, 0,8$ Гц), 4,64 (с, 2 Н), 0,90 (с, 9 Н), 0,05 (с, 6 Н).

[00373] N-(4-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)фенил)-5-цианопиридин-2-сульфонамид (ER-001137670) (105,0 мг, 0,26 ммоль) и 2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этил 4-метилбензолсульфонат (143 мг, 0,383 ммоль) растворяли в ДМФА (4 мл). Затем добавляли карбонат калия (K_2CO_3) (144 мг, 1,041 ммоль), а затем

тетрабутиламмониййодид (19,2 мг, 0,052 ммоль) и реакционную смесь перемешивали в течение 36 часов при 50°C . Ход реакции проверяли с помощью СВЭЖХ/МС. Добавляли насыщенный раствор NH_4Cl (10 мл), экстрагировали EtOAc/Нер (2:1, 30 мл), промывали соляным раствором, сушили сульфатом натрия и концентрировали. Неочищенный материал очищали с помощью флэш-хроматографии (EtOAc/Нер 25% - 80%) для получения 118,0 мг N-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этил)-N-(4-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)фенил)-5-цианопиридин-2-сульфонамида (ER-001138452)

(75%). ^1H ЯМР (400 МГц) δ м. д. 8,99 (дд, 1 Н, $J=1,8, 0,6$ Гц), 8,08 (дд, 1 Н, $J=8,2, 2,2$ Гц), 7,86 (дд, 1 Н, $J=8,0, 0,8$ Гц), 7,24 (д, 2 Н, $J=10$ Гц), 7,09 (д, 2 Н, $J=8,8$ Гц), 4,69 (с, 2 Н), 4,06 (дд, 2 Н, $J=6,0, 6,0$ Гц), 3,67 (дд, 2 Н, $J=5,2, 5,2$ Гц), 3,65-3,62 (м, 4 Н), 3,58 (дд, 2 Н, $J=6,2, 6,2$ Гц), 3,56-3,53 (м, 4 Н), 3,38 (дд, 2 Н, $J=5,2, 5,2$ Гц), 0,93 (с, 9 Н), 0,08 (с, 6 Н).

[00374] N-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этил)-N-(4-(((трет-бутилдиметилсилил)окси)метил)фенил)-5-цианопиридин-2-сульфонамид (ER-001138452) (150 мг, 0,248 ммоль) растворяли в метаноле (6 мл). Затем добавляли воду (0,60 мл) с последующей уксусной кислотой (AcOH) (0,60 мл, 10,481 ммоль). Реакционную смесь медленно нагревали до 38°C и перемешивали в течение 14 часов. Большую часть растворителя удаляли под вакуумом. Остаток разбавляли EtOAc (30 мл), промывали водой (2×5 мл), NaHCO_3 и соляным раствором, сушили сульфатом натрия и концентрировали под вакуумом.

Неочищенный материал очищали с помощью флэш-хроматографии (EtOAc/Нер 35% - 90%) для получения 105,0 мг N-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этил)-5-циано-N-(4-гидроксиметил)фенил)пиридин-2-сульфонамида (ER-001138455) (84%). ^1H ЯМР (400 МГц) δ м. д. 8,99 (д, 1 Н, $J=1,2$ Гц), 8,09 (дд, 1 Н, $J=8,4, 2,0$ Гц), 7,88 (дд, 1 Н, $J=8,4, 0,8$ Гц), 7,30 (д, 2 Н, $J=8,8$ Гц), 7,15 (д, 2 Н, $J=8,4$ Гц), 4,67 (с, 2 Н), 4,06 (дд, 2 Н, $J=6,2, 6,2$ Гц), 3,66 (дд, 2 Н, $J=5,0, 5,0$ Гц), 3,65-3,58 (м, 6 Н), 3,55-3,51 (м, 4 Н), 3,38 (дд, 2 Н, $J=5,2, 5,2$ Гц).

[00375] N-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этил)-5-циано-N-(4-гидроксиметил)фенил)пиридин-2-сульфонамид (ER-001138455) (45 мг, 0,092 ммоль) растворяли в ДХМ (3 мл) и охлаждали до 0°C после добавления пиридина (0,015 мл, 0,183 ммоль). Затем добавляли 4-нитрофенилкарбонхлоридат (20,3 мг, 0,101 ммоль) в ДХМ (2 мл) и ДМАП (2,3 мг, 0,018 ммоль). Реакционную смесь медленно нагревали до комнатной

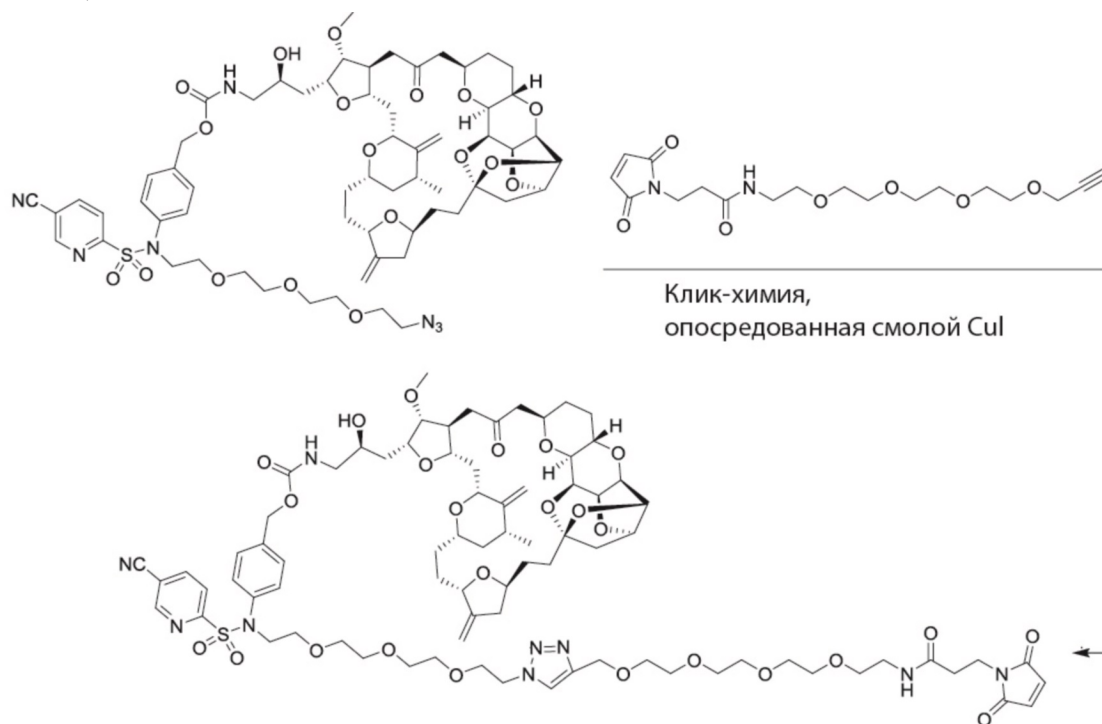
температуры и перемешивали в течение 2 часов. СВЭЖХ/МС показала, что осталось немного исходного материала. Затем реакционную смесь концентрировали под вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии (EtOAc/Нер 12% - 40%) для получения 35 мг 4-((N-(2-(2-(2-(2-азидоэтокси)этокси)этокси)этил)-5-цианопиридин)-2-сульфонамидо)бензил (4-нитрофенил)карбоната (ER-001235286) (58%) и 20 мг исходного материала.

^1H ЯМР (400 МГц) δ м. д. 8,99 (д, 1 Н, $J=0,8$ Гц), 8,27 (дд, 2 Н, $J=9,2, 2,0$ Гц), 8,12 (дд, 1 Н, $J=7,6, 2,0$ Гц), 7,92 (д, 1 Н, $J=8,4$ Гц), 7,38 (д, 4 Н, $J=9,6$ Гц), 7,26 (д, 2 Н, $J=8,8$ Гц), 5,45 (с, 2 Н), 4,06 (дд, 2 Н, $J=5,8, 5,8$ Гц), 3,67-3,58 (м, 8 Н), 3,58-3,50 (м, 4 Н), 3,38 (дд, 2 Н, $J=6,1, 6,1$ Гц).

[00376] 4-(N-(2-(2-(2-(2-азидоэтокс)этокс)этокс)этил)-5-цианопиридин-2-сульфонамидо)бензил (4-нитрофенил)карбонат (ER-001235286) (35,0 мг, 0,053 ммоль) помещали в 25-миллилитровую в токе азота и охлаждали до 0°C. Затем добавляли амин (48,5 мг, 0,059 ммоль) в ДХМ (3 мл, 46,625 ммоль) и основание Хунига (0,037 мл, 0,214 ммоль), а затем ДМАП (2,61 мг, 0,021 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в течение 30 мин при 0°C и затем перемешивали в течение дополнительных 6 часов при комнатной температуре. Затем реакционную смесь концентрировали под вакуумом и очищали с помощью флэш-хроматографии (EtOAc/Нер 50% - 100%, с последующим MeOH/EtOAc 3% - 8%) для получения 61,0 мг чистого азид-ПЭГ3-сульфонамид-РАВ-

эрибулина (ER-001138856). ¹H ЯМР (400 МГц) δ м. д. 8,98 (д, 1 H, J=1,2 Гц), 8,10 (дд, 1 H, J=8,2, 1,8 Гц), 7,87 (д, 1 H, J=8,0 Гц), 7,26 (д, 2 H, J=6,8 Гц), 7,13 (д, 2 H, J=8,4 Гц), 5,29 (дд, 1 H, J=5,6, 5,6 Гц), 5,08-5,00 (м, 3 H), 4,92 (с, 1 H), 4,87 (с, 1 H), 4,80 (с, 1 H), 4,68 (дд, 1 H, J=4,6, 4,6 Гц), 4,59 (дд, 1 H, J=4,6, 4,6 Гц), 4,38-4,30 (м, 2 H), 4,28 (ддд, 1 H, J=10,4, 4,0, 4,0 Гц), 4,17 (дд, 1 H, J=6,2, 4,6 Гц), 4,13-4,01 (м, 4 H), 3,97-3,88 (м, 3 H), 3,82-3,78 (м, 1 H), 3,67-3,50 (м, 15 H), 3,41 (с, 3 H), 3,40-3,33 (м, 1 H), 3,37 (дд, 2 H, J=4,8, 4,8 Гц), 3,27 (д, 1 H, J=3,2 Гц), 3,15 (ддд, 1 H, J=12,8, 6,4, 6,4 Гц), 2,90-2,82 (м, 2 H), 2,70 (дд, 1 H, J=16,0, 10,0 Гц), 2,51-2,40 (м, 3 H), 2,34-2,13 (м, 7 H), 2,10-2,05 (м, 1 H), 1,99-1,88 (м, 4 H), 1,78-1,64 (м, 5 H), 1,62-1,52 (м, 2 H), 1,50-1,29 (м, 4 H), 1,08 (д, 3 H, J=6,8 Гц).

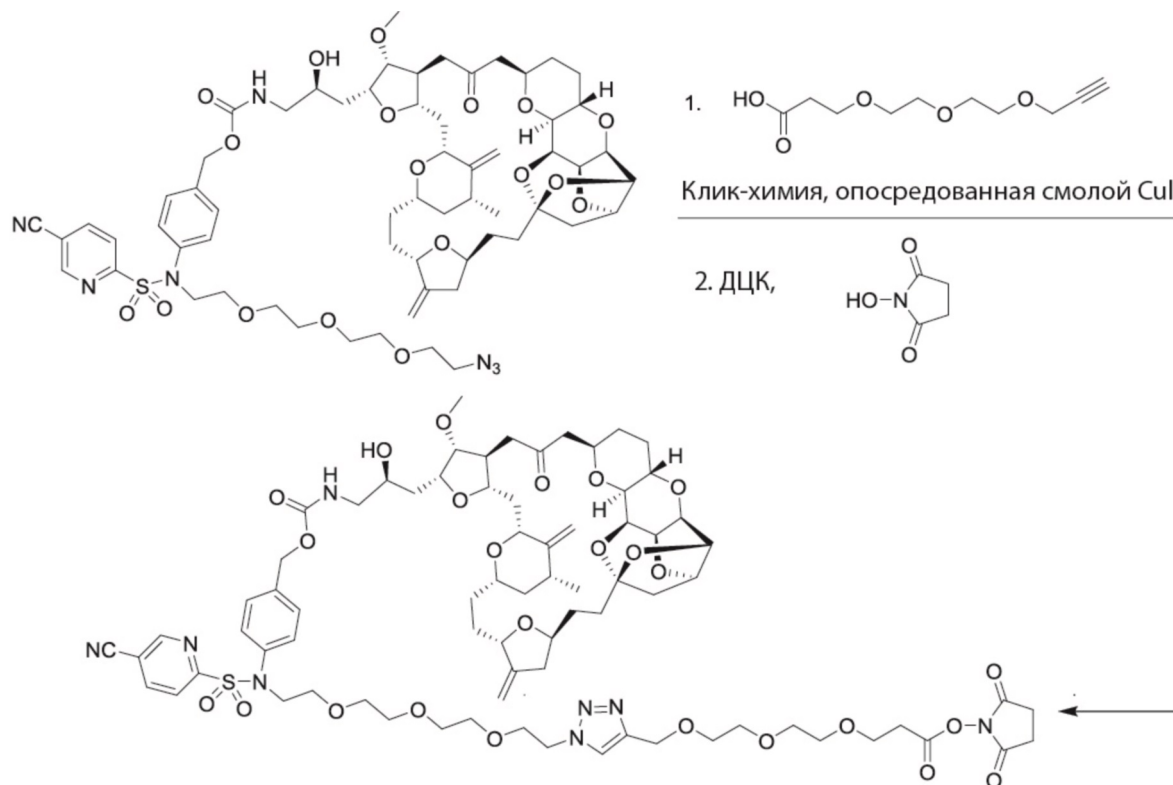
1.14 Приготовление Mal-ПЭГ4-триазол-ПЭГ3-сульфонамид-РАВ-эрибулина (ER-001237505)



[00377] Смесь азида (10 мг, 8,023 мкмоль) и 3-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)-N-(3,6,9,12-тетраоксапентадек-14-ин-1-ил)пропанамида (9,20 мг, 0,024 ммоль) в трет-бутаноле (2,1 мл) и воде (0,7 мл) дегазировали в течение 45 мин. Затем добавляли йодид меди на амберлист-21 (1,23 ммоль/г, 15 мг) и дегазировали в течение дополнительных 30 мин. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов и проверяли с помощью СВЭЖХ/МС. Большая часть исходного материала была потреблена и желаемый продукт проявился как основной пик. Затем реакционную смесь отделяют от смолы и очищают на препаративной ТСХ (ДХМ/метанол, 7%) для получения 5,5 мг Mal-ПЭГ4-триазол-ПЭГ3-сульфонамид-РАВ-

эрибулина (ER-001237505). ^1H ЯМР (400 МГц, CD_2Cl_2) δ м. д. 9,01 (с, 1 H), 8,15 (дд, 1 H, $J=8,0$, 1,8 Гц), 7,87 (д, 1 H, $J=8,0$ Гц), 7,75 (с, 1 H), 7,28 (д, 2 H, $J=8,0$ Гц), 7,14 (д, 2 H, $J=8,4$ Гц), 6,68 (с, 2 H), 6,47 (ш. с, 1 H), 5,44 (ш. с, 1 H), 5,10-5,02 (м, 3 H), 4,94 (с, 1 H), 4,86 (с, 1 H), 4,80 (с, 1 H), 4,68 (дд, 1 H, $J=4,4$, 4,4 Гц), 4,59 (с, 2 H), 4,56 (дд, 1 H, $J=4,4$, 4,4 Гц), 4,51 (дд, 2 H, $J=5,2$, 5,2 Гц), 4,34 (д, 1 H, $J=7,6$ Гц), 4,30-4,23 (м, 2 H), 4,19-4,14 (м, 2 H), 4,08 (дд, 1 H, $J=4,0$, 4,0 Гц), 4,03-3,98 (м, 2 H), 3,94-3,72 (м, 8 H), 3,68-3,46 (м, 28 H), 3,38 (с, 3 H), 3,38-3,33 (м, 3 H), 3,27 (д, 1 H, $J=3,2$ Гц), 3,16-3,02 (м, 2 H), 2,90-2,81 (м, 2 H), 2,68 (дд, 1 H, $J=16,2$, 9,8 Гц), 2,54-2,40 (м, 7 H), 2,40-1,8 (м, 11 H), 1,80-1,50 (м, 3 H), 1,48-1,25 (м, 3 H), 1,09 (д, 3 H, $J=6,4$ Гц). ЖХ-МС (M+H) = 1630,0.

1.15 Приготовление NHS-ПЭГ3-триазол-ПЭГ3-сульфонамид-РАВ-эрибулина (ER-001244623)



[00378] Смесь азида (14 мг, 0.011 ммоль) и 2,5-диоксопирролидин-1-ил 3-(2-(2-(проп-2-ин-1-илокси)этокси)этокси)пропаноата (8,80 мг, 0,028 ммоль) в трет-бутаноле (2 мл) и воде (1 мл) дегазировали в течение 45 мин. Затем добавляли йодид меди на амберлист-21 (1,23 ммоль/г, 20 мг) и дегазировали в течение дополнительных 30 мин. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов и проверяли с помощью СВЭЖХ/МС. Большая часть исходного материала была потреблена и желаемый продукт проявился как основной пик. Реакционную смесь затем отделяли от смолы путем экстракции с ДХМ (2 × 10 мл). Слой ДХМ промывали соляным раствором (4 × 5 мл), сушили сульфатом натрия и концентрировали до желаемого продукта (который применяли на следующем этапе без дополнительной очистки).

[00379] Неочищенную кислоту (15,0 мг, 10,255 мкмоль) растворяли в ТГФ (1,5 мл) и охлаждали до 0°C. Затем добавляли ДЦК (15,2 мг, 0,074 ммоль), а затем 1-гидроксипирролидин-2,5-дион (8,3 мг, 0,072 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 18 часов. СВЭЖХ/МС показала, что большая часть исходного материала была потреблена и желаемый продукт проявился как основной пик. Затем реакционную смесь концентрировали и очищали на препаративной

ТСХ (ДХМ/и-пропанол, 8%) для получения 2,5 мг NHS-ПЭГ3-триазол-ПЭГ3-сульфонамид-РАВ-эрибулина (ER-001244623). ^1H ЯМР (400 МГц, CD_2Cl_2) δ м. д. 9,00 (с, 1 Н), 8,12 (д, 1 Н, $J=8,4$ Гц), 8,00 (д, 1 Н, $J=8,0$ Гц), 7,72 (с, 1 Н), 7,26 (д, 2 Н, $J=8,0$ Гц), 7,12 (д, 2 Н, $J=8,0$ Гц), 5,37 (ш. с, 1 Н), 5,08-5,02 (м, 3 Н), 4,93 (с, 1 Н), 4,85 (с, 1 Н), 4,78 (с, 1 Н), 4,66-4,62 (м, 1 Н), 4,58-4,56 (м, 4 Н), 4,33 (д, 1 Н, $J=10,8$ Гц), 4,29-4,21 (м, 2 Н), 4,10-3,96 (м, 4 Н), 3,93-3,76 (м, 6 Н), 3,74-3,44 (м, 27 Н), 3,36 (с, 3 Н), 3,34-3,24 (м, 2 Н), 3,15-3,06 (м, 1 Н), 2,97 (ш. с, 1 Н), 2,90-2,78 (м, 8 Н), 2,74-2,08 (м, 13 Н), 2,05 -1,78 (м, 5 Н), 1,73-1,50 (м, 2 Н), 1,41-1,25 (м, 4 Н), 1,07 (д, 3 Н, $J=6,0$ Гц). ЖХ-МС ($\text{M}+\text{H}$) =1560,0.

1.16 Приготовление Mal-ПЭГ2-эрибулина

[00380] Эрибулин (5мг, 7 ммоль) растворяли в ДМФА (0,5 мл) и смешивали с малеимидо-ПЭГ2-NHS (5 мг, 14 мкмоль; Broadpharm, Cat No. BP-21680) и основанием Хунига (2,4 мкл, 14 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Затем реакционную смесь очищали с помощью ВЭЖХ (вода-градиент ацетонитрила 30-70%, содержащие 0,1% муравьиной кислоты). Элюент собирали по массе и лиофилизировали досуха. Конечный выход составил 3,7 мг (3,8 мкмоль, 54%). Прогнозируемая точная масса составляла 968,5 Да. Измеренная масса составляла 969,6 Да [$\text{M}+\text{H}$].

1.17 Приготовление Mal-ПЭГ4-эрибулина

[00381] Эрибулин (5мг, 7 ммоль) растворяли в ДМФА (0,5 мл) и смешивали с малеимид-ПЭГ4-NHS (6,2 мг, 14 мкмоль; Broadpharm, Cat No. BP-20554) и основанием Хунига (2,4 мкл, 14 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Затем реакционную смесь очищали с помощью ВЭЖХ (вода-градиент ацетонитрила 30-70%, содержащие 0,1% муравьиной кислоты). Элюент собирали по массе и лиофилизировали досуха. Конечный выход составил 3,7 мг (3,5 мкмоль, 50%). Прогнозируемая точная масса составляла 1056,5 Да. Измеренная масса составляла 1057,7 Да [$\text{M}+\text{H}$].

1.18 Приготовление азидо-ПЭГ2-эрибулина

[00382] Эрибулин (5мг, 7 ммоль) растворяли в ДМФА (0,5 мл) и смешивали с азидо-ПЭГ2-NHS (4,2 мг, 14 мкмоль; Broadpharm, Cat No. BP-20524) и основанием Хунига (2,4 мкл, 14 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Затем реакционную смесь очищали с помощью ВЭЖХ (вода-градиент ацетонитрила 30-70%, содержащие 0,1% муравьиной кислоты). Элюент собирали по массе и лиофилизировали досуха. Конечный выход составил 2,2 мг (2,4 мкмоль, 34%). Прогнозируемая точная масса составляла 914,5 Да. Измеренная масса составляла 915,7 Да [$\text{M}+\text{H}$].

1.19 Приготовление азидо-ПЭГ4-эрибулина

[00383] Эрибулин (5 мг, 7 ммоль) растворяли в ДМФА (0,5 мл) и смешивали с азидо-ПЭГ4-NHS (5,5 мг, 14 мкмоль; Broadpharm, Cat No. BP-20518) и основанием Хунига (2,4 мкл, 14 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Затем реакционную смесь очищали с помощью ВЭЖХ (вода-градиент ацетонитрила 30-70%, содержащие 0,1% муравьиной кислоты). Элюент собирали по массе и лиофилизировали досуха. Конечный выход составил 3,0 мг (3,0 мкмоль, 43%). Прогнозируемая точная масса составляла 1002,5 Да. Измеренная масса составляла 1003,7 Да [$\text{M}+\text{H}$].

1.20 Приготовление азидо-ПЭГ4-Val-Cit-РАВ-эрибулина

[00384] Эрибулин (15 мг, 21 ммоль) растворяли в ДМФА (1,5 мл) и хорошо перемешивали. Затем добавляли основание Хунига (5,5 мкл, 32 мкмоль) и Фмок-VCP-PNP (24 мг, 22 мкмоль, Levena Biopharma, Cat No. VC1003). Реакционную смесь

перемешивали при комнатной температуре в течение ночи (16 часов). По завершении реакции к реакционной смеси добавляли диэтиламин (20 мкл, 0,21 ммоль) и перемешивали в течение 2 часов при комнатной температуре для удаления защитной группы Фмок. Реакцию удаления защитных групп отслеживали с применением масс-спектрометра Waters SQD. По завершении реакции реакционную смесь переносили в предварительно взвешенную 1,5 мл микроцентрифужную пробирку. Растворитель выпаривали под вакуумом с применением охлажденного концентратора Centrivap с температурой, установленной на 30°C. Выход составлял 16 мг (14 мкмоль) неочищенного NH₂-Val-Cit-pAB-эрибулина (точная масса 1134,6 Да, выход 67%).

[00385] NH₂-Val-Cit-pAB-эрибулин (16 мг, 14,1 мкмоль) растворяли в ДМФА (1,5 мл). Затем добавляли основание Хунига (7,2 мкл, 41 мкмоль) и азидо-ПЭГ4-NHS (11 мг, 28,2 мкмоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 3 часов. Затем реакционную смесь очищали с помощью ВЭЖХ (вода-градиент ацетонитрила 48-72%, содержащие 0,1% муравьиной кислоты). Элюент собирали при 1409 м/з и лиофилизировали с получением азидо-ПЭГ4-Val-Cit-pAB-эрибулина (точная масса 1407,7 Да). Получали 13 мг (9,2 мкмоль) азидо-ПЭГ4-Val-Cit-pAB-эрибулина (выход на этапе 65%, 44% в целом).

Пример 4

1. Материалы и способы

[00386] Все примененные реагенты были получены от коммерческих поставщиков, высокой степени чистоты или выше, если не указано иное.

1.1 Антитела

[00387] MORAb-003 (гуманизированное антитело к рецептору фолиевой кислоты альфа человека, 25 мг/мл) и MORAb-009 (химерное антитело мыши/человека к мезотелину человека, 25 мг/мл), применяемые в следующих исследованиях, были из партии #NB02962-19 и партии #030A14, соответственно. Трастузумаб был приобретен коммерчески (Clingen) и был из партии #503345.

[00388] Химерные антитела кролика/человека и гуманизированные антитела к мезотелину человека, имеющие неспаренный цистеин в LCcys80 (Таблица 1), транзитивно экспрессировали в клетках 293F или как стабильно выбранные пулы.

Кондиционированную среду очищали и децистенилировали, как описано в разделе 1.4.1.2.1.

1.2 Цитотоксины

[00389] Конъюгируемые соединения эрибулина синтезировали, как описано в Примере 3 (таблица 46). Исходный раствор (10 мМ) готовили в ДМСО и хранили при -20°C до применения.

1.3 Линии опухолевых клеток

[00390] Линии опухолевых клеток человека, применяемые в анализах ADC MORAb-003, MORAb-009 и Трастузумаба, приготовленных с соединениями малеимидо/сукцинимидом (OSu)/азидо-линкер-эрибулина (таблица 46), включают IGROV1 (карциному яичника человека, FR^{hi}, MSLN^{neg}), NCI-H2110 (немелкоклеточную карциному легкого человека, FR^{med}, MSLN^{med}), A431 (FR^{neg}, MSLN^{neg}), NCI-N87-luc (карциному желудка человека, FR^{lo}, MSLN^{med}, her2^{hi}), NUGC3 (аденокарциному желудка человека, FR^{neg}, MSLN^{neg}, her2^{neg}), ZR75 (протоковую карциному молочной железы человека, FR^{neg}, MSLN^{neg}, her2^{med}) и BT-474 (протоковую карциному молочной железы человека, FR^{neg}, MSLN^{neg}, her2^{hi}). Линии опухолевых клеток человека, применяемые в анализах химерных

антител кролика/человека и гуманизированных антител к LCcys80 мезотелина человека, конъюгированных с MAL-ПЭГ2-Val-Cit-PAB-эрибулином (ER-001159569), представляли собой АЗ (А431, стабильно трансфицированную мезотелином человека, MSLN^{hi}), OVCAR3 (карциному яичника человека, MSLN^{hi}), HEC-251 (эндометриод человека, MSLN^{med}), H226 (плоскоклеточную мезотелиому легких человека, MSLN^{lo}) и исходную А431(MSLN^{neg}). Все применяемые клеточные линии были получены непосредственно из Американской коллекции типовых культур (ATCC), за исключением IGROV1 (получено с разрешения от Национального института рака) и АЗ (созданную в Morphotek из исходной А431).

1.4 Конъюгация антитела-лекарственного средства

1.4.1 Конъюгация на основе цистеина с применением малеимидов

1.4.1.1 Конъюгация межцепочечных дисульфидов

1.4.1.1.1 Частичное восстановление

[00391] Для MORAb-003 и MORAb-009 заменяли буфер на фосфатно-солевой буфер Дульбекко (DPBS) и затем концентрировали до 20 мг/мл, применяя центрифужную концентрацию. Добавляли равный объем 270 мкМ трис(2-карбоксиэтил)фосфина (ТСЕР) в 1X DPBS с 2 мМ ЭДТК и восстановление проводили путем осторожного перемешивания в течение 80 мин при комнатной температуре. Аналогичным образом частично восстанавливали трастузумаб, за исключением того, что восстановление проводили путем осторожного перемешивания в течение 40 мин при комнатной температуре.

1.4.1.1.2 Конъюгация

[00392] Соединение малеими́до-линкер-эрибулин (в ДМСО) конъюгировали с частично восстановленными антителами при молярном соотношении 1:6 (мАт:соединение). Соединение добавляли к 50% пропиленгликолю в DPBS и хорошо перемешивали. Затем добавляли равный объем частично восстановленного антитела и осторожно перемешивали (конечная концентрация пропиленгликоля 25%). Конъюгация продолжалась от 3,5 до 4 часов при комнатной температуре.

1.4.1.2 Конъюгация с LCcys80

1.4.1.2.1 Децистеинилирование

[00393] Применяя ÄKTA Explorer (GE Healthcare), колонку с белком А (GE Healthcare) уравнивали 10-тью объемами колонки (CV - column volume) 20 мМ фосфата натрия, 10 мМ ЭДТК, pH 7,2 (уравнивающий буфер). Затем загружали кондиционированную среду, а затем промывали несвязанный материал 10-тью CV уравнивающего буфера. Колонку промывали 16-тью CV 20 мМ фосфата натрия, 10 мМ ЭДТК, 5 мМ цистеина, pH 7,2, при 0,5 мл/мин в течение 16 часов для удаления кэпирующей группы. Затем колонку промывали 60-тью CV 20 мМ Триса, pH 7,5, при 0,5 мл/мин в течение 60 часов. Децистеинилированное антитело элюировали с применением 5-ти CV 0,1 М глицина, pH 2,9 и тотчас нейтрализовали, применяя 5% объема 2 М Триса, pH 9,0. Фракции, содержащие антитела, объединяли и диализовали в DPBS с применением 20K MWCO Slide-A-Lyzer (Thermo Fisher).

1.4.1.2.2 Конъюгация

[00394] Децистеинилированное антитело доводили до 5,0 мг/мл в DPBS, 1 мМ ЭДТК и 50% пропиленгликоль готовили в DPBS, 1 мМ ЭДТК. MAL-ПЭГ2-Val-Cit-PAB-эрибулин(ER-001159569) (12 мМ в ДМСО) добавляли к 50% пропиленгликолю и тщательно перемешивали. Затем добавляли равный объем децистеинилированного антитела в молярном соотношении 1:4 (мАт:соединение) и осторожно перемешивали.

Конъюгация продолжалась от 3,5 до 4 часов при комнатной температуре.

1.4.2 Конъюгация на основе амина с применением сукцинимидов

1.4.2.1 Конъюгация

[00395] Антитело (MORAb-003 или MORAb-009, не восстановленное) доводили до 10,0 мг/мл в 0,1 М бикарбонате натрия, pH 8,3. 50% пропиленгликоль готовили в 0,1 М бикарбонате натрия, pH 8,3. Сукцинимид (OSu)-линкер-эрибулин (в ДМСО) добавляли к 50% пропиленгликолю и тщательно перемешивали. Затем добавляли равный объем антитела в молярном соотношении 1:4 (мАт:соединение) и тщательно перемешивали. Конъюгация продолжалась 1 час при комнатной температуре. Реакцию конъюгации останавливали добавлением 1:20 объема 1 М Триса, pH 8,0, и ADC очищали, как описано в разделе 1.4.4.

1.4.3 Двухстадийная конъюгация на основе амина с применением химии азид-алкинового циклоприсоединения, промотируемого напряжением цикла (SPAAC)

1.4.3.1 Дериватизация дибензилциклооктина (ДБЦО)

[00396] Антитело (MORAb-003 или MORAb-009, не восстановленное) доводили до 10,0 мг/мл в 0,1 М бикарбонате натрия, pH 8,3. 50% пропиленгликоль готовили в 0,1 М бикарбонате натрия, pH 8,3. NHS-ПЭГ₄-ДБЦО (Click Chemistry Tools, 50 mM в ДМСО) добавляли к 50% пропиленгликолю и тщательно перемешивали. Затем добавляли равный объем антитела в молярном соотношении 1:4 (мАт:соединение) и тщательно перемешивали. Конъюгация продолжалась 1 час при комнатной температуре. Непрореагировавший NHS-ПЭГ₄-ДБЦО удаляли, как описано в разделе 1.4.4.

1.4.3.2 Конъюгация

[00397] 50% пропиленгликоль готовили в DPBS. Азидо-линкер-эрибулин добавляли к 50% пропиленгликолю и тщательно перемешивают. Затем в смесь добавляли равный объем ДБЦО-модифицированного MORAb-003 или MORAb-009 в молярном соотношении 1:4 (мАт:соединение) и тщательно перемешивали. SPAAC конъюгацию оставляли на ночь при комнатной температуре. Непрореагировавший NHS-ПЭГ₄-ДБЦО удаляли, как описано в разделе 1.4.4.

1.4.4 Очистка

[00398] Конъюгированное антитело очищали с помощью колонки(ок) для обессоливания HiTrap (GE Healthcare). Хроматографию проводили на быстрой белковой жидкостной хроматографии (ББЖХ) (GE Healthcare), применяя 1X DPBS в качестве подвижного буфера, чтобы удалить малеимидо/OSu/азидо-линкер-эрибулин и пропиленгликоль. Конечное содержание белка определяли с помощью анализа БХК, как описано в разделе 1.3.1 Примера 1.

1.5 Биофизическая характеристика

1.5.1 Анализ эксклюзионной ВЭЖХ

[00399] Агрегацию ADC анализировали с помощью эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (эксклюзионной ВЭЖХ) с применением ВЭЖХ Agilent 1260. ADC разбавляли до 1 мг/мл в DPBS. Затем ADC (10 мкл) вводили в защитную колонку Advanced SEC 300A (4,6 мм×3,5 см, размер пор 2,7 мкм, Agilent), а затем в колонку AdvancedBio 300A (4,6 мм×30 см, размер пор 2,7 мкм). ADC элюировали из колонки 0,1 М фосфатом натрия, содержащим 0,15 М NaCl и 5% ИПС, pH 7,4 при скорости потока 0,25 мл/мин в течение 28 мин. Все данные были проанализированы с помощью программного обеспечения Agilent ChemStation. Процент агрегации рассчитывался как $[PA_{\text{агрегата}}/PA_{\text{общий}}]*100$, где PA=интегрированная площадь пика.

1.5.2 Анализ НИС-ВЭЖХ соотношения лекарственного средства-к-антителу (DAR)

[00400] DAR анализировали с применением ВЭЖХ с гидрофобным взаимодействием (HIC-ВЭЖХ). Образцы вводили в колонку TSKgel® Butyl-NP5, 4,6 мм ID x 3,5 см, непристый размер 2,5 мкм (Tosoh Bioscience), и элюировали с 3-минутным уравниванием в 100% подвижной фазы А, 15-минутным градиентом (0-100% В), 5-минутным выдерживанием в 100% В, 1-минутной заменой на 100% А и 5-минутным повторным уравниванием в 100% подвижной фазы А при 0,7 мл/мин. Подвижная фаза А составляла 25 мМ фосфата натрия, 1,5 М сульфата аммония, pH 7,0. Подвижная фаза В составляла 25 мМ фосфата натрия, 25% изопропанола, pH 7,0. Детекцию проводили при 280 нм (контроль 320 нм). DAR определяли по формуле:

$$[AUC_{+1}+2(AUC_{+2})+3(AUC_{+3})+\dots n(AUC_{+n})]/\Sigma AUC_{\text{общ}}$$

где AUC_{+1} является площадью под кривой для пика антитела, соответствующего ADC, конъюгированному с одним цитотоксином, AUC_{+2} является площадью под кривой для пика антитела, соответствующего ADC, конъюгированному с двумя цитотоксинами, и так далее. $\Sigma AUC_{\text{общ}}$ представляет собой объединенную площадь под кривой для всех пиков.

1.5.3 ЖХ-МС анализ DAR

[00401] DAR также анализировали с применением способа ЖХ-МС с ВЭЖХ Waters Alliance с SQD/PDA детекцией. Образцы вводили в колонку Proteomix RP-1000 (5 мкм, 1000А, 4,6 ммx15 см, Seraph) при 65°C и элюировали с 3-минутным уравниванием в 25% В, 27-минутным линейным градиентом 25% - 55% В, 5-минутным выдерживанием в 55% В, 1-минутной заменой на 90% В, 5-минутным выдерживанием в 90% В, 1-минутной заменой на 25% В и 5-минутным повторным уравниванием в 25% В. Подвижная фаза А представляла собой 0,1% ТФУ в воде и подвижная фаза В представляла собой 0,1% ТФУ в ацетонитриле. Элюат затем разделяли (10:1) в детекторы PDA и SQD. Детектор SQD был настроен в режиме позитивных ионов (ES positive), капиллярное напряжение 3,2 кВ, напряжение конуса 40 В, экстрактор 3 В и радиочастотная линза 0,2 В, температура источника 150°C и температура десольватации 250°C. Данные масс были получены при 200-2000 м/з в течение 40 минут, непрерывном режиме, времени сканирования 1 секунда. Данные анализировали и деконволюционировали в автономном режиме с применением MassLynx и MaxEnt1. DAR рассчитывали, применяя формулу:

$$2[[AUC_{LC+1}+2(AUC_{LC+2})+3(AUC_{LC+3})+\dots n(AUC_{LC+n})]/\Sigma I_{LC\text{общ}}]+ \\ 2[[AUC_{HC+1}+2(AUC_{HC+2})+3(AUC_{HC+3})+\dots n(AUC_{HC+n})]/\Sigma AUC_{HC\text{общ}}]$$

где AUC_{LC+1} представляет собой площадь под кривой пика легкой цепи, конъюгированной с одним цитотоксином, AUC_{LC+2} представляет собой площадь под кривой пика легкой цепи, конъюгированной с двумя цитотоксинами, и так далее. AUC_{HC} представляет собой площадь под кривой соответствующих тяжелых цепей и $\Sigma AUC_{LC\text{общ}}$ и $\Sigma AUC_{HC\text{общ}}$ представляют собой объединенную площадь под кривой всех неконъюгированных и конъюгированных легких цепей и тяжелых цепей, соответственно.

1.5.4 Анализ СВЭЖХ/ЭРИ-МС DAR ADC LCcys80

[00402] ADC (1 мг/мл) восстанавливали добавлением ДТТ до конечной концентрации 20 мМ с последующей инкубацией при 60°C в течение 3 мин. Затем образцы анализировали с применением сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии Waters Acquity и масс-спектрометра Q-ToF Premier. Образцы (0,5-2 мкг каждого) вводили в микроколону для обессоливания MassPrep при 65°C, элюировали из колонки с 5-минутным уравниванием в 95% подвижной фазы А, 10-минутным градиентом (5-90% В), и 10-минутным повторным уравниванием в 95% подвижной фазы А при

0,05 мл/мин. Подвижная фаза А составляла 0,1% муравьиной кислоты в воде. Подвижная фаза В составляла 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле. Масс-спектрометр Q-ToF работал в V-режиме определения положительных ионов с детектированием в диапазоне 500-4000 м/з. Параметры источника были следующими: капиллярное напряжение, 2,25 кВ (интактное антитело)-2,50 кВ (восстановленное антитело); напряжение пробоотборного конуса, 65,0 В (интактное антитело) или 50,0 В (восстановленное антитело); температура источника, 105°C; температура десольватации, 250°C; поток газа десольватации, 550 л/час. Пик белка легкой цепи деконволюционировали с применением функции MassLynx MaxEnt 1. Относительные интенсивности масс неконъюгированной и однократно-конъюгированной легкой цепи применяли для расчета общего DAR по формуле:

$$2[LC_{+1}/\Sigma LC_{\text{общ}}]$$

где LC_{+1} является массовой интенсивностью легкой цепи, конъюгированной с одним цитотоксином и $\Sigma LC_{\text{общ}}$ представляет собой объединенные интенсивности неконъюгированных и конъюгированных легких цепей.

1.6 Характеристика связывания

1.6.1 BIAcore

[00403] Концентрации антител довели до 2 мкг/мл в буфере HBS-P+ (GE Healthcare). Немодифицированные антитела или ADC вводили через сенсор для антител к IgG человека на BIAcore T100 (GE Healthcare) в течение 1 мин при скорости потока 10 мкл/мин. Для регистрации ассоциации антигенов с захваченным антителом вводили серии возрастающих концентраций антигена в течение 300 с при скорости потока 30 мкл/мин. Для антител к мезотелину диапазон концентраций составлял 10 нМ - 0,041 нМ. Для ADC MORAb-003 и MORAb-009 диапазон концентраций составлял 100 нМ - 0,41 нМ. Диссоциацию антигена проверяли в течение 30 мин при той же скорости потока. Поверхность сенсора восстанавливали с помощью введения 3 М $MgCl_2$ в течение 2×30 с при скорости потока 30 мкл/мин. Сенсограммы анализировали с помощью программного обеспечения для оценки BIAcore T100, применяя модель связывания Ленгмюра 1:1.

1.6.2 ИФА - Рецептор фолиевой кислоты альфа

[00404] Рекombинантный рецептор фолиевой кислоты альфа человека разбавляли до 115 нг/мл в буфере для покрытия (50 мМ карбонат-бикарбонатного буфера, pH 9,6) и наносили в черные 96-луночные планшеты Maxisorp (Thermo, Cat No. 43711, 100 мкл/лунку) при 4°C, на ночь. Раствор для покрытия выбрасывали и планшеты промывали три раза, применяя 1X ФСБ с 0,05% буфером Твин-20 (ФСБ-Твин). Планшеты блокировали в 300 мкл блокирующего буфера (1% БСА в ФСБ-Твин) при комнатной температуре в течение 2 часов на орбитальном шейкере. ADC MORAb-003 и MORAb-003 разводили до 1000 нг/мл в блокирующем буфере, затем 2-кратно серийно разводили для получения диапазона от 1000 нг/мл до 0,98 нг/мл. Блокирующий буфер выбрасывали и в планшеты добавляли 100 мкл/лунку разбавленного антитела. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов на орбитальном шейкере. Раствор антитела выбрасывали и планшеты промывали три раза, применяя ФСБ-Твин. К планшетам добавляли 100 мкл/лунку раствора антитела козы к человеческому IgG (H+L)-HRP (разведение 1:10000 в блокирующем буфере) и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа на орбитальном шейкере. Раствор вторичных антител выбрасывали и планшеты промывали три раза, применяя ФСБ-Твин. К планшетам добавляли 100 мкл/лунку рабочего раствора флуорогенного субстрата

пероксидазы QuantaBlu (Thermo, Cat No. 15169) и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Флуоресценцию считывали при возбуждении 325 нм/эмиссии 420 нм, применяя SpectraMax M5 (Molecular Devices). Данные анализировали с применением программного обеспечения SoftMaxPro 5. 4. 2 с 4-параметрической

5 подгонкой.

1.6.3 ИФА - Мезотелин

[00405] Рекомбинантный мезотелин человека разбавляли до 1 мкг/мл в буфере для покрытия (50 мМ карбонат-бикарбонатного буфера, pH 9,6) и наносили в черные 96-

10 луночные планшеты Maxisorp (Thermo, Cat No. 43711, 100 мкл/лунку) при 4°C, на ночь. Раствор для покрытия выбрасывали и планшеты промывали три раза, применяя 1X ФСБ с 0,05% буфером Твин-20 (ФСБ-Твин). Планшеты блокировали в 300 мкл блокирующего буфера (1% БСА в ФСБ-Твин) при комнатной температуре в течение 2 часов на орбитальном шейкере. ADC MORAb-009 и MORAb-009 разводили до 1000 нг/мл в блокирующем буфере, затем 2,5-кратно серийно разводили для получения

15 диапазона от 1000 нг/мл до 0,105 нг/мл. Блокирующий буфер выбрасывали и в планшеты добавляли 100 мкл/лунку разбавленного антитела. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов на орбитальном шейкере. Раствор антитела выбрасывали и планшеты промывали три раза, применяя ФСБ-Твин. К планшетам добавляли 100 мкл/лунку раствора антитела козы к человеческому IgG (H+L)-HRP

20 (разведение 1:10000 в блокирующем буфере) и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа на орбитальном шейкере. Раствор вторичных антител выбрасывали и планшеты промывали три раза, применяя ФСБ-Твин. К планшетам добавляли 100 мкл/лунку рабочего раствора флуорогенного субстрата пероксидазы QuantaBlu (Thermo, Cat No. 15169) и планшеты инкубировали при комнатной температуре

25 в течение 30 мин. Флуоресценцию считывали при возбуждении 325 нм/эмиссии 420 нм, применяя SpectraMax M5 (Molecular Devices). Данные анализировали с применением программного обеспечения SoftMaxPro 5. 4. 2 с 4-параметрической подгонкой.

1.7 Анализ цитотоксичности

1.7.1 Анализ окрашивания кристаллическим фиолетовым

30 [00406] Клетки IGROV1 (FR^{hi}, MSLN^{neg}), NCI-H2110 (FR^{med}, MSLN^{med}) и A431 (FR^{neg}, MSLN^{neg}) субкультивировали и высевали при 5000 клеток/лунку в готовую питательную среду в 96-луночных планшетах для культивирования тканей, инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение ночи (16 часов). Реагенты для испытания серийно разводили 1:3 в

35 планшетах для разведения с 2-миллилитровыми глубокими лунками, начиная с 200 нМ (всего 10 разведений). Разбавленные образцы (100 мкл) добавляли к клеточным планшетам (при начальной концентрации образцов для испытания 100 нМ). Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение дополнительных 5 дней. Затем среду выбрасывали. Планшеты промывали один раз с 200 мкл DPBS, окрашивали с 50 мкл

40 0,2% раствора кристаллического фиолетового при комнатной температуре в течение 15 мин и затем тщательно промывали водопроводной водой. Планшеты сушили на воздухе, а кристаллический фиолетовый растворяли с 200 мкл 1% раствора ДСН. Планшеты считывали при 570 нм. Данные анализировали с применением GraphPad Prism 6.

45 2. Результаты

2.1 Биофизическая характеристика ADC MORAb-003, MORAb-009 и трастузумаба

[00407] ADC MORAb-003 (гуманизированного антитела к рецептору фолиевой кислоты альфа человека), MORAb-009 (химерного антитела мыши/человека к мезотелину

человека) и трастузумаба (гуманизированного антитела к her2) были приготовлены с применением конъюгируемых соединений эрибулина, перечисленных в таблице 46, в соответствии с одним из трех способов конъюгации, включая: (1) частичное восстановление межцепочечных дисульфидов антитела с применением восстанавливающего агента ТСЕР, не содержащего тиол, с последующей конъюгацией с применением тиол-реактивных конструкций малеимидо-спейсер-линкер-эрибулина; (2) прямая конъюгация с остатками лизина антитела с применением конструкций сукцинимид (OSu)-спейсер-линкер-эрибулина; и (3) конъюгация с остатками лизина антитела с применением двухстадийного подхода, в результате чего сначала конъюгировали OSu-ПЭГ4-добензилциклооктин с остатками лизина, затем проводили ортогональную конъюгацию конструкций азидо-спейсер-линкер-эрибулина с применением SPAAC.

[00408] После очистки уровни агрегации для всех ADC MORAb-003, MORAb-009 и трастузумаба определяли с помощью эксклюзионной ВЭЖХ и соотношение лекарственного средства-к-антителу (DAR) анализировали с применением обращенно-фазовой ЖХ-МС и/или НИС-ВЭЖХ. DAR для всех ADC, созданных на основе малеимида, анализировали с применением как обращенно-фазовой ЖХ-МС, так и НИС-ВЭЖХ. Между этими двумя способами обычно наблюдалась разница значений DAR менее, чем 0,3. Напротив, DAR для всех ADC, полученных путем конъюгации через остатки лизина, анализировали только с помощью ЖХ-МС, поскольку высокая степень гетерогенности этих ADC препятствует разделению отдельных видов DAR путем НИС-ВЭЖХ. Для ADC MORAb-003 и MORAb-009 связывание с целевым антигеном также анализировали с помощью ИФА. Результаты анализов агрегации и DAR приведены в таблице 47 рядом с соответствующим ADC.

Таблица 47. Биофизический анализ ADC MORAb-003, MORAb-009 и трастузумаба					Анализ DAR		Анализ эксклюзионной ВЭЖХ			Связывание с антигеном	
ADC	антитело	химия конъюгации	спейсер	химия расщепления	DAR (ЖХ-МС)	DAR (НИС-ВЭЖХ)	% Агр.	% Мономер	% Фраг.	ИФА, ЭК ₅₀ , нг/мл	ИФА, ЭК ₅₀ , нМ
MORAb003		Н/П	Н/П	Н/П			3,62	96,38	0	6,29	0,04
MORAb009		Н/П	Н/П	Н/П			0	100	0	42,60	0,28
трастузумаб		Н/П	Н/П	Н/П			3,52	96,48	0	Н/П	Н/П
MORAb003-ER1159569 (Партия NB3073-88L)	MORAb-003	малеимид	ПЭГ2	val-cit-pAB	3,58	3,91	3,12	96,88	0	22,60	0,15
MORAb009-ER1159569 (Партия NB3073-88F)	MORAb-009	малеимид	ПЭГ2	val-cit-pAB	3,63	3,93	3,23	96,77	0	43,70	0,29
MORAb003-ER1159569 (Партия NB3142-62A)	MORAb-003	малеимид	ПЭГ2	val-cit-pAB	4,80	4,88	3,21	96,79	0	18,20	0,12
MORAb009-ER1159569 (Партия NB3142-62D)	MORAb-009	малеимид	ПЭГ2	val-cit-pAB	4,68	4,57	0,90	99,10	0	33,10	0,22
трастузумаб-ER1159569	трастузумаб	малеимид	ПЭГ2	val-cit-pAB	3,10	3,11	1,26	98,74	0	Н/П	Н/П
MORAb003-ER1242287	MORAb-003	малеимид	ПЭГ8	val-cit-pAB	2,31	2,35	18,63	81,37	0	21,50	0,14
MORAb009-ER1242287	MORAb-009	малеимид	ПЭГ8	val-cit-pAB	1,13	2,00	11,24	88,76	0	58,60	0,39
MORAb003-ER1235638	MORAb-003	малеимид	пентил	val-cit-pAB	3,65	3,89	3,95	96,05	0	15,30	0,10

5	MORAb009-ER1235638	MORAb-009	малеимид	пентил	val-cit-pAB	3,99	4,10	4,5	95,5	0	65,60	0,44
	MORAb003-ER1231679	MORAb-003	малеимид	ПЭГ2	ala-ala-asn-pAB	3,60	3,83	3,09	96,91	0	18,30	0,12
	MORAb009-ER1231679	MORAb-009	малеимид	ПЭГ2	ala-ala-asn-pAB	3,27	3,94	4,39	95,61	0	41,40	0,28
	MORAb003-ER1231690	MORAb-003	малеимид	ПЭГ2	ala-ala-asn-pAB-ala-ala-asn-pAB	3,02	3,23	4,44	95,56	0	8,92	0,06
	MORAb009-ER1231690	MORAb-009	малеимид	ПЭГ2	ala-ala-asn-pAB-ala-ala-asn-pAB	2,36	3,17	6,22	93,78	0	58,70	0,39
10	MORAb003-ER1237504	MORAb-003	малеимид	ПЭГ4-триазол-ПЭГ3	диульфидил-диметил-pAB	0,52	1,61	13,73	86,27	0	29,80	0,20
	MORAb009-ER1237504	MORAb-009	малеимид	ПЭГ4-триазол-ПЭГ3	диульфидил-диметил-pAB	0,72	1,03	9,78	90,22	0	55,90	0,37
15	MORAb003-ER1237505	MORAb-003	малеимид	ПЭГ4-триазол-ПЭГ3	сульфонамид	1,85	3,88	5,72	94,28	0	18,30	0,12
	MORAb009-ER1237505	MORAb-009	малеимид	ПЭГ4-триазол-ПЭГ3	сульфонамид	2,33	3,91	5,44	94,56	0	61,00	0,41
20	MORAb003-ПЭГ2-эрибулин	MORAb-003	малеимид	ПЭГ2	нерасщепляемый	4,15	4,49	3,97	96,03	0	6,96	0,05
	MORAb009-ПЭГ2-эрибулин	MORAb-009	малеимид	ПЭГ2	нерасщепляемый	4,55	4,30	1,15	97,11	1,74	8,84	0,06
	MORAb003-ПЭГ4-эрибулин	MORAb-003	малеимид	ПЭГ4	нерасщепляемый	4,70	4,79	9,84	89,76	0	9,31	0,06
25	MORAb009-ПЭГ4-эрибулин	MORAb-009	малеимид	ПЭГ4	нерасщепляемый	4,48	4,57	1,03	97,13	1,84	11,60	0,08
	MORAb003-ER1236940	MORAb-003	сукцинимид	ПЭГ2	val-cit-pAB	0,72		3,65	96,35	0	17,00	0,11
	MORAb009-ER1236940	MORAb-009	сукцинимид	ПЭГ2	val-cit-pAB	0,89		2,75	97,25	0	66,30	0,44
30	MORAb003-ER1242288	MORAb-003	сукцинимид	ПЭГ9	val-cit-pAB	0,00		2,85	97,15	0	14,40	0,10
	MORAb009-ER1242288	MORAb-009	сукцинимид	ПЭГ9	val-cit-pAB	0,21		1,69	98,31	0	15,30	0,10
	MORAb003-ER1236941	MORAb-003	сукцинимид	пентил	val-cit-pAB	0,77		3,13	96,87	0	13,00	0,09
35	MORAb009-ER1236941	MORAb-009	сукцинимид	пентил	val-cit-pAB	0,93		3,04	96,96	0	44,60	0,30
	MORAb003-ER1243700	MORAb-003	сукцинимид	ПЭГ3-триазол-ПЭГ3	val-cit-pAB	0,00		3,92	96,08	0	6,22	0,04
	MORAb009-ER1243700	MORAb-009	сукцинимид	ПЭГ3-триазол-ПЭГ3	val-cit-pAB	0,06		1,97	98,03	0	46,70	0,31
40	MORAb003-ER1231691	MORAb-003	сукцинимид	ПЭГ2	ala-ala-asn-pAB	0,37		3,46	96,54	0	11,50	0,08
	MORAb009-ER1231691	MORAb-009	сукцинимид	ПЭГ2	ala-ala-asn-pAB	0,29		2,45	97,55	0	43,30	0,29
	MORAb003-ER1244129	MORAb-003	сукцинимид	ПЭГ3-триазол-ПЭГ3	диульфидил-диметил-pAB	0,24		10,87	89,13	0	14,30	0,10
45	MORAb009-ER1244129	MORAb-009	сукцинимид	ПЭГ3-триазол-ПЭГ3	диульфидил-диметил-pAB	0,47		12,79	87,21	0	57,70	0,38
	MORAb003-ER1244623	MORAb-003	сукцинимид	ПЭГ3-триазол-ПЭГ3	сульфонамид	0,55		5,21	94,79	0	4,54	0,03
	MORAb009-ER1244623	MORAb-009	сукцинимид	ПЭГ3-триазол-ПЭГ3	сульфонамид	1,14		0	100	0	39,00	0,26

5	MORAb003-ДБЦО-ER1237508	MORAb-003	сукцини-мид/клик	дибензил-циклоок-тен-триа-зол-ПЭГ3	диульфи-дил-димер-тил-рAB	2,19	4,1	95,9	0	24,10	0,16
	MORAb009-ДБЦО-ER1237508	MORAb-009	сукцини-мид/клик	дибензил-циклоок-тен-триа-зол-ПЭГ3	диульфи-дил-димер-тил-рAB	2,33	0	100	0	53,80	0,36
10	MORAb003-ДБЦО-ER1138856	MORAb-003	сукцини-мид/клик	дибензил-циклоок-тен-триа-зол-ПЭГ3	сульфона-мид	1,82	3,49	96,51	0	15,00	0,10
	MORAb009-ДБЦО-ER1138856	MORAb-009	сукцини-мид/клик	дибензил-циклоок-тен-триа-зол-ПЭГ3	сульфона-мид	1,59	0	100	0	44,70	0,30
15	MORAb003-ДБЦО-ПЭГ4 VCP эрибулин	MORAb-003	сукцини-мид/клик	дибензил-циклоок-тен-триа-зол-ПЭГ4	val-cit-pAB	3,09	2,87	97,13	0	16,00	0,11
	MORAb009-ДБЦО-ПЭГ4 VCP эрибулин	MORAb-009	сукцини-мид/клик	дибензил-циклоок-тен-триа-зол-ПЭГ4	val-cit-pAB	2,91	0,22	99,78	0	33,70	0,22
20	MORAb003-ДБЦО-ПЭГ2 эрибулин	MORAb-003	сукцини-мид/клик	дибензил-циклоок-тен-триа-зол-ПЭГ2	нерасщепля-емый	3,43	3,88	96,12	0	19,10	0,13
	MORAb009-ДБЦО-ПЭГ2 эрибулин	MORAb-009	сукцини-мид/клик	дибензил-циклоок-тен-триа-зол-ПЭГ2	нерасщепля-емый	3,07	1,15	98,85	0	23,30	0,16
25	MORAb003-ДБЦО-ПЭГ4 эрибулин	MORAb-003	сукцини-мид/клик	дибензил-циклоок-тен-триа-зол-ПЭГ4	нерасщепля-емый	2,96	3,64	96,36	0	13,30	0,09
	MORAb009-ДБЦО-ПЭГ4 эрибулин	MORAb-009	сукцини-мид/клик	дибензил-циклоок-тен-триа-зол-ПЭГ4	нерасщепля-емый	2,8	1,12	98,88	0	45,20	0,30

Сокращения: % Агр., % агрегации; % Фраг, % фрагментации.

2.1.1 ADC MORAb-003, MORAb-009 и трастузумаба

[00409] Никаких значимых различий между MORAb-003, MORAb-009 и трастузумабом не наблюдалось с точки зрения, как эффективности конъюгации, так и биофизических параметров. Все ADC демонстрировали подобные значения DAR и уровни образования агрегатов.

2.1.2 ADC на основе малеимида

[00410] Для ADC на основе малеимида, как спейсеры пентил и ПЭГ₂, спаренные с сайтом расщепления val-cit-pAB, так и спейсер ПЭГ₂, спаренный с сайтом расщепления ala-ala-asn-pAB, давали значения DAR между 3,5 и 4,0 по обращенно-фазной ЖХ-МС и НИС-ВЭЖХ, в дополнение к низким (<5%) уровням агрегатов. Однако, когда спейсер для ПЭГ₈ (спаренному с сайтом расщепления val-cit-pAB) удлиняли, уровни агрегатов возрастали (11-18%), а эффективность конъюгации снижалась, что приводило к значениям DAR между 1,1 и 2,3. См., например, процент агрегации и значения DAR для MORAb003/MORAb009-ER-001159569 (короткий ПЭГ-линкер) и MORAb003/MORAb009-1242287 (длинный ПЭГ-линкер) в таблице 47.

[00411] Для ADC, приготовленных с сайтом расщепления дисульфидил-рАВ, наблюдали низкие значения DAR (1,0-1,6) вместе с относительно высокими уровнями агрегатов (10-14%). Значительно более низкие значения DAR наблюдались, когда эти ADC анализировали с помощью ЖХ-МС, чем с помощью НИС-ВЭЖХ (см., например, ЖХ-МС/НИС-ВЭЖХ значения DAR для MORAb003/MORAb009-ER1237504 и MORAb003/MORAb009-ER1237505 в таблице 47). Этот результат предполагает, что линкерный сайт расщепления показывает связанную с pH нестабильность, поскольку подвижная фаза анализа ЖХ-МС имеет приблизительно 3,0, тогда как подвижная фаза анализа НИС-ВЭЖХ является нейтральной.

[00412] Для ADC, приготовленных с сульфонамидным сайтом расщепления, наблюдали низкие (<5%) уровни агрегатов. Подобно к ADC дисульфидил-рАВ, наблюдали более низкие значения DAR при анализе с помощью ЖХ-МС (1,8-2,3), чем при НИС-ВЭЖХ (3,9), что еще раз указывает на то, что линкерный сайт расщепления показывает связанную с pH нестабильность.

[00413] Для нерасщепляемых линкеров ПЭГ₂ и ПЭГ₄ наблюдали эффективную конъюгацию, приводящую к значениям DAR от 4,0 до 4,7. ADC MORAb-009 с этими нерасщепляемыми линкерами также демонстрировали низкие уровни агрегации (<2%), в то время как наблюдались несколько более высокие уровни агрегации для соответствующих ADC MORAb-003 (4% и 10% для ПЭГ₂ и ПЭГ₄, соответственно).

2.1.3 ADC на основе сукцинимиды

[00414] Все ADC, приготовленные с применением сукцинимиды, соединенного со спейсер-линкер-эрибулином, давали значения DAR < 1,0. Чтобы подтвердить, что данная сниженная эффективность конъюгации (по отношению к малеимидам) не была следствием самой процедуры конъюгации, эти ADC были переделаны с применением более высокого соотношения соединения:антитела и повторно проанализированы с применением тех же способов анализа DAR. Были получены аналогичные результаты, что, без привязки к теории, означает, что более низкие значения DAR являются постоянным свойством комбинации сукцинимиды и эрибулина и что малеимиды могут быть более эффективно конъюгированы. Эффективность конъюгации сукцинимиды повышали с помощью применения двухстадийного способа, в соответствии с чем сначала добавляли ДБЦО к антителу применяя NHS-DBCO с последующим добавлением азидосоединений. Этот подход приводит к более высоким значениям DAR, что измерено с помощью анализа обращенно-фазной ВЭЖХ, по сравнению с конъюгацией непосредственно с остатками лизина антитела. Для ADC на основе сукцинимиды, имеющих линкеры сульфонамид (расщепляемый), val-cit-РАВ (расщепляемый) или ПЭГ₂/ПЭГ₄ (нерасщепляемый), значения DAR, полученные в результате двухстадийной конъюгации, были аналогичны значениям, определенным для ADC на основе малеимида, имеющих сульфонамидный сайт расщепления. Не привязываясь к теории, этот результат снова указывает на то, что более низкие значения DAR для реакций конъюгации сукцинимид-спейсер-линкер-эрибулина являются постоянным свойством комбинации сукцинимиды и эрибулина.

2.2 Характеристика связывания ADC MORAb-003 и MORAb-009

[00415] Для ADC MORAb-003 в отношении связывания целевого антигена не наблюдалось значимых различий между ADC с нерасщепляемым, созданным на основе малеимида линкером-эрибулином, и исходным MORAb-003. Для других ADC MORAb-003, с созданным на основе малеимида линкером-эрибулином, обычно, с помощью ИФА, наблюдали 2-3-кратную потерю связывания целевого антигена по сравнению с

исходным MORAb-003. Однако не наблюдалось никакой корреляции между длиной линкера или составом линкера и более низкими значениями ЭК₅₀. Аналогично, для ADC MORAb-003, с созданным на основе сукцинимид-линекром-эрибулином, обычно наблюдали 0-3-кратную потерю связывания целевого антигена по сравнению с неконъюгированным MORAb-003. Опять же, никакой корреляции между длиной линкера или составом линкера и более низкими значениями ЭК₅₀ не было. Для ADC MORAb-009 все ADC имели менее чем 2-кратное снижение значений ЭК₅₀ относительно исходного MORAb-009.

2.3 Анализы цитотоксичности ADC MORAb-003, MORAb-009 и трастузумаба in vitro [00416] Активность приготовленных ADC MORAb-003, MORAb-009 и трастузумаба in vitro оценивали, применяя анализ цитотоксичности на клетках на основе окрашивания кристаллическим фиолетовым. Клеточные линии, выбранные для скрининга ADC MORAb-003 и MORAb-009, представляли собой IGROV1, NCI-H2110 и A431. Клетки IGROV1 имеют происхождение эпителиальной карциномы яичников человека и экспрессируют высокие уровни рецептора фолиевой кислоты альфа, но не имеют мезотелин (то есть, MORAb-003-реактивный). Клетки NCI-H2110 имеют происхождение немелкоклеточной карциномы легких человека и экспрессируют умеренные уровни как рецептора фолиевой кислоты альфа, так и мезотелина (то есть, MORAb-003- и MORAb-009-реактивные). Контрольные клетки A431 имеют происхождение эпидермальной карциномы человека и не экспрессируют никакой целевой антиген. Результаты этого скрининга приведены в таблице 48. ADC MORAb-003, MORAb-009 и трастузумаба, содержащие линкер-токсин малеимидо-ПЭГ2-val-cit-pAB-эрибулин (VCP-эрибулин), также оценивали на дополнительных линиях клеток рака желудка и рака молочной железы, включая NCI-N87 (FR^{lo}, MSLN^{med}, her2^{hi}), BT-474 (FR^{neg}, MSLN^{neg}, her2^{hi}), ZR-75 (FR^{neg}, MSLN^{neg}, her2^{med}) и NUGC3 (FR^{neg}, MSLN^{neg}, her2^{neg}). Результаты этого скрининга приведены в таблице 49.

Таблица 48. Скрининг цитотоксичности (ИК ₅₀) ADC MORAb-003 и MORAb-009 на клетках IGROV1, NCI-H2110 и A431					Анализ цитотоксичности					
					IGROV1 (FR ^{hi} , MSLN ^{neg})		NCI-H2110 (FR ^{med} , MSLN ^{med})		A431 (FR ^{neg} , MSLN ^{neg})	
ADC	антитело	химия конъюгации	спейсер	химия расщепления	ИК ₅₀ (нМ)	CO	ИК ₅₀ (нМ)	CO	ИК ₅₀ (нМ)	CO
MORAb003		Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
MORAb009		Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П
трастузумаб-эрибулин	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	0,320	0,212	0,199	0,034	0,653	0,159
MORAb003-ER1159569 (Партия NB3073-88L)	MORAb-003	малеимид	ПЭГ2	val-cit-pAB	0,155	0,064	3,685	0,417	>100	
MORAb009-ER1159569 (Партия NB3073-88F)	MORAb-009	малеимид	ПЭГ2	val-cit-pAB	9,450	2,093	14,945	1,747	>100	
MORAb003-ER1159569 (Партия NB3142-62A)	MORAb-003	малеимид	ПЭГ2	val-cit-pAB	0,020		1,550		>100	
MORAb009-ER1159569 (Партия NB3142-62D)	MORAb-009	малеимид	ПЭГ2	val-cit-pAB	5,687		6,784		>100	
трастузумаб-ER1159569	трастузумаб	малеимид	ПЭГ2	val-cit-pAB						

5	MORAb003-ER1242287	MORAb-003	малеимид	ПЭГ8	val-cit-pAB	0,115	0,035	7,065	0,417	85,960	
	MORAb009-ER1242287	MORAb-009	малеимид	ПЭГ8	val-cit-pAB	25,765	8,478	34,455	3,033	>100	
	MORAb003-ER1235638	MORAb-003	малеимид	пентил	val-cit-pAB	0,105	0,092	3,920	1,032	>100	
	MORAb009-ER1235638	MORAb-009	малеимид	пентил	val-cit-pAB	6,830	0,962	13,965	6,611	>100	
10	MORAb003-ER1231679	MORAb-003	малеимид	ПЭГ2	ala-ala-asn-pAB	0,080	0,028	3,800	0,566	31,630	1,202
	MORAb009-ER1231679	MORAb-009	малеимид	ПЭГ2	ala-ala-asn-pAB	8,890	0,976	7,080	1,867	34,390	3,536
	MORAb003-ER1231690	MORAb-003	малеимид	ПЭГ2	ala-ala-asn-pAB-ala-ala-asn-pAB	0,125	0,021	4,745	2,114	38,555	0,403
	MORAb009-ER1231690	MORAb-009	малеимид	ПЭГ2	ala-ala-asn-pAB-ala-ala-asn-pAB	16,980	5,176	12,310	3,422	54,960	5,360
15	MORAb003-ER1237504	MORAb-003	малеимид	ПЭГ4-триазол-ПЭГ3	диульфидил-диметил-pAB	0,265	0,092	0,845	0,177	7,005	0,290
	MORAb009-ER1237504	MORAb-009	малеимид	ПЭГ4-триазол-ПЭГ3	диульфидил-диметил-pAB	6,375	2,751	1,220	0,325	8,130	0,608
	MORAb003-ER1237505	MORAb-003	малеимид	ПЭГ4-триазол-ПЭГ3	сульфонамид	0,370	0,269	0,690	0,283	6,800	0,834
	MORAb009-ER1237505	MORAb-009	малеимид	ПЭГ4-триазол-ПЭГ3	сульфонамид	6,370	3,012	0,990	0,453	9,030	1,527
20	MORAb003-ПЭГ2-эрибулин	MORAb-003	малеимид	ПЭГ2	нерасщепляемый	0,330		38,300		>100	
	MORAb009-ПЭГ2-эрибулин	MORAb-009	малеимид	ПЭГ2	нерасщепляемый	42,770		50,040		>100	
	MORAb003-ПЭГ4-эрибулин	MORAb-003	малеимид	ПЭГ4	нерасщепляемый	0,277		21,630		>100	
	MORAb009-ПЭГ4-эрибулин	MORAb-009	малеимид	ПЭГ4	нерасщепляемый	76,320		31,600		>100	
30	MORAb003-ER1236940	MORAb-003	сукцинимид	ПЭГ2	val-cit-pAB	0,325	0,106	30,545	3,132	>100	
	MORAb009-ER1236940	MORAb-009	сукцинимид	ПЭГ2	val-cit-pAB	31,915	2,510	36,500	11,031	90,060	
	MORAb003-ER1242288	MORAb-003	сукцинимид	ПЭГ9	val-cit-pAB	38,105	45,601	64,010	8,075	>100	
	MORAb009-ER1242288	MORAb-009	сукцинимид	ПЭГ9	val-cit-pAB	>100		>100		>100	
35	MORAb003-ER1236941	MORAb-003	сукцинимид	пентил	val-cit-pAB	0,330	0,071	42,105	12,594	>100	
	MORAb009-ER1236941	MORAb-009	сукцинимид	пентил	val-cit-pAB	>100		49,485	13,569	>100	
	MORAb003-ER1243700	MORAb-003	сукцинимид	ПЭГ3-триазол-ПЭГ3	val-cit-pAB	1,150		>100		>100	
	MORAb009-ER1243700	MORAb-009	сукцинимид	ПЭГ3-триазол-ПЭГ3	val-cit-pAB	>100		>100		>100	
40	MORAb003-ER1231691	MORAb-003	сукцинимид	ПЭГ2	ala-ala-asn-pAB	12,320		31,795	4,448	>100	
	MORAb009-ER1231691	MORAb-009	сукцинимид	ПЭГ2	ala-ala-asn-pAB	>100		20,000	5,954	>100	
	MORAb003-ER1244129	MORAb-003	сукцинимид	ПЭГ3-триазол-ПЭГ3	диульфидил-диметил-pAB	0,370	0,184	0,750	0,071	12,005	1,534
	MORAb009-ER1244129	MORAb-009	сукцинимид	ПЭГ3-триазол-ПЭГ3	диульфидил-диметил-pAB	6,595	4,052	0,840	0,057	9,230	0,014

	MORAb003-ER1244623	MORAb-003	сукцинимид	ПЭГ3-триазол-ПЭГ3	сульфонамид	0,980	0,396	1,820	0,410	37,235	15,733
	MORAb009-ER1244623	MORAb-009	сукцинимид	ПЭГ3-триазол-ПЭГ3	сульфонамид	24,505	4,702	2,235	0,629	36,665	14,206
5	MORAb003-ДБЦО-ER1237508	MORAb-003	сукцинимид/клик	дибензил-циклооктен-триазол-ПЭГ3	диульфидил-диметил-рАВ	0,545	0,389	0,900	0,071	9,670	0,382
10	MORAb009-ДБЦО-ER1237508	MORAb-009	сукцинимид/клик	дибензил-циклооктен-триазол-ПЭГ3	диульфидил-диметил-рАВ	10,245	3,486	1,040	0,297	11,280	2,277
	MORAb003-ДБЦО-ER1138856	MORAb-003	сукцинимид/клик	дибензил-циклооктен-триазол-ПЭГ3	сульфонамид	1,775	1,421	1,655	0,007	24,990	2,022
15	MORAb009-ДБЦО-ER1138856	MORAb-009	сукцинимид/клик	дибензил-циклооктен-триазол-ПЭГ3	сульфонамид	19,155	5,438	1,960	0,113	28,070	0,636
	MORAb003-ДБЦО-ПЭГ4 VCP эрибулин	MORAb-003	сукцинимид/клик	дибензил-циклооктен-триазол-ПЭГ4	val-cit-pAB	0,038		4,281		>100	
20	MORAb009-ДБЦО-ПЭГ4 VCP эрибулин	MORAb-009	сукцинимид/клик	дибензил-циклооктен-триазол-ПЭГ4	val-cit-pAB	12,960		31,400		>100	
25	MORAb003-ДБЦО-ПЭГ2 эрибулин	MORAb-003	сукцинимид/клик	дибензил-циклооктен-триазол-ПЭГ2	нерасщепляемый	4,250		38,070		>100	
	MORAb009-ДБЦО-ПЭГ2 эрибулин	MORAb-009	сукцинимид/клик	дибензил-циклооктен-триазол-ПЭГ2	нерасщепляемый	75,680		85,680		>100	
30	MORAb003-ДБЦО-ПЭГ4 эрибулин	MORAb-003	сукцинимид/клик	дибензил-циклооктен-триазол-ПЭГ4	нерасщепляемый	1,323		46,280		>100	
35	MORAb009-ДБЦО-ПЭГ4 эрибулин	MORAb-009	сукцинимид/клик	дибензил-циклооктен-триазол-ПЭГ4	нерасщепляемый	61,490		39,330		>100	

Все значения ИК₅₀ представлены в нМ и представляют собой средние значения повторных экспериментов. СО - стандартное отклонение.

40	Таблица 49. Скрининг цитотоксичности (ИК ₅₀) ADC MORAb-003, MORAb-009 и трастузумаба на клетках NCI-N87, BT-474, ZR-75 и NUGC3					Анализ цитотоксичности			
						NCI-N87-Luc (FR ^{lo} , MSLN ^{med} , her2 ^{hi})	BT-474 (FR ^{neg} , MSLN ^{neg} , her2 ^{hi})	ZR-75-1 (FR ^{neg} , MSLN ^{neg} , her2 ^{med})	NUGC3-Luc (FR ^{neg} , MSLN ^{neg} , her2 ^{neg})
45	ADC	антитело	химия конъюгации	спейсер	химия расщепления	ИК ₅₀ (нМ)	ИК ₅₀ (нМ)	ИК ₅₀ (нМ)	ИК ₅₀ (нМ)
	MORAb003		Н/П	Н/П	Н/П				
	MORAb009		Н/П	Н/П	Н/П				
	трастузумаб		Н/П	Н/П	Н/П	0,78	0,641	>100	>100

	эрибулин	Н/П	Н/П	Н/П	Н/П	0,257	0,151	0,236	0,445
	MORAb003- ER1159569 (Партия NB3073-88L)	MORAb- 003	малеимид	ПЭГ2	val-cit-pAB				
5	MORAb009- ER1159569 (Партия NB3073-88F)	MORAb- 009	малеимид	ПЭГ2	val-cit-pAB				
	MORAb003- ER1159569 (Партия NB3142- 62A)	MORAb- 003	малеимид	ПЭГ2	val-cit-pAB	4,528	11,46	14,74	20,45
10	MORAb009- ER1159569 (Партия NB3142- 62D)	MORAb- 009	малеимид	ПЭГ2	val-cit-pAB	0,013	10,21	12,8	29,93
	трастузумаб- ER1159569	трастузу- маб	малеимид	ПЭГ2	val-cit-pAB	0,006	0,003	0,023	20,06

Все значения ИК₅₀ представлены в нМ и представляют собой средние значения повторных экспериментов. СО - стандартное отклонение.

15 2.1.1

2.3.1 Цитотоксичность ADC на основе малеимида

[00417] Все ADC MORAb-003 и MORAb-009, созданные на основе малеимида, проявляли специфическую цитотоксичность на клетках IGROV1 с наблюдаемой между антителами разницей по эффективности в 2-3 порядка. ADC MORAb-003 val-cit-pAB-эрибулин продемонстрировали более высокую активность на клеточной линии IGROV1, чем нерасщепляемые ADC MORAb-003 ПЭГ₂ или ПЭГ₄, однако уровень специфичности не изменился. Аналогичные тенденции наблюдались для ADC MORAb-009, с нерасщепляемыми ADC MORAb-009, демонстрирующими более низкую цитотоксичность на клетках IGROV1, чем ADC MORAb-009 val-cit-pAB-эрибулин.

25 [00418] ADC MORAb-009 на основе малеимида с линкерами на основе дисульфида и сульфонида продемонстрировали более высокую активность на клеточной линии NCI-H2110, чем на клеточной линии IGROV1. Это может быть связано с потенциальной нестабильностью линкеров в культуре, как указано ниже. Также наблюдалась высокая цитотоксичность с соответствующими ADC MORAb-003. Напротив, ADC MORAb-003 и MORAb-009 на основе малеимида с нерасщепляемыми линкерами демонстрировали относительно низкую активность на клетках NCI-H2110. Не привязываясь к теории, этот результат указывает на то, что, при более низкой целевой экспрессии, эффективное расщепление и высвобождение полезной нагрузки может увеличить цитотоксичность.

35 [00419] ADC с расщепляемым ферментом линкером val-cit-pAB или нерасщепляемым линкером продемонстрировали низкие уровни нецелевого уничтожения на контрольных клетках A431 (ИК₅₀ > 100 нМ), тогда как ADC с расщепляемым ферментом линкером ala-ala-asn-pAB проявили слабое, но обнаруживаемое уничтожение данных контрольных клеток. Это указывает на то, что расщепляемые ферментом линкеры val-cit-pAB могут быть более стабильными в культуре, чем расщепляемые ферментом линкеры ала-ала-asn-pAB. Кроме того, ADC MORAb-009 с более коротким спейсером ПЭГ₂

40 продемонстрировали более высокую цитотоксичность на клетках IGROV1, чем соответствующие ADC с более длинным спейсером ПЭГ₈. Аналогичная тенденция наблюдалась на клетках NCI-H2110 как для ADC MORAb-003, так и для ADC MORAb-009 с более короткой длиной спейсера, приводящей к более высокой цитотоксичности.

45 [00420] ADC с линкерами на основе сульфонида обычно демонстрировали более высокие значения DAR и более низкие уровни агрегатов по сравнению с соответствующими ADC с линкерами на основе дисульфида. Однако в обеих этих

категориях ADC наблюдалось уничтожение контрольных клеток A431 на наномолярном уровне, указывая на то, что линкеры на основе дисульфидила и сульфонамида были менее стабильными в культуре, чем расщепляемые ферментом линкеры в проверенных условиях анализа.

5 [00421] Конкретный линкер-токсин малеимида-ПЭГ₂-val-cit-pAB-эрибулин (VCP-эрибулин) дополнительно исследовали на предмет специфичности и активности на различных линиях клеток рака желудка и рака молочной железы. VCP-эрибулин конъюгировали с MORAb-003 и MORAb-009, в дополнение к антителу к her2 человека трастузумабу. MORAb-003-VCP-эрибулин демонстрировал слабое, но специфическое
10 уничтожение клеток NCI-N87, которые экспрессируют низкие уровни рецептора фолиевой кислоты альфа (FR), и незначительное уничтожение на оставшихся трех FR-негативных клеточных линиях. MORAb-009-VCP-эрибулин также демонстрировал высокую цитотоксичность на клетках NCI-N87, которые экспрессируют умеренные уровни мезотелина. Трастузумаб-VCP-эрибулин был очень сильнодействующим (3-6
15 пМ, ИК₅₀) на клетки NCI-N87 и BT-474, две клеточные линии, которые экспрессируют высокие уровни her2, а также сильнодействующим на клетки рака молочной железы ZR-75, которые лишь умеренно экспрессируют her2. Все ADC MORAb-003, MORAb-009 и трастузумаб VCP-эрибулина продемонстрировали низкую цитотоксичность на клетках NUGC3, которая не экспрессирует FR, мезотелин или her2, соответствующие
20 целевые антигены.

2.3.2 Цитотоксичность ADC на основе сукцинимидов

[00422] Тенденции цитотоксичности ADC на основе сукцинимидов были сходны с ADC на основе малеимида для клеток IGROV1, с ADC со спейсером ПЭГ₈, демонстрирующими
25 низкую цитотоксичность в дополнение к низким значениям DAR. Более низкая цитотоксичность как на клетках IGROV1, так и на NCI-H2110 обычно наблюдалась для ADC на основе сукцинимидов с расщепляемыми ферментом линкерами по сравнению с соответствующими ADC на основе малеимида, что, скорее всего, связано с их более низкими значениями DAR. Нецелевое уничтожение клеток A431 наблюдалось также с
30 линкерами на основе дисульфидила и сульфонамида, аналогичными соответствующим ADC на основе малеимида. Это указывает на повышенную нестабильность, скорее потенциально возникающую из-за сайта расщепления, чем из-за химии конъюгации.

[00423] Когда выполняли двухстадийную конъюгацию, наблюдали более высокие значения DAR относительно тех, которые наблюдались при подходе прямой конъюгации сукцинимидов. Эти более высокие значения DAR коррелировали с более высокой
35 эффективностью. Для ADC MORAb-003 VCP-эрибулина наблюдали высокую цитотоксичность как на клетках IGROV1, так и на NCI-H2110. Несмотря на то, что нерасщепляемые ADC MORAb-003 продемонстрировали эффективность на клетках IGROV1 (1-4 нМ), они все еще были менее эффективными, чем ADC MORAb-003 VCP-эрибулин, приготовленные с помощью этого способа (38 пМ), хотя значения DAR были
40 сопоставимыми. Кроме того, нерасщепляемые ADC MORAb-003, приготовленные с применением двухстадийного способа, были немного менее эффективными на клеточной линии IGROV1, чем соответствующие ADC на основе малеимида, что может быть связано с их более низкими значениями DAR. Подобно их аналогам на основе малеимида, нерасщепляемые ADC, приготовленные с применением двухстадийного способа, также
45 утратили почти всю цитотоксичность на клетках NCI-2110.

2.4 Биофизическая характеристика ADC антитела к мезотелину человека (LCcys80)

[00424] MAL-ПЭГ₂-Val-Cit-PAB-эрибулин (ER-001159569) конъюгировали с восемью

различными антителами к мезотелину человека (таблица 1). Аффинности связывания исходных антител определяли путем анализа BIAcore, как описано выше в разделе 1.

6. 1. Уровни агрегации для всех ADC антител к мезотелину человека определяли с помощью эксклюзионной ВЭЖХ и DAR анализировали с применением HIC-ВЭЖХ.

Активность *in vitro* оценивали, применяя анализ цитотоксичности на клетках на основе окрашивания кристаллическим фиолетовым, на клетках A3 (A431, стабильно

трансфицированная мезотелином человека (MSLN), MSLN^{hi}), OVCAR3 (яичник человека, MSLN^{hi}), HEC-251 (эндометриод человека, MSLN^{med}), H226 (плоскоклеточная

мезотелиома легких человека, MSLN^{lo}) и исходной A431 (MSLN^{neg}). Результаты анализа DAR, агрегации и цитотоксичности приведены в таблице 50.

Таблица 50. Биофизическая характеристика ADC антитела к мезотелину человека (LCcys80)

Исходное mAb				ADC									
Аффинность				Полезная нагрузка	HIC	Эксклюзионная ВЭЖХ		Анализ цитотоксичности на основе клеток, ЭК50, nM					
$k_3 (10^5 \text{ M}^{-1} \text{сек}^{-1})$	$k_4 (10^3 \text{ сек}^{-1})$	$K_D (10^9 \text{ M})$	Лекарственное средство-линкер	DAR	% агрегата	% мономера	A431	OVCAR3	HEC-251	H226	A3		
33011	xi		ER-001159569-000	1.92	8.97	91.03	40.67	0.008	3.950	>100	0.14		
	zu	2.2	0.65	3.4	ER-001159569-000	1.69	1.42	98.58	~100	0.064	26.500	>100	0.28
111B10	xi	6.5	3.9	6.3	ER-001159569-000	1.90	4.25	95.75	38.10	0.004	13.960	~100	0.05
	zu	5.1	3	6.5	ER-001159569-000	1.81	3.64	96.36	68.92	0.014	27.42	>100	0.12
201C15	xi	2.4	0.26	1.1	ER-001159569-000	1.85	1.62	98.38	48.50	0.004	14.82	~100	0.27
	zu	3.1	1.1	4.2	ER-001159569-000	1.80	5.84	94.16	68.88	0.290	20.42	>100	0.41
346C6	xi	3.8	0.49	1.4	ER-001159569-000	1.56	5.28	94.72	34.49	0.087	5.73	~100	0.11
	zu	133	93	8.9	ER-001159569-000	1.63	4.48	95.52	72.86	1.180	32.54	>100	0.55

Сокращения: хі - химерное; zu - гуманизированное.

[00425] Все ADC антитела к мезотелину человека сохраняли низкие уровни агрегации (<10% агрегата) и демонстрировали высокую активность на целевых клеточных линиях. Высокая активность наблюдалась на А3 и OVCAR3, тогда как клетки HEC-251 и H226

были относительно устойчивы к цитотоксичности ADC.

Выбранные последовательности:

SEQ ID NO: 1 (тяжелая цепь (HC) MORAb-003)

1 EVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCSASGFTFS GYGLSWVRQA PGKGLEWVAM
51 ISSGGSYTTY ADSVKGRFAI SRD~~NA~~KNTLF LQMDSLRPED TGVYFCARHG
101 DDPAWFAYWG QGTPVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD
151 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TPAVLQSSG LYSLSVVTVP PSSSLGTQTY
201 ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK
251 DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS
301 TYRVVSVLTV L~~HQD~~WLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV
15 351 YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVLD
401 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KLSLSPGK

SEQ ID NO: 2 (CDR1 HC MORAb-003; по Кабату): GYGLS

SEQ ID NO: 3 (CDR2 HC MORAb-003; по Кабату): MISSGGSYTTYADSVKG

SEQ ID NO: 4 (CDR3 HC MORAb-003; по Кабату): HGDDPAWFAY

20 SEQ ID NO:5 (аминокислотная последовательность полноразмерного белка-предшественника тяжелой цепи MORAb-003; лидерная последовательность подчеркнута)

1 MGWSCILFL VATATGVHSE VQLVESGGGV VQPGRSLRLS CSASGFTFSG
51 YGLSWVRQAP GKGLEWVAMI SSGGSYTYA DSVKGRFAIS RDNAKNTLFL
101 QMDSLRPEDT GYVFCARHGD DPAWFAYWGQ GTPVTVSSAS TKGPSVFPLA
25 151 PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL
201 YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKTHTCPPC
251 PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV
301 DGEVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP
351 APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV
30 401 EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH
451 EALHNHYTQK SLSLSPGK

SEQ ID NO: 6 (легкая цепь (LC) MORAb-003)

1 DIQLTQSPSS LSASVGDRVIT TCSVSSSIS SNNLHWYQQK PGKAPKPWIY
51 GTSNLASGVP SRFSGSGSGT DYFTFTISLQ PEDIATYYCQ QWSSYPYMYT
35 101 FGQGTKVEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVCLLN NFYPREAKVQ
151 WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT
201 HQGLSSPVT KSFNRGEC

SEQ ID NO: 7 (CDR1 LC MORAb-003; по Кабату): SVSSSISNNLH

SEQ ID NO: 8 (CDR2 LC MORAb-003; по Кабату): GTSNLAS

40 SEQ ID NO: 9 (CDR3 LC MORAb-003; по Кабату): QQWSSYPYMYT

SEQ ID NO: 10 аминокислотная последовательность полноразмерного белка-предшественника легкой цепи MORAb-003 (лидерная последовательность подчеркнута)

1 MGWSCILFL VATATGVHSD IQLTQSPSSL SASVGDRVIT TCSVSSSIS
51 NNLHWYQQKPG KAPKPWIYG TSNLASGVPS RFGSGSGGTD YTFTISLQ
45 101 EDIATYYCQQ WSSYPYMYTF GQGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG
151 TASVCLLN NFYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSS
201 LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

SEQ ID NO:11 (HT HC MORAb-003)

1 ATGGGATGGA GCTGTATCAT CCTCTTCTTG GTAGCAACAG CTACAGGTGT
 51 CCACTCCGAG GTCCAACCTGG TGGAGAGCGG TGGAGGTGTT GTGCAACCTG
 101 GCCGGTCCCT GCGCCTGTCC TGCTCCGCAT CTGGCTTCAC CTTCAGCGGC
 151 TATGGGTTGT CTTGGGTGAG ACAGGCACCT GGAAAAGGTC TTGAGTGGGT
 201 TGCAATGATT AGTAGTGGTG GTAGTTATAC CTACTATGCA GACAGTGTGA
 251 AGGGTAGATT TGCAATATCG CGAGACAACG CCAAGAACAC ATTGTTCCCTG
 301 CAAATGGACA GCCTGAGACC CGAAGACACC GGGGTCTATT TTTGTGCAAG
 351 ACATGGGGAC GATCCCGCCT GGTTTCGCTTA TTGGGGGCCAA GGGACCCCGG
 401 TCACCGTCTC CTCAGCCTCC ACCAAGGGCC CATCGGTCTT CCCCCTGGCA
 451 CCCTCCTCCA AGAGCACCTC TGGGGGCACA GCGGCCCTGG GCTGCCTGGT
 501 CAAGGACTAC TTCCCCGAAC CGGTGACGGT GTCGTGGAAC TCAGGCGCCC
 551 TGACCAGCGG CGTGACACACC TTCCCGGCTG TCCTACAGTC CTCAGGACTC
 601 TACTCCCTCA GCAGCGTGGT GACCGTGCCC TCCAGCAGCT TGGGCACCCA
 651 GACCTACATC TGCAACGTGA ATCACAAGCC CAGCAACACC AAGGTGGACA
 701 AGAAAGTTGA GCCCAAATCT TGTGACAAAA CTCACACATG CCCACCGTGC
 751 CCAGCACCTG AACTCCTGGG GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCC AAA
 801 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG
 851 TGGTGGACGT GAGCCACGAA GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG
 901 GACGGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA
 951 CAACAGCACG TACCGTGTGG TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT
 1001 GGCTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA
 1051 GCCCCCATCG AGAAAACCAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC
 1101 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGGA TGAGCTGACC AAGAACCAGG
 1151 TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC AAAGGCTTCT ATCCAGCGA CATCGCCGTG
 1201 GAGTGGGAGA GCAATGGGCA GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC
 1251 CGTGCTGGAC TCCGACGGCT CCTTCTTCTT ATATTCAAAG CTCACCGTGG
 1301 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT
 1351 GAGGCTCTGC ACAACCACTA CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCCGG
 1401 GAAATGA

SEQ ID NO: 12 (HT LC MORAb-003)

1 ATGGGATGGA GCTGTATCAT CCTCTTCTTG GTAGCAACAG CTACAGGTGT
 51 CCACTCCGAC ATCCAGCTGA CCCAGAGCCC AAGCAGCCTG AGCGCCAGCG
 101 TGGGTGACAG AGTGACCATC ACCTGTAGTG TCAGCTCAAG TATAAGTTCC
 151 AACAACCTTG ACTGGTACCA GCAGAAGCCA GGTAAGGCTC CAAAGCCATG
 201 GATCTACGGC ACATCCAACC TGGCTTCTGG TGTGCCAAGC AGATTCAGCG
 251 GTAGCGGTAG CGGTACCGAC TACACCTTCA CCATCAGCAG CCTCCAGCCA
 301 GAGGACATCG CCACCTACTA CTGCCAACAG TGGAGTAGTT ACCCGTACAT
 351 GTACACGTTT GGCCAAGGGA CCAAGGTGGA AATCAAACGA ACTGTGGCTG
 401 CACCATCTGT CTTATCTTTC CCGCCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA
 451 ACTGCCTCTG TTGTGTGCCT GCTGAATAAC TTCTATCCCA GAGAGGCCAA
 501 AGTACAGTGG AAGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCGGGTAAC TCCCAGGAGA
 551 GTGTCACAGA GCAGGACAGC AAGGACAGCA CCTACAGCCT CAGCAGCACC
 601 CTGACGCTGA GCAAAGCAGA CTACGAGAAA CACAAAGTCT ACGCCTGCGA
 651 AGTCACCCAT CAGGGCCTGA GCTCGCCCGT CACAAAGAGC TTCAACAGGG
 701 GAGAGTGTTA A

SEQ ID NO: 13 (CDR1 HC MORAb-003; IMGT): GFTFSGYG

SEQ ID NO: 14 (CDR2 HC MORAb-003; IMGT): ISSGGSYT

SEQ ID NO: 15 (CDR3 HC MORAb-003; IMGT): ARHGDDPAWFAY

SEQ ID NO: 16 (CDR1 LC MORAb-003; IMGT): SSISSNN

SEQ ID NO: 17 (CDR2 LC MORAb-003; IMGT): GTS

SEQ ID NO: 18 (CDR3 LC MORAb-003; IMGT): QQWSSYPYMYT

SEQ ID NO: 19 (FRA человека)

5 1 maqrmttql llvwvavvg eaqtriawar tellnvcma khhkekpgpe dklheqcrpw
61 rknaccstnt sqeahkdvsy lyrfnwnhcg emapackrhf iqdtclyecs pnlgpwiqqv
121 dqswrkervl nvplckedce qwwedcrtsy tcksnwhkgw nwtsgfnkca vgaacqpfhf
181 yfptptvlen eiwthsykvs nysrgsgrci qmwfdpaqgn pneevarfya aamsgagpwa
241 awpfllslal mllwlls

10 SEQ ID NO: 20 (нуклеотид FRA человека)

1 cattccttg tgccactgac cacagctctt tctcaggga cagacatggc tcagcggatg
61 acaacacagc tgctgctcct tctagtgtgg gtggctgtag taggggaggc tcagacaagg
121 attgcatggg ccaggactga gcttctcaat gtctgcatga acgccaagca ccacaaggaa
181 aagccaggcc ccgaggacaa gttgcatgag cagtgtcgac cctggaggaa gaatgcctgc
15 241 tgttctacca acaccagcca ggaagcccat aaggatgttt cctacctata tagattcaac
301 tggaaacct gtggagagat ggcacctgcc tgcaaacggc attcatcca ggacacctgc
361 ctctacgagt gctcccccac cttggggccc tggatccagc aggtggatca gagctggcgc
421 aaagagcggg tactgaacgt gccctgtgc aaagaggact gtgagcaatg gtgggaagat
481 tgctgcacct cctacacctg caagagcaac tggcacaagg gctggaactg gacttcaggg
20 541 ttaacaagt gcgcagtggg agctgcctgc caaccttcc atttctactt cccacaccc
601 actgttctgt gcaatgaaat ctgactcac tctacaagg tcagcaacta cagccgaggg
661 agtggccgct gcatccagat gtggttcgac ccagcccagg gcaaccccaa tgaggaggtg
721 gcgaggttct atgtcgcagc catgagtggg gctgggccct gggcagcctg gcctttcctg
781 cttagcctgg ccctaagtct gctgtggctg ctcagctgac ctcttttac cttctgatac
25 841 ctggaaatcc ctgccctgtt cagccccaca gctcccaact atttggttcc tgctccatgg
901 tggggcctct gacagccact ttgaataaac cagacaccgc acatgtgtct tgagaattat
961 ttgaaaaaaa aaaaaaaaaa aa

SEQ ID NO: 21 (her2 человека)

1 melaalcrwg llallppga astqvctgtd mklrlpaspe thldmlrhly qgcqvvgnl
30 61 eltylptnas lsflqdiqev qgyvliahnq vrqvpqlrlr ivrgtqlfed nyalavldng
121 dplnnttpvt gaspgglrel qlrslteilk ggvlqrnpq lcyqdtlwk difhknqqla
181 ltlidtnrsr achpcspmck gsrgwesse dcqsltrtv aggcarckgp lptdccheqc
241 aagctgpkhs dclaclhfnh sgicelhcpa lvyntdtfe smpnpegryt fgascvtacp
301 ynylstdivs ctlvclphnq evtaedgtqr cekcskpcar vcylgmehl revravtsan
35 361 iqefageckki fgslafpes fdgdpasnta plqpeqlqv etleeitgyl yisawpdsip
421 dlsvfqnlqv irgrilhnga ysltlqglgi swglrlsre lgsglalihh nthlcfvhtv
481 pwdqlfrnph qallhtanrp edecvgegla chqlcarghc wpgpqtqcvn csqflrgqec
541 veecrvlqgl preyvnrhc lpchpecqpq ngsvtcfge adqvacahy kdppfcvarc
601 psgvkdpsly mpiwkfpdee gacqpcpinc thscvldddk gcpaeqrasp ltsiisavvg
40 661 illvvlgvv fgilikrrqq kirkytmrrl lqetelvepl tpsgampnqa qmrilketel
721 rkvkvlgsa fgtvykigiwi pdgenkipv aikvlrents pkankeilde ayvmagvgsp
781 yvsrligiel tstvqlvtql mpygcldhv renrglgsq dllnwcmlia kgmsyledvr
841 lvhrdlaarn vlvkspnhvk itdfglarl dideteyhad ggkvpikwma lesilrrft
901 hqsdvwsygv tvwelmtfga kpydgipare ipdllekger lpqppictid vymimvkcwm
45 961 idsecrprfr elvsefsrma rdpqrfvviq nedlgpaspl dstfyrslle dddmgdlvda
1021 eeylvppqgf fcpdpapgag gmvhhrhrss strsgggdlt lglepseea prsplapseg
1081 agsdvfdgdl gmgaaqlqs lpthdpslq rysedptvpl psetdgyvap ltcspqpeyv
1141 nqpdvrrppp spreglpaa rpagatlerp ktlspgkngv vkdvfafgga venpeyltpq

1201 ggaapqphpp pafspafndl yywdqdppeer gappstfkgt ptaenpeylg ldvpv

SEQ ID NO: 22 (нуклеотид her2 человека)

1 ATGGAGCTGG CGGCCTTGTG CCGCTGGGGG CTCCTCCTCG CCCTCTTGCC
CCCCGGAGCC

5 61 GCGAGCACCC AAGTGTGCAC CGGCACAGAC ATGAAGCTGC GGCTCCCTGC
CAGTCCCGAG

121 ACCCACCTGG ACATGCTCCG CCACCTCTAC CAGGGCTGCC AGGTGGTGCA
GGGAAACCTG

10 181 GAACTCACCT ACCTGCCCCAC CAATGCCAGC CTGTCCTTCC TGCAGGATAT
CCAGGAGGTG

241 CAGGGCTACG TGCTCATCGC TCACAACCAA GTGAGGCAGG TCCCACTGCA
GAGGCTGCGG

301 ATTGTGCGAG GCACCCAGCT CTTTGAGGAC AACTATGCCC TGGCCGTGCT
AGACAATGGA

15 361 GACCCGCTGA ACAATACCAC CCCTGTCACA GGGGCCTCCC CAGGAGGCCT
GCGGGAGCTG

421 CAGCTTCGAA GCCTCACAGA GATCTTGAAA GGAGGGGTCT TGATCCAGCG
GAACCCCCAG

20 481 CTCTGCTACC AGGACACGAT TTTGTGGAAG GACATCTTCC ACAAGAACAA
CCAGCTGGCT

541 CTCACACTGA TAGACACCAA CCGCTCTCGG GCCTGCCACC CCTGTTCTCC
GATGTGTAAG

601 GGCTCCCGCT GCTGGGGAGA GAGTTCTGAG GATTGTCAGA GCCTGACGCG
CACTGTCTGT

25 661 GCCGGTGGCT GTGCCCCGCTG CAAGGGGCCA CTGCCCACTG ACTGCTGCCA
TGAGCAGTGT

721 GCTGCCGGCT GCACGGGCCC CAAGCACTCT GACTGCCTGG CCTGCCTCCA
CTTCAACCAC

30 781 AGTGGCATCT GTGAGCTGCA CTGCCCAGCC CTGGTCACCT ACAACACAGA
CACGTTTGAG

841 TCCATGCCCA ATCCCGAGGG CCGGTATACA TTCGGCGCCA GCTGTGTGAC
TGCCTGTCCC

901 TACAACTACC TTTCTACGGA CGTGGGATCC TGCACCCTCG TCTGCCCCCT
GCACAACCAA

35 961 GAGGTGACAG CAGAGGATGG AACACAGCGG TGTGAGAAGT GCAGCAAGCC
CTGTGCCCCA

1021 GTGTGCTATG GTCTGGGCAT GGAGCACTTG CGAGAGGTGA GGGCAGTTAC
CAGTGCCAAT

40 1081 ATCCAGGAGT TTGCTGGCTG CAAGAAGATC TTTGGGAGCC TGGCATTTCT
GCCGGAGAGC

1141 TTTGATGGGG ACCCAGCCTC CAACACTGCC CCGCTCCAGC CAGAGCAGCT
CCAAGTGTTT

1201 GAGACTCTGG AAGAGATCAC AGGTTACCTA TACATCTCAG CATGGCCGGA
CAGCCTGCCT

45 1261 GACCTCAGCG TCTTCCAGAA CCTGCAAGTA ATCCGGGGAC GAATTCTGCA
CAATGGCGCC

1321 TACTCGCTGA CCCTGCAAGG GCTGGGCATC AGCTGGCTGG GGCTGCGCTC
ACTGAGGGAA

1381 CTGGGCAGTG GACTGGCCCT CATCCACCAT AACACCCACC TCTGCTTCGT
GCACACGGTG

1441 CCCTGGGACC AGCTCTTTCG GAACCCGCAC CAAGCTCTGC TCCACACTGC
CAACCGGCCA

5 1501 GAGGACGAGT GTGTGGGCGA GGGCCTGGCC TGCCACCAGC TGTGCGCCCG
AGGGCACTGC

1561 TGGGGTCCAG GGCCACCCA GTGTGTCAAC TGCAGCCAGT TCCTTCGGGG
CCAGGAGTGC

1621 GTGGAGGAAT GCCGAGTACT GCAGGGGCTC CCCAGGGAGT ATGTGAATGC
10 CAGGCACTGT

1681 TTGCCGTGCC ACCCTGAGTG TCAGCCCCAG AATGGCTCAG TGACCTGTTT
TGGACCGGAG

1741 GCTGACCACT GTGTGGCCTG TGCCCACTAT AAGGACCCTC CCTTCTGCGT
GGCCCGCTGC

15 1801 CCCAGCGGTG TGAAACCTGA CCTCTCCTAC ATGCCCATCT GGAAGTTTCC
AGATGAGGAG

1861 GGCGCATGCC AGCCTTGCCC CATCAACTGC ACCCACTCCT GTGTGGACCT
GGATGACAAG

1921 GGCTGCCCCG CCGAGCAGAG AGCCAGCCCT CTGACGTCCA TCATCTCTGC
20 GGTGGTTGGC

1981 ATTCTGCTGG TCGTGGTCTT GGGGGTGGTC TTTGGGATCC TCATCAAGCG
ACGGCAGCAG

2041 AAGATCCGGA AGTACACGAT GCGGAGACTG CTGCAGGAAA CGGAGCTGGT
GGAGCCGCTG

25 2101 ACACCTAGCG GAGCGATGCC CAACCAGGCG CAGATGCGGA TCCTGAAAGA
GACGGAGCTG

2161 AGGAAGGTGA AGGTGCTTGG ATCTGGCGCT TTTGGCACAG TCTACAAGGG
CATCTGGATC

2221 CCTGATGGGG AGAATGTGAA AATTCCAGTG GCCATCAAAG TGTTGAGGGA
30 AAACACATCC

2281 CCCAAAGCCA ACAAAGAAAT CTTAGACGAA GCATACGTGA TGGCTGGTGT
GGGCTCCCCA

2341 TATGTCTCCC GCCTTCTGGG CATCTGCCTG ACATCCACGG TGCAGCTGGT
GACACAGCTT

35 2401 ATGCCCTATG GCTGCCTCTT AGACCATGTC CGGGAAAACC GCGGACGCCT
GGGCTCCCAG

2461 GACCTGCTGA ACTGGTGTAT GCAGATTGCC AAGGGGATGA GCTACCTGGA
GGATGTGCGG

2521 CTCGTACACA GGGACTTGGC CGCTCGGAAC GTGCTGGTCA AGAGTCCCAA
40 CCATGTCAAA

2581 ATTACAGACT TCGGGCTGGC TCGGCTGCTG GACATTGACG AGACAGAGTA
CCATGCAGAT

2641 GGGGGCAAGG TGCCCATCAA GTGGATGGCG CTGGAGTCCA TTCTCCGCCG
GCGGTTTACC

45 2701 CACCAGAGTG ATGTGTGGAG TTATGGTGTG ACTGTGTGGG AGCTGATGAC
TTTTGGGGCC

2761 AAACCTTACG ATGGGATCCC AGCCCGGGAG ATCCCTGACC TGCTGGAAAA
GGGGGAGCGG

2821 CTGCCCCAGC CCCCCATCTG CACCATTGAT GTCTACATGA TCATGGTCAA
ATGTTGGATG

2881 ATTGACTCTG AATGTCGGCC AAGATTCCGG GAGTTGGTGT CTGAATTCTC
CCGCATGGCC

5 2941 AGGGACCCCC AGCGCTTTGT GGTCATCCAG AATGAGGACT TGGGCCCAGC
CAGTCCCTTG

3001 GACAGCACCT TCTACCGCTC ACTGCTGGAG GACGATGACA TGGGGGACCT
GGTGGATGCT

3061 GAGGAGTATC TGGTACCCCA GCAGGGCTTC TTCTGTCCAG ACCCTGCCCC
10 GGGCGCTGGG

3121 GGCATGGTCC ACCACAGGCA CCGCAGCTCA TCTACCAGGA GTGGCGGTGG
GGACCTGACA

3181 CTAGGGCTGG AGCCCTCTGA AGAGGAGGCC CCCAGGTCTC CACTGGCACC
CTCCGAAGGG

15 3241 GCTGGCTCCG ATGTATTTGA TGGTGACCTG GGAATGGGGG CAGCCAAGGG
GCTGCAAAGC

3301 CTCCCCACAC ATGACCCCAG CCCTCTACAG CGGTACAGTG AGGACCCCAC
AGTACCCCTG

3361 CCCTCTGAGA CTGATGGCTA CGTTGCCCCC CTGACCTGCA GCCCCAGCC
20 TGAATATGTG

3421 AACCAGCCAG ATGTTCGGCC CCAGCCCCCT TCGCCCCGAG AGGGCCCTCT
GCCTGCTGCC

3481 CGACCTGCTG GTGCCACTCT GGAAAGGCCC AAGACTCTCT CCCCAGGGAA
GAATGGGGTC

25 3541 GTCAAAGACG TTTTTCCTT TGGGGGTGCC GTGGAGAACC CCGAGTACTT
GACACCCAG

3601 GGAGGAGCTG CCCCTCAGCC CCACCCTCCT CCTGCCTTCA GCCCAGCCTT
CGACAACCTC

3661 TATTACTGGG ACCAGGACCC ACCAGAGCGG GGGGCTCCAC CCAGCACCTT
30 CAAAGGGACA

3721 CCTACGGCAG AGAACCCAGA GTACCTGGGT CTGGACGTGC CAGTGTGA

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> EISAI CO., LTD.

EISAI INC.

35 MORPHOTEK, INC.

<120> КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО НА ОСНОВЕ ЭРИБУЛИНА
И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

<130> 08061.0024-00304

<140> PCT/США2017/020529

40 <141> 2017-03-02

<150> 62/302,562

<151> 2016-03-02

<160> 368

<170> PatentIn версия 3,5

45 <210> 1

<211> 449

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

5 <400> 1

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

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

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

Ala Met Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

15 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

20 Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

25 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

30 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

35 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

40 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320

45 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr

	340		345		350
	Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu	Leu Thr Lys Asn Gln Val	Ser Leu Thr		
	355	360	365		
	Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr	Pro Ser Asp Ile Ala Val	Glu Trp Glu		
5	370	375	380		
	Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr	Pro Pro Val Leu			
	385	390	395	400	
	Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr	Val Asp Lys			
	405	410	415		
10	Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser	Val Met His Glu			
	420	425	430		
	Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser	Leu Ser Pro Gly			
	435	440	445		
	Lys				
15	<210> 2				
	<211> 5				
	<212> ПРТ				
	<213> Искусственная последовательность				
	<220>				
20	<221> источник				
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"				
	<400> 2				
	Gly Tyr Gly Leu Ser				
25	1	5			
	<210> 3				
	<211> 17				
	<212> ПРТ				
	<213> Искусственная последовательность				
30	<220>				
	<221> источник				
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"				
	<400> 3				
35	Met Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys				
	1	5	10	15	
	Gly				
	<210> 4				
	<211> 10				
40	<212> ПРТ				
	<213> Искусственная последовательность				
	<220>				
	<221> источник				
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"				
45	<400> 4				
	His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr				
	1	5	10		

<210> 5

<211> 468

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

5 <220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 5

10 Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 20 25 30
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 15 35 40 45
 Ser Gly Tyr Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Val Ala Met Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala
 65 70 75 80
 20 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 85 90 95
 Thr Leu Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp
 25 115 120 125
 Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 130 135 140
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 145 150 155 160
 30 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 165 170 175
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 180 185 190
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 35 195 200 205
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 210 215 220
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser
 225 230 235 240
 40 Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 245 250 255
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 260 265 270
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 45 275 280 285
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 290 295 300
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr

RU 2754369 C2

	305		310		315		320
	Tyr Arg Val Val	Ser Val Leu Thr Val	Leu His Gln Asp Trp Leu Asn				
		325		330		335	
	Gly Lys Glu Tyr	Lys Cys Lys Val	Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro				
5		340		345		350	
	Ile Glu Lys Thr	Ile Ser Lys Ala	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln				
		355		360		365	
	Val Tyr Thr Leu	Pro Pro Ser Arg	Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val				
		370		375		380	
10	Ser Leu Thr Cys	Leu Val Lys Gly	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val				
		385		390		395	
	Glu Trp Glu Ser	Asn Gly Gln Pro	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro				
		405		410		415	
	Pro Val Leu Asp	Ser Asp Gly Ser	Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr				
15		420		425		430	
	Val Asp Lys Ser	Arg Trp Gln Gln	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val				
		435		440		445	
	Met His Glu Ala	Leu His Asn His	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu				
		450		455		460	
20	Ser Pro Gly Lys						
	465						
	<210> 6						
	<211> 217						
	<212> ПРТ						
25	<213> Искусственная последовательность						
	<220>						
	<221> источник						
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"						
30	<400> 6						
	Asp Ile Gln Leu	Thr Gln Ser Pro	Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly				
	1	5	10	15			
	Asp Arg Val Thr	Ile Thr Cys Ser	Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn				
		20	25	30			
35	Asn Leu His Trp	Tyr Gln Gln Lys	Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp				
		35	40	45			
	Ile Tyr Gly Thr	Ser Asn Leu Ala	Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser				
		50	55	60			
	Gly Ser Gly Ser	Gly Thr Asp Tyr	Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln				
40		65	70	75		80	
	Pro Glu Asp Ile	Ala Thr Tyr Tyr	Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro				
		85	90	95			
	Tyr Met Tyr Thr	Phe Gly Gln Gly	Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr				
		100	105	110			
45	Val Ala Ala Pro	Ser Val Phe Ile	Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu				
		115	120	125			
	Lys Ser Gly Thr	Ala Ser Val Val	Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro				
		130	135	140			

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145 150 155 160
Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
165 170 175
5 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
180 185 190
Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
195 200 205
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
10 210 215
<210> 7
<211> 12
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность
15 <220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
пептид"
<400> 7
20 Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn Asn Leu His
1 5 10
<210> 8
<211> 7
<212> ПРТ
25 <213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
пептид"
30 <400> 8
Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5
<210> 9
<211> 11
35 <212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
40 пептид"
<400> 9
Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Tyr Met Tyr Thr
1 5 10
<210> 10
45 <211> 236
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность
<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 10

```

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

```

35 <210> 11

<211> 1407

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

40 <221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 11

```

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactccgag      60
45 gtccaactgg tggagagcgg tggaggtgtt gtgcaacctg gccggtcctt gcgcctgtcc      120
tgctccgcat ctggcttcac cttcagcggc tatgggttgt cttgggtgag acaggcacct      180
ggaaaagggtc ttgagtgggt tgcaatgatt agtagtggtg gtagttatac ctactatgca      240
gacagtgtga agggtagatt tgcaatatcg cgagacaacg ccaagaacac attgttctctg      300

```


	caa atggaca gcctgagacc cgaagacacc ggggtctatt tttgtgcaag acatggggac	360
	gatcccgccct ggttcgctta ttggggccaa gggaccccg taccgtctc ctgagcctcc	420
	accaagggcc catcggtctt ccccttgga ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca	480
	gcggccctgg gctgcctgg caaggactac ttccccgaac cggtgacggg gtcgtggaac	540
5	tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctgaggactc	600
	tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc	660
	tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct	720
	tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	780
	gtcttctctt tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctcccgga ccctgaggtc	840
10	acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	900
	gacggcggtg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	960
	taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	1020
	aagtgcgaag tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc	1080
	aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc	1140
15	aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg	1200
	gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	1260
	tccgacgggt ccttcttctt atattcaaa ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	1320
	gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cagcagaag	1380
	agcctctccc tgtctcccg gaaatga	1407
20	<210> 12	
	<211> 711	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
25	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"	
	<400> 12	
	atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacagggtg ccactccgac	60
30	atccagctga cccagagccc aagcagcctg agcgccagcg tgggtgacag agtgaccatc	120
	acctgtagtg tcagctcaag tataagttcc aacaacttgc actggtacca gcagaagcca	180
	ggtaaggctc caaagccatg gatctacggc acatccaacc tggcttctgg tgtgccaagc	240
	agattcagcg gtagcggtag cggtagccgac tacaccttca ccatcagcag cctccagcca	300
	gaggacatcg ccacctacta ctgccaacag tggagtagtt acccgtagat gtacacgttc	360
35	ggccaaggga ccaagggtgga aatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc	420
	ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac	480
	ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac	540
	tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc	600
	ctgacgtgga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat	660
40	cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg gagagtgtta a	711
	<210> 13	
	<211> 8	
	<212> ПРТ	
	<213> Искусственная последовательность	
45	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"	

<400> 13
 Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly
 1 5
 <210> 14
 5 <211> 8
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 10 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 14
 Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr
 1 5
 15 <210> 15
 <211> 12
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 20 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 15
 Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr
 25 1 5 10
 <210> 16
 <211> 7
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 30 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 16
 35 Ser Ser Ile Ser Ser Asn Asn
 1 5
 <210> 17
 <211> 3
 <212> ПРТ
 40 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 45 <400> 17
 Gly Thr Ser
 1
 <210> 18

<211> 11
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 18
 Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Tyr Met Tyr Thr
 10 1 5 10
 <210> 19
 <211> 257
 <212> ПРТ
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 19
 Met Ala Gln Arg Met Thr Thr Gln Leu Leu Leu Leu Leu Val Trp Val
 1 5 10 15
 Ala Val Val Gly Glu Ala Gln Thr Arg Ile Ala Trp Ala Arg Thr Glu
 20 20 25 30
 Leu Leu Asn Val Cys Met Asn Ala Lys His His Lys Glu Lys Pro Gly
 35 40 45
 Pro Glu Asp Lys Leu His Glu Gln Cys Arg Pro Trp Arg Lys Asn Ala
 50 55 60
 Cys Cys Ser Thr Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr
 25 65 70 75 80
 Leu Tyr Arg Phe Asn Trp Asn His Cys Gly Glu Met Ala Pro Ala Cys
 85 90 95
 Lys Arg His Phe Ile Gln Asp Thr Cys Leu Tyr Glu Cys Ser Pro Asn
 100 105 110
 30 Leu Gly Pro Trp Ile Gln Gln Val Asp Gln Ser Trp Arg Lys Glu Arg
 115 120 125
 Val Leu Asn Val Pro Leu Cys Lys Glu Asp Cys Glu Gln Trp Trp Glu
 130 135 140
 Asp Cys Arg Thr Ser Tyr Thr Cys Lys Ser Asn Trp His Lys Gly Trp
 35 145 150 155 160
 Asn Trp Thr Ser Gly Phe Asn Lys Cys Ala Val Gly Ala Ala Cys Gln
 165 170 175
 Pro Phe His Phe Tyr Phe Pro Thr Pro Thr Val Leu Cys Asn Glu Ile
 180 185 190
 40 Trp Thr His Ser Tyr Lys Val Ser Asn Tyr Ser Arg Gly Ser Gly Arg
 195 200 205
 Cys Ile Gln Met Trp Phe Asp Pro Ala Gln Gly Asn Pro Asn Glu Glu
 210 215 220
 Val Ala Arg Phe Tyr Ala Ala Ala Met Ser Gly Ala Gly Pro Trp Ala
 45 225 230 235 240
 Ala Trp Pro Phe Leu Leu Ser Leu Ala Leu Met Leu Leu Trp Leu Leu
 245 250 255
 Ser

<210> 20
 <211> 982
 <212> ДНК
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 20
 cattccttgg tgccactgac cacagctctt tcttcagggg cagacatggc tcagcgggatg 60
 acaacacagc tgctgctcct tctagtgtgg gtggctgtag taggggaggc tcagacaagg 120
 attgcatggg ccaggactga gcttctcaat gtctgcatga acgccaagca ccacaaggaa 180
 aagccaggcc ccgaggacaa gttgcatgag cagtgtcgac cctggaggaa gaatgcctgc 240
 10 tgttctacca acaccagcca ggaagcccat aaggatgttt cctacctata tagattcaac 300
 tggaaccact gtggagagat ggcacctgcc tgcaaacggc atttcatcca ggacacctgc 360
 ctctacgagt gctcccccaa cttggggccc tggatccagc aggtggatca gagctggcgc 420
 aaagagcggg tactgaacgt gcccctgtgc aaagaggact gtgagcaatg gtgggaagat 480
 tgtcgcacct cctacacctg caagagcaac tggcacaagg gctggaactg gacttcaggg 540
 15 tttaacaagt gcgcagtggg agctgcctgc caacctttcc atttctactt cccacacccc 600
 actgttctgt gcaatgaaat ctggactcac tcctacaagg tcagcaacta cagccgaggg 660
 agtggccgct gcatccagat gtggttcgac ccagcccagg gcaaccccaa tgaggaggtg 720
 gcgaggttct atgctgcagc catgagtggg gctgggcccct gggcagcctg gcctttcctg 780
 cttagcctgg ccctaattgct gctgtggctg ctcagctgac ctccttttac cttctgatac 840
 20 ctggaaatcc ctgccctgtt cagccccaca gctcccaact atttggttcc tgctccatgg 900
 tcgggcctct gacagccact ttgaataaac cagacaccgc acatgtgtct tgagaattat 960
 ttggaaaaaa aaaaaaaaaa aa 982
 <210> 21
 <211> 1255
 25 <212> ППТ
 <213> Homo sapiens
 <400> 21
 Met Glu Leu Ala Ala Leu Cys Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu
 1 5 10 15
 30 Pro Pro Gly Ala Ala Ser Thr Gln Val Cys Thr Gly Thr Asp Met Lys
 20 25 30
 Leu Arg Leu Pro Ala Ser Pro Glu Thr His Leu Asp Met Leu Arg His
 35 40 45
 Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val Gln Gly Asn Leu Glu Leu Thr Tyr
 50 55 60
 35 Leu Pro Thr Asn Ala Ser Leu Ser Phe Leu Gln Asp Ile Gln Glu Val
 65 70 75 80
 Gln Gly Tyr Val Leu Ile Ala His Asn Gln Val Arg Gln Val Pro Leu
 85 90 95
 40 Gln Arg Leu Arg Ile Val Arg Gly Thr Gln Leu Phe Glu Asp Asn Tyr
 100 105 110
 Ala Leu Ala Val Leu Asp Asn Gly Asp Pro Leu Asn Asn Thr Thr Pro
 115 120 125
 Val Thr Gly Ala Ser Pro Gly Gly Leu Arg Glu Leu Gln Leu Arg Ser
 130 135 140
 45 Leu Thr Glu Ile Leu Lys Gly Gly Val Leu Ile Gln Arg Asn Pro Gln
 145 150 155 160
 Leu Cys Tyr Gln Asp Thr Ile Leu Trp Lys Asp Ile Phe His Lys Asn

RU 2754369 C2

				165					170					175			
	Asn	Gln	Leu	Ala	Leu	Thr	Leu	Ile	Asp	Thr	Asn	Arg	Ser	Arg	Ala	Cys	
				180					185					190			
5	His	Pro	Cys	Ser	Pro	Met	Cys	Lys	Gly	Ser	Arg	Cys	Trp	Gly	Glu	Ser	
			195					200					205				
	Ser	Glu	Asp	Cys	Gln	Ser	Leu	Thr	Arg	Thr	Val	Cys	Ala	Gly	Gly	Cys	
			210				215					220					
	Ala	Arg	Cys	Lys	Gly	Pro	Leu	Pro	Thr	Asp	Cys	Cys	His	Glu	Gln	Cys	
	225					230				235						240	
10	Ala	Ala	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Lys	His	Ser	Asp	Cys	Leu	Ala	Cys	Leu	
				245					250				255				
	His	Phe	Asn	His	Ser	Gly	Ile	Cys	Glu	Leu	His	Cys	Pro	Ala	Leu	Val	
			260						265				270				
15	Thr	Tyr	Asn	Thr	Asp	Thr	Phe	Glu	Ser	Met	Pro	Asn	Pro	Glu	Gly	Arg	
			275					280				285					
	Tyr	Thr	Phe	Gly	Ala	Ser	Cys	Val	Thr	Ala	Cys	Pro	Tyr	Asn	Tyr	Leu	
			290				295					300					
	Ser	Thr	Asp	Val	Gly	Ser	Cys	Thr	Leu	Val	Cys	Pro	Leu	His	Asn	Gln	
	305					310					315				320		
20	Glu	Val	Thr	Ala	Glu	Asp	Gly	Thr	Gln	Arg	Cys	Glu	Lys	Cys	Ser	Lys	
				325					330					335			
	Pro	Cys	Ala	Arg	Val	Cys	Tyr	Gly	Leu	Gly	Met	Glu	His	Leu	Arg	Glu	
			340						345				350				
25	Val	Arg	Ala	Val	Thr	Ser	Ala	Asn	Ile	Gln	Glu	Phe	Ala	Gly	Cys	Lys	
			355					360				365					
	Lys	Ile	Phe	Gly	Ser	Leu	Ala	Phe	Leu	Pro	Glu	Ser	Phe	Asp	Gly	Asp	
			370				375					380					
	Pro	Ala	Ser	Asn	Thr	Ala	Pro	Leu	Gln	Pro	Glu	Gln	Leu	Gln	Val	Phe	
	385				390					395					400		
30	Glu	Thr	Leu	Glu	Glu	Ile	Thr	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Ile	Ser	Ala	Trp	Pro	
				405					410					415			
	Asp	Ser	Leu	Pro	Asp	Leu	Ser	Val	Phe	Gln	Asn	Leu	Gln	Val	Ile	Arg	
			420						425				430				
35	Gly	Arg	Ile	Leu	His	Asn	Gly	Ala	Tyr	Ser	Leu	Thr	Leu	Gln	Gly	Leu	
			435					440				445					
	Gly	Ile	Ser	Trp	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Glu	Leu	Gly	Ser	Gly	
			450				455				460						
	Leu	Ala	Leu	Ile	His	His	Asn	Thr	His	Leu	Cys	Phe	Val	His	Thr	Val	
	465				470					475					480		
40	Pro	Trp	Asp	Gln	Leu	Phe	Arg	Asn	Pro	His	Gln	Ala	Leu	Leu	His	Thr	
				485					490				495				
	Ala	Asn	Arg	Pro	Glu	Asp	Glu	Cys	Val	Gly	Glu	Gly	Leu	Ala	Cys	His	
			500					505				510					
45	Gln	Leu	Cys	Ala	Arg	Gly	His	Cys	Trp	Gly	Pro	Gly	Pro	Thr	Gln	Cys	
			515					520				525					
	Val	Asn	Cys	Ser	Gln	Phe	Leu	Arg	Gly	Gln	Glu	Cys	Val	Glu	Glu	Cys	
			530				535				540						
	Arg	Val	Leu	Gln	Gly	Leu	Pro	Arg	Glu	Tyr	Val	Asn	Ala	Arg	His	Cys	

RU 2754369 C2

	545		550		555		560									
	Leu	Pro	Cys	His	Pro	Glu	Cys	Gln	Pro	Gln	Asn	Gly	Ser	Val	Thr	Cys
					565					570						575
	Phe	Gly	Pro	Glu	Ala	Asp	Gln	Cys	Val	Ala	Cys	Ala	His	Tyr	Lys	Asp
5					580					585						590
	Pro	Pro	Phe	Cys	Val	Ala	Arg	Cys	Pro	Ser	Gly	Val	Lys	Pro	Asp	Leu
					595					600						605
	Ser	Tyr	Met	Pro	Ile	Trp	Lys	Phe	Pro	Asp	Glu	Glu	Gly	Ala	Cys	Gln
					610					615						620
10	Pro	Cys	Pro	Ile	Asn	Cys	Thr	His	Ser	Cys	Val	Asp	Leu	Asp	Asp	Lys
					625					630						640
	Gly	Cys	Pro	Ala	Glu	Gln	Arg	Ala	Ser	Pro	Leu	Thr	Ser	Ile	Ile	Ser
					645					650						655
	Ala	Val	Val	Gly	Ile	Leu	Leu	Val	Val	Val	Leu	Gly	Val	Val	Phe	Gly
15					660					665						670
	Ile	Leu	Ile	Lys	Arg	Arg	Gln	Gln	Lys	Ile	Arg	Lys	Tyr	Thr	Met	Arg
					675					680						685
	Arg	Leu	Leu	Gln	Glu	Thr	Glu	Leu	Val	Glu	Pro	Leu	Thr	Pro	Ser	Gly
					690					695						700
20	Ala	Met	Pro	Asn	Gln	Ala	Gln	Met	Arg	Ile	Leu	Lys	Glu	Thr	Glu	Leu
					705					710						720
	Arg	Lys	Val	Lys	Val	Leu	Gly	Ser	Gly	Ala	Phe	Gly	Thr	Val	Tyr	Lys
					725					730						735
	Gly	Ile	Trp	Ile	Pro	Asp	Gly	Glu	Asn	Val	Lys	Ile	Pro	Val	Ala	Ile
25					740					745						750
	Lys	Val	Leu	Arg	Glu	Asn	Thr	Ser	Pro	Lys	Ala	Asn	Lys	Glu	Ile	Leu
					755					760						765
	Asp	Glu	Ala	Tyr	Val	Met	Ala	Gly	Val	Gly	Ser	Pro	Tyr	Val	Ser	Arg
					770					775						780
30	Leu	Leu	Gly	Ile	Cys	Leu	Thr	Ser	Thr	Val	Gln	Leu	Val	Thr	Gln	Leu
					785					790						800
	Met	Pro	Tyr	Gly	Cys	Leu	Leu	Asp	His	Val	Arg	Glu	Asn	Arg	Gly	Arg
					805					810						815
	Leu	Gly	Ser	Gln	Asp	Leu	Leu	Asn	Trp	Cys	Met	Gln	Ile	Ala	Lys	Gly
35					820					825						830
	Met	Ser	Tyr	Leu	Glu	Asp	Val	Arg	Leu	Val	His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala
					835					840						845
	Arg	Asn	Val	Leu	Val	Lys	Ser	Pro	Asn	His	Val	Lys	Ile	Thr	Asp	Phe
					850					855						860
40	Gly	Leu	Ala	Arg	Leu	Leu	Asp	Ile	Asp	Glu	Thr	Glu	Tyr	His	Ala	Asp
					865					870						880
	Gly	Gly	Lys	Val	Pro	Ile	Lys	Trp	Met	Ala	Leu	Glu	Ser	Ile	Leu	Arg
					885					890						895
	Arg	Arg	Phe	Thr	His	Gln	Ser	Asp	Val	Trp	Ser	Tyr	Gly	Val	Thr	Val
45					900					905						910
	Trp	Glu	Leu	Met	Thr	Phe	Gly	Ala	Lys	Pro	Tyr	Asp	Gly	Ile	Pro	Ala
					915					920						925
	Arg	Glu	Ile	Pro	Asp	Leu	Leu	Glu	Lys	Gly	Glu	Arg	Leu	Pro	Gln	Pro

RU 2754369 C2

	930		935		940											
	Pro	Ile	Cys	Thr	Ile	Asp	Val	Tyr	Met	Ile	Met	Val	Lys	Cys	Trp	Met
	945				950				955						960	
	Ile	Asp	Ser	Glu	Cys	Arg	Pro	Arg	Phe	Arg	Glu	Leu	Val	Ser	Glu	Phe
5				965					970						975	
	Ser	Arg	Met	Ala	Arg	Asp	Pro	Gln	Arg	Phe	Val	Val	Ile	Gln	Asn	Glu
				980					985						990	
	Asp	Leu	Gly	Pro	Ala	Ser	Pro	Leu	Asp	Ser	Thr	Phe	Tyr	Arg	Ser	Leu
			995					1000							1005	
10	Leu	Glu	Asp	Asp	Asp	Met	Gly	Asp	Leu	Val	Asp	Ala	Glu	Glu	Tyr	
	1010						1015					1020				
	Leu	Val	Pro	Gln	Gln	Gly	Phe	Phe	Cys	Pro	Asp	Pro	Ala	Pro	Gly	
	1025						1030					1035				
	Ala	Gly	Gly	Met	Val	His	His	Arg	His	Arg	Ser	Ser	Ser	Thr	Arg	
15	1040						1045					1050				
	Ser	Gly	Gly	Gly	Asp	Leu	Thr	Leu	Gly	Leu	Glu	Pro	Ser	Glu	Glu	
	1055						1060					1065				
	Glu	Ala	Pro	Arg	Ser	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Glu	Gly	Ala	Gly	Ser	
	1070						1075					1080				
20	Asp	Val	Phe	Asp	Gly	Asp	Leu	Gly	Met	Gly	Ala	Ala	Lys	Gly	Leu	
	1085						1090					1095				
	Gln	Ser	Leu	Pro	Thr	His	Asp	Pro	Ser	Pro	Leu	Gln	Arg	Tyr	Ser	
	1100						1105					1110				
	Glu	Asp	Pro	Thr	Val	Pro	Leu	Pro	Ser	Glu	Thr	Asp	Gly	Tyr	Val	
25	1115						1120					1125				
	Ala	Pro	Leu	Thr	Cys	Ser	Pro	Gln	Pro	Glu	Tyr	Val	Asn	Gln	Pro	
	1130						1135					1140				
	Asp	Val	Arg	Pro	Gln	Pro	Pro	Ser	Pro	Arg	Glu	Gly	Pro	Leu	Pro	
	1145						1150					1155				
30	Ala	Ala	Arg	Pro	Ala	Gly	Ala	Thr	Leu	Glu	Arg	Pro	Lys	Thr	Leu	
	1160						1165					1170				
	Ser	Pro	Gly	Lys	Asn	Gly	Val	Val	Lys	Asp	Val	Phe	Ala	Phe	Gly	
	1175						1180					1185				
	Gly	Ala	Val	Glu	Asn	Pro	Glu	Tyr	Leu	Thr	Pro	Gln	Gly	Gly	Ala	
35	1190						1195					1200				
	Ala	Pro	Gln	Pro	His	Pro	Pro	Pro	Ala	Phe	Ser	Pro	Ala	Phe	Asp	
	1205						1210					1215				
	Asn	Leu	Tyr	Tyr	Trp	Asp	Gln	Asp	Pro	Pro	Glu	Arg	Gly	Ala	Pro	
	1220						1225					1230				
40	Pro	Ser	Thr	Phe	Lys	Gly	Thr	Pro	Thr	Ala	Glu	Asn	Pro	Glu	Tyr	
	1235						1240					1245				
	Leu	Gly	Leu	Asp	Val	Pro	Val									
	1250						1255									
	<210>	22														
45	<211>	3768														
	<212>	ДНК														
	<213>	Homo sapiens														
	<400>	22														

	atggagctgg	cggccttgtg	ccgctggggg	ctcctcctcg	ccctcttgcc	ccccggagcc	60
	gcgagcaccc	aagtgtgcac	cggcacagac	atgaagctgc	ggctccctgc	cagtcccag	120
	accacactgg	acatgctccg	ccacctctac	cagggctgcc	aggtggtgca	gggaaacctg	180
	gaactcacct	acctgcccac	caatgccagc	ctgtccttcc	tgcaggatat	ccaggaggtg	240
5	cagggctacg	tgctcatcgc	tcacaaccaa	gtgaggcagg	tcccactgca	gaggctgcgg	300
	attgtgcbag	gcacccagct	ctttgaggac	aactatgccc	tggccgtgct	agacaatgga	360
	gacccgctga	acaataccac	ccctgtcaca	ggggcctccc	caggaggcct	gcgggagctg	420
	cagcttcgaa	gcctcacaga	gatcttgaaa	ggaggggtct	tgatccagcg	gaacccccag	480
	ctctgctacc	aggacacgat	tttgtggaag	gacatcttcc	acaagaacaa	ccagctggct	540
10	ctcacactga	tagacaccaa	ccgctctcgg	gcctgccacc	cctgttctcc	gatgtgtaag	600
	ggctcccgtc	gctggggaga	gagttctgag	gattgtcaga	gcctgacgcg	cactgtctgt	660
	gccggtggct	gtgcccgtg	caagggggcca	ctgcccactg	actgctgcca	tgagcagtg	720
	gctgccggct	gcacggggcc	caagcactct	gactgcctgg	cctgcctcca	cttcaaccac	780
	agtggcatct	gtgagctgca	ctgcccagcc	ctggtcacct	acaacacaga	cacgtttgag	840
15	tccatgcccc	atcccagagg	ccggtataca	ttcggcgcca	gctgtgtgac	tgccctgtccc	900
	tacaactacc	tttctacgga	cgtgggatcc	tgcaccctcg	tctgccccct	gcacaaccaa	960
	gaggtgacag	cagaggatgg	aacacagcgg	tgtgagaagt	gcagcaagcc	ctgtgcccga	1020
	gtgtgctatg	gtctgggcat	ggagcacttg	cgagaggatga	gggcagttac	cagtgccaat	1080
	atccaggagt	ttgctggctg	caagaagatc	tttgggagcc	tggcatttct	gccggagagc	1140
20	tttgatgggg	accagccctc	caacactgcc	ccgctccagc	cagagcagct	ccaagtgttt	1200
	gagactctgg	aagagatcac	aggttaccta	tacatctcag	catggccgga	cagcctgcct	1260
	gacctcagcg	tcttccagaa	cctgcaagta	atccggggac	gaattctgca	caatggcgcc	1320
	tactcgtgta	ccctgcaagg	gctgggcatc	agctggctgg	ggctgcgctc	actgagggaa	1380
	ctgggagctg	gactggccct	catccaccat	aacacccacc	tctgcttctg	gcacacgggtg	1440
25	ccctgggacc	agctctttcg	gaacccgcac	caagctctgc	tccacactgc	caaccggcca	1500
	gaggacgagt	gtgtgggcca	gggcctggcc	tgccaccagc	tgtgcgcccg	agggcactgc	1560
	tggggccag	ggcccaccca	gtgtgtcaac	tgagccagct	tccttcgggg	ccaggagtgc	1620
	gtggaggaat	gccgagtact	gcaggggctc	cccagggagt	atgtgaatgc	caggcactgt	1680
	ttgccgtgcc	accctgagtg	tcagccccag	aatggctcag	tgacctgttt	tggaccggag	1740
30	gctgaccagt	gtgtggcctg	tgcccactat	aaggaccctc	ccttctgcgt	ggcccgtgc	1800
	cccagcgggtg	tgaaacctga	cctctcctac	atgcccatct	ggaagtcttc	agatgaggag	1860
	ggcgcatgcc	agccttgccc	catcaactgc	acccactcct	gtgtggacct	ggatgacaag	1920
	ggctgccccg	ccgagcagag	agccagccct	ctgacgtcca	tcatctctgc	ggtggttggc	1980
	attctgctgg	tcgtggtctt	gggggtggtc	tttgggatcc	tcatcaagcg	acggcagcag	2040
35	aagatccgga	agtacacgat	gcggagactg	ctgcaggaaa	cggagctgg	ggagccgctg	2100
	acacctagcg	gagcgatgcc	caaccaggcg	cagatgcgga	tcctgaaaga	gacggagctg	2160
	aggaaggtga	aggtgcttgg	atctggcgct	tttggcacag	tctacaagg	catctggatc	2220
	cctgatgggg	agaatgtgaa	aattccagtg	gccatcaaag	tgttgaggga	aaacacatcc	2280
	cccaaagcca	acaaagaaat	cttagacgaa	gcatacgtga	tggctggtgt	gggctcccca	2340
40	tatgtctccc	gccttctggg	catctgcctg	acatccacgg	tgagctgggt	gacacagctt	2400
	atgccctatg	gctgcctctt	agaccatgtc	cgggaaaacc	gcggacgcct	gggctcccag	2460
	gacctgctga	actggtgtat	gcagattgcc	aaggggatga	gctacctgga	ggatgtgcgg	2520
	ctcgtacaca	gggacttggc	cgctcggaac	gtgctggtca	agagtcccaa	ccatgtcaaa	2580
	attacagact	tcgggctggc	tcggctgctg	gacattgacg	agacagagta	ccatgcagat	2640
45	gggggcaagg	tgcccatcaa	gtggatggcg	ctggagtcca	ttctccgccg	gcggttcacc	2700
	caccagagtg	atgtgtggag	ttatggtgtg	actgtgtggg	agctgatgac	ttttggggcc	2760
	aaaccttacg	atgggatccc	agcccgggag	atccctgacc	tgctggaaaa	gggggagcgg	2820
	ctgccccagc	cccccatctg	caccattgat	gtctacatga	tcattggtcaa	atgttggtatg	2880

attgactctg aatgtcggcc aagattccgg gagttggtgt ctgaattctc ccgcatggcc 2940
 agggaccccc agcgctttgt ggtcatccag aatgaggact tgggccagc cagtcccttg 3000
 gacagcacct tctaccgctc actgctggag gacgatgaca tgggggacct ggtggatgct 3060
 gaggagtatc tggtagccca gcagggtctt ttctgtccag accctgcccc gggcgctggg 3120
 5 ggcattggtcc accacaggca ccgcagctca tctaccagga gtggcggtgg ggacctgaca 3180
 ctagggctgg agccctctga agaggaggcc ccaggtctc cactggcacc ctccgaaggg 3240
 gctggctccg atgtatttga tggtagctg ggaatggggg cagccaaggg gctgcaaagc 3300
 ctccccacac atgaccccag ccctctacag cggtagctg aggaccccac agtaccctg 3360
 ccctctgaga ctgatggcta cgttgcccc ctgacctgca gccccagcc tgaatatgtg 3420
 10 aaccagccag atgttcggcc ccagccccct tcgccccgag agggccctct gctgctgccc 3480
 cgacctgctg gtgccactct ggaaaggccc aagactctct cccagggaa gaatggggtc 3540
 gtcaaagacg tttttgcctt tgggggtgcc gtggagaacc ccgagtactt gacacccag 3600
 ggaggagctg cccctcagcc ccaccctcct cctgccttca gccagcctt cgacaacctc 3660
 tattactggg accaggaccc accagagcgg ggggctccac ccagcacctt caaagggaca 3720
 15 cctacggcag agaaccaga gtacctgggt ctggacgtgc cagtgtga 3768
 <210> 23
 <211> 119
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 20 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 полипептид"
 <400> 23
 25 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Gly Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 30 35 40 45
 Ala Met Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ala Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 35 Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg His Gly Asp Asp Pro Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
 40 115
 <210> 24
 <211> 110
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 45 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 полипептид"

<400> 24

```

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

```

<210> 25

<211> 119

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 25

```

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
1           5           10           15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
           20           25           30
Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
30           35           40           45
Gly Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
   50           55           60
Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
   65           70           75           80
35 Met Asp Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
           85           90           95
Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Ser Gly
           100           105           110
Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
40           115

```

<210> 26

<211> 106

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 26

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

<210> 27

<211> 120

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 27

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
 20 25 30
 Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 30 35 40 45
 Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 35 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 40 115 120

<210> 28

<211> 107

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 28

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

<210> 29

<211> 123

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 29

Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Ser Leu Ser Ser Asp Ala
 20 25 30
 Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
 30 35 40 45
 Ile Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 50 55 60
 Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
 65 70 75 80
 35 Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Ile
 85 90 95
 Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Leu
 100 105 110
 Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 40 115 120

<210> 30

<211> 112

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 30

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

<210> 31

<211> 126

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

20 <220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 31

25 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Ser Leu Ser Ser Asp
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
 30 35 40 45
 Gly Ile Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg His Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 35 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Ile Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 Met Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 40 115 120 125

<210> 32

<211> 112

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

45 <220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 32

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

<210> 33

<211> 118

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

20 <220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 33

25 Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15
 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn Asn Tyr Ala
 20 25 30
 Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 30 35 40 45
 Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
 50 55 60
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met Thr
 65 70 75 80
 35 Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Gly Arg Asn Gly
 85 90 95
 Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 40 115

<210> 34

<211> 108

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

45 <220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 34

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

<210> 35

<211> 121

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 35

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asn Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 30 35 40 45
 Gly Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 35 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 40 115 120

<210> 36

<211> 108

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 36

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

<210> 37

<211> 114

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 37

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

Ser Leu

<210> 38

<211> 110

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 38

RU 2754369 C2

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Ala Ser Glu Pro Val Gly
1 5 10 15
Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Arg Val
20 25 30
5 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50 55 60
Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys
10 65 70 75 80
Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser
85 90 95
Tyr Gly Ile Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110
15 <210> 39
<211> 117
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность
<220>
20 <221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
полипептид"
<400> 39
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
25 1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45
30 Gly Thr Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
35 85 90 95
Arg Tyr Tyr Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115
40 <210> 40
<211> 110
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность
<220>
45 <221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
полипептид"
<400> 40

RU 2754369 C2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Arg Val
20 25 30
5 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Asp Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Cys
10 65 70 75 80
Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser
85 90 95
Tyr Gly Ile Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110
15 <210> 41
<211> 122
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность
<220>
20 <221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
полипептид"
<400> 41
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Lys Pro Asp Glu Ser
25 1 5 10 15
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
20 25 30
Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45
30 Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ile Thr
65 70 75 80
Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly
35 85 90 95
Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
40 <210> 42
<211> 112
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность
<220>
45 <221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
полипептид"
<400> 42

RU 2754369 C2

Ala Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15
Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn
20 25 30
5 Asn Asn Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
35 40 45
Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val
10 65 70 75 80
Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Cys Asp Asp
85 90 95
Asp Ala Asp Thr Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110
15 <210> 43
<211> 125
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность
<220>
20 <221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
полипептид"
<400> 43
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
25 1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
30 Gly Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
35 85 90 95
Arg Gly Gly Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr Phe
100 105 110
Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125
40 <210> 44
<211> 112
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность
<220>
45 <221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
полипептид"
<400> 44

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 Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn
 20 25 30
 5 Asn Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 10 65 70 75 80
 Gln Cys Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Cys Asp Asp
 85 90 95
 Asp Ala Asp Thr Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 15 <210> 45
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 20 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 полинуклеотид"
 <400> 45
 gaggtccaac tgggtggagag cgggtggaggt gttgtgcaac ctggccggtc cctgcgccctg 60
 25 tcttgctccg catctggctt caccttcagc ggctatgggt tgtcttgggt gagacaggca 120
 cctggaaaag gtcttgagtg ggttgcaatg attagtagtg gtggtagtta tacctactat 180
 gcagacagtg tgaagggtag atttgcaata tcgcgagaca acgccaagaa cacattgttc 240
 ctgcaaatgg acagcctgag acccgaagac accgggggtct atttttgtgc aagacatggg 300
 gacgatcccg cctgggttcgc ttattggggc caagggaccc cggtcaccgt ctctctca 357
 30 <210> 46
 <211> 330
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 35 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 полинуклеотид"
 <400> 46
 gacatccagc tgacccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtgggtga cagagtgacc 60
 40 atcacctgta gtgtcagctc aagtataagt tccaacaact tgcaactggta ccagcagaag 120
 ccaggtaagg ctccaaagcc atggatctac ggcacatcca acctggcttc tgggtgtgcca 180
 agcagattca gcggtagcgg tagcgggtacc gactacacct tcaccatcag cagcctccag 240
 ccagaggaca tcgccaccta ctactgccaa cagtggagta gttacccgta catgtacacg 300
 ttcggccaag ggaccaaggt ggaaatcaaa 330
 45 <210> 47
 <211> 357
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"

5 <400> 47

caggtacaac tgcagcagtc tgggcctgag ctggagaagc ctggcgcttc agtgaagata 60

tcctgcaagg cttctgggta ctcatctact ggctacacca tgaactgggt gaagcagagc 120

catggaaaga gccttgagtg gattggactt attactcctt acaatgggtgc ttctagctac 180

aaccagaagt tcaggggcaa ggccacatta actgtagaca agtcatccag cacagcctac 240

10 atggacctcc tcagtctgac atctgaagac tctgcagtct atttctgtgc aaggggggggt 300

tacgacggga ggggttttga ctactgggga tccgggaccc cggtcaccgt ctctca 357

<210> 48

<211> 318

<212> ДНК

15 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"

20 <400> 48

gacatcgagc tactcagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60

atgacctgca gtgccagctc aagtgttaagt tacatgact ggtaccagca gaagtcaggc 120

acctccccc aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt cccaggtcgc 180

ttcagtggca gtgggtctgg aaactcttac tctctacaa tcagcagcgt ggaggctgaa 240

25 gatgatgcaa cttattactg ccagcagtg agtaagcacc ctctcacgtt cggatccggg 300

accaaggtgg aaatcaaa 318

<210> 49

<211> 369

<212> ДНК

30 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"

35 <400> 49

cagtcggtgg aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacaccct gacactcacc 60

tgcaccgtct ctggaatctc cctcagtagc gatgcaataa gctgggtccg ccaggctcca 120

gggaaggggc tcgaatacat cggaatcatt aatgggtgggt gtaacacata ctacgcgagc 180

tgggcgaaaag gccgattcac catctccaaa acctcgacca cgggtggatct gaaaatcacc 240

40 agtccgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gaggcattca acatgggtgg 300

ggtaatagtg attattatta ttacggcatg gacctctggg gcccaggcac cctgggtcact 360

gtctcttca 369

<210> 50

<211> 336

<212> ДНК

45 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 50

	gaagtgttga tgacccagac tccatcctcc gtgtctgcag ctgtgggaga cacagtcacc	60
5	atcaagtgcc aggccagtca gagcattagt agtgtcttgt cctggatatca gcagaaacca	120
	gggcagcctc ccaagctcct gatctatctg gcatccactc tggcatctgg ggtcccatcg	180
	cggttcagcg gcagtagatc tgggacagag ttcactctca ccatcagcga cctggagtgt	240
	gacgatgctg ccacttacta ctgtcaaacc aattatggta ctagtagtag taattatggt	300
	tttgcttttcg gcggaaggac cgaggtggtc gtcaaa	336

10 <210> 51

<211> 378

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

15 <221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 51

	gaagtccaac tgggtgaaaag cgggggagga ctggtgcagc cgggcggatc cctccggctg	60
20	tcatgtgctg catcggaat ttccctctcc tccgacgcga ttagctgggt cagacaggcc	120
	cccgaaagg ggctggagta catcggtatc atcaacggcg gcggaaacac ctactacgc	180
	tcctgggcca agggccgctt caccatctcg cggcataatt ccaagaacac tctgtacttg	240
	caaatgaact ccctgagggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcgcg cggcatccag	300
	cacggtggtg gaaacagcga ctactactac tatgggatgg atctgtgggg ccagggaact	360
25	cttgtgaccg tgtcgtca	378

<210> 52

<211> 336

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

30 <220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 52

35	gacattcaga tgacccagtc cccaagctcg ctgtccgcct ccgtgggcga ccgcgtgacc	60
	atcacgtgcc aggcgtccca gtcaattagc agcgtgctct cctggtacca acagaagccg	120
	gggaaagcac ccaagctgct gatctacttg gcctccactc tggcctcggg agtgccttca	180
	cggttctccg gatcgggatc tggtagtgat ttaccctca ccatctcgag ccttcagtgc	240
	gaggacatcg ctacttacta ttgtcaaacc aactacggaa cctccagctc caactacggc	300
40	tttgccttcg gtggcgggac caaggtcgaa atcaaa	336

<210> 53

<211> 354

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

45 <220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"

	<400> 53	
	cagtcggtgg aggagtcctgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacaccct gacactcacc	60
	tgcacagtct ctggattctc cctcaataac tatgcaatga gctgggtccg ccaggctcca	120
	gggaaggggc tggaatggat cggatccatt agtactgggtg gtctcgcatc ctacgcgaac	180
5	tgggcaaaaag gccgattcac catctccaga acctcgacca cggatgatct gaaaatgacc	240
	agtctgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtggca gaaatgggtg tggtagttat	300
	atcttctatt atcttgactt gtggggccaa ggcaccctcg tctactgtctc ttca	354
	<210> 54	
	<211> 324	
10	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический	
15	полинуклеотид"	
	<400> 54	
	gcattcgaat tgacccagac tccatcctcc gtggaggcag ctgtgggagg cacaatcacc	60
	atcaagtgcc aggccagtca gagcattagt agttacttat cctggatatca gcagaaacca	120
	gggcagcctc ccaagctcct gatctattct gcattccactc tggcatctgg ggtctcatcg	180
20	cggttcaaag gcagtggatc tgggacagag tacactctca ccatcagcga cctggagtgt	240
	gccgatgctg ccacttactt ctgtcaaagc tattatgata ttggtactag tactttcggc	300
	ggagggaccg aggtggtcgt caaa	324
	<210> 55	
	<211> 363	
25	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический	
30	полинуклеотид"	
	<400> 55	
	gaagtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg	60
	tcttgtgccg cctccggctt ctccctgaac aactacgcca tgtcctgggt gcgacaggcc	120
	cctggcaaaag gcctggaatg gatcggtctc atcagcacag gcggcctggc cttctacgcc	180
35	aattggggcca agggccggtt caccatcagc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctc	240
	cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccag aaacggcgga	300
	ggctcctaca tcttctacta cttcgacctg tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtca	360
	tct	363
	<210> 56	
40	<211> 324	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
45	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический	
	полинуклеотид"	
	<400> 56	
	gatattcaga tgacccagtc cccctccagc ctgtccgctt ctgtgggcga cagagtgacc	60

	atcacctgtc aggcctccca gtccatctcc tcctacctgt cctggatatca gcagaagccc	120
	ggcaaggccc ccaagctgct gatctactct gcctccacac tggcctccgg cgtgccctct	180
	agattctccg gctctggctc tggcaccgac ttaccctga ccatcagctc cctccagtgc	240
	gaggatgccg ccacctacta ctgccagtcc tactacgaca tcggcacctc caccttcggc	300
5	ggaggcacca aggtggaaat caaa	324
	<210> 57	
	<211> 342	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
10	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"	
	<400> 57	
15	cagtcagtga aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacaccct gacactcacc	60
	tgcacagtct ctggaatcga cctcagtagc tatgcaatgg gctggttccg ccaggctcca	120
	gggaaggggc tggaatacat cggaaccatt aatattgggtg gtcgcgtata ttacgcgagc	180
	tgggcaaaag gccgattcac catctccaga acctcgacca cgggtgatct gaaagcgccc	240
	agtctgacag ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gatattataa tgggtggtagt	300
20	tatgacatct gggggccagg caccctggtc accgtctctt ta	342
	<210> 58	
	<211> 330	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
25	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"	
	<400> 58	
30	gatgttgtga tgaccagac tccagcctcc gcgtctgaac ctgtgggagg cacagtcacc	60
	atcaagtgcc aggccagtga gagcatTTat cgcgtattgg cctggatatca gcagaaacca	120
	gggcagcctc ccaagctcct gatctatgat acatccactc tggcatctgg ggccccatcg	180
	cggttcaaag gcagtggata tgggacagag ttactctca ccatcagcgg cgtgcagtgt	240
	gaagatgctg ccacttacta ctgtcaaggc gggtattatg ctgatagtta tggatttgct	300
35	ttcggcggag ggaccgaggt ggtggtcaaa	330
	<210> 59	
	<211> 351	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
40	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"	
	<400> 59	
45	cagggtgcagc tgggtggaatc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc tctgagactg	60
	tcctgttccg cctccggaat cgacctgtcc tcctacgcta tgggctgggt gcgacaggct	120
	cctggcaagg gcctggagta catcggcacc atcaacatcg gcggcagagt gtactacgcc	180
	tcctgggcca agggccgggt caccatctcc agagacaact ccaagaacac cctgtacctc	240

	cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccc gtactacaac	300
	ggcggctcct acgatatctg gggccagggc aactcgtga cgtgtcctc t	351
	<210> 60	
	<211> 330	
5	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический	
10	полинуклеотид"	
	<400> 60	
	gatatccaga tgaccagtc cccctccacc ctgtctgcct ctgtgggcca cagagtgacc	60
	atcacctgtc aggcctccga gtccatctac cgggtgctgg cctggatatca gcagaagcct	120
	ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac accagcacac tggcctccgg cgtgccctct	180
15	agattctccg gctctggctc tggcaccgag ttaccctga ccatctccag cctccagtgc	240
	gacgacgccg ccacctacta ttgtcagggc ggctactacg ccgactccta cggaatcgt	300
	ttcggcggag gcaccaaggt ggaatatcaa	330
	<210> 61	
	<211> 366	
20	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический	
25	полинуклеотид"	
	<400> 61	
	cagtcggtgg aggagtccgg cggtcgcctg gtaaagcctg acgaatccct gacactcacc	60
	tgcacagcct ctggattctc cctcagtagt tatgcaatga tctgggtccg ccaggctcca	120
	ggggagggggc tggaatggat cggaaccatt agtactgggt gtatcacata ctacgcgagc	180
30	tgggcgaaaag gccgattcac catctccaaa acctcgacca cgggtggatct gaaaatcacc	240
	agtccgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtgcca gagggggata tgctgctagt	300
	agtgtttatt atctcccgtg ctactttgac ttgtggggcc aaggggaccct ggtcacgcgc	360
	tcctca	366
	<210> 62	
35	<211> 336	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
40	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический	
	полинуклеотид"	
	<400> 62	
	gcagccgtgc tgaccagac accatcaccc gtgtctgcag ctgtgggagg cacagtcacc	60
	atcagttgcc agtccagtca gagtgtttat aataataaca acttagcctg gtttcagcag	120
45	aaacccgggc agcctcccaa gcttctgac tatctggcat ccactctggc atctggggtc	180
	ccatcacggg tcagcggcag tggatctggg acacagttca ctctcacat cagcggcgtg	240
	cagtgtgacg atgctgccac ttattactgt ctagggtggt gtgatgatga tgctgatact	300
	tttgctttcg gcggagggac tgagggtggt gtcaaa	336

<210> 63
 <211> 375
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"
 <400> 63
 10 gaagtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg 60
 tcttgtgccg cctccggctt ctccctgtcc tcctacgcta tgatctgggt gcgacaggcc 120
 cctggcaagg gcctggaatg gatcggcacc atctctaccg gcggaattac ctactacgcc 180
 tcctggggcca agggccggtt caccatctcc agagacaact ccaagaacac cctgtacctc 240
 cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact attgtgctag aggcggctac 300
 15 gccgccagct ccgcttacta cctgccctac tacttcgacc tgtggggcca gggcacctc 360
 gtgacagtgt catct 375
 <210> 64
 <211> 336
 <212> ДНК
 20 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"
 25 <400> 64
 gatattcaga tgacccagtc cccctccagc ctgtccgctt ctgtgggcca cagagtgacc 60
 atcacctgtc agtcctccca gtccgtgtat aacaacaaca acctggcctg gtatcagcag 120
 aaacccggca aggtgccccaa gctgctgata tacctggcct ccacactggc ctctggcgctg 180
 ccctctagat tctccggctc tggctctggc accgacttta ccctgaccat cagctccctc 240
 30 cagtgcgagg atgccgccac ctactattgc ctgggcggct gcgacgacga cgccgatacc 300
 tttgcttttg gcggaggcac caaggtggaa atcaaa 336
 <210> 65
 <211> 5
 <212> ПРТ
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 40 <400> 65
 Gly Tyr Thr Met Asn
 1 5
 <210> 66
 <211> 17
 45 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 66
 Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Arg
 5 1 5 10 15
 Gly
 <210> 67
 <211> 10
 <212> ПРТ
 10 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 15 <400> 67
 Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 68
 <211> 10
 20 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 25 <400> 68
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
 1 5 10
 <210> 69
 30 <211> 7
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 35 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 69
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5
 40 <210> 70
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 70

Gln Gln Trp Ser Lys His Pro Leu Thr
1 5
<210> 71
<211> 5
5 <212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
10 пептид"
<400> 71
Asp Thr Tyr Ile His
1 5
<210> 72
15 <211> 17
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
20 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
пептид"
<400> 72
Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
25 Gly
<210> 73
<211> 11
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность
30 <220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
пептид"
<400> 73
35 Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10
<210> 74
<211> 11
<212> ПРТ
40 <213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
пептид"
45 <400> 74
Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala
1 5 10
<210> 75

<211> 7
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 75
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 10 1 5
 <210> 76
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 76
 20 Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
 1 5
 <210> 77
 <211> 5
 <212> ПРТ
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 30 <400> 77
 Ser Asp Ala Ile Ser
 1 5
 <210> 78
 <211> 16
 35 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 40 <400> 78
 Ile Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 79
 45 <211> 18
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 79
 5 Gly Ile Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
 1 5 10 15
 Asp Leu
 <210> 80
 <211> 11
 10 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 15 <400> 80
 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Val Leu Ser
 1 5 10
 <210> 81
 20 <211> 7
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 25 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 81
 Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5
 30 <210> 82
 <211> 14
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 35 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 82
 Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser Ser Asn Tyr Gly Phe Ala
 40 1 5 10
 <210> 83
 <211> 5
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 45 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"

<400> 83
 Ser Asp Ala Ile Ser
 1 5
 <210> 84
 5 <211> 16
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 10 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 84
 Ile Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 15 <210> 85
 <211> 18
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 20 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 85
 Gly Ile Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met
 25 1 5 10 15
 Asp Leu
 <210> 86
 <211> 11
 <212> ПРТ
 30 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 35 <400> 86
 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Val Leu Ser
 1 5 10
 <210> 87
 <211> 7
 40 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 45 пептид"
 <400> 87
 Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

<210> 88
 <211> 14
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 88
 10 Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser Ser Asn Tyr Gly Phe Ala
 1 5 10
 <210> 89
 <211> 5
 <212> ПРТ
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 20 <400> 89
 Asn Tyr Ala Met Ser
 1 5
 <210> 90
 <211> 16
 25 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 30 <400> 90
 Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 91
 35 <211> 13
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 40 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 91
 Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10
 45 <210> 92
 <211> 11
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 5 <400> 92
 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ser
 1 5 10
 <210> 93
 <211> 7
 10 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 15 <400> 93
 Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 94
 20 <211> 10
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 25 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 94
 Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr Ser Thr
 1 5 10
 30 <210> 95
 <211> 5
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 35 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 95
 Asn Tyr Ala Met Ser
 40 1 5
 <210> 96
 <211> 16
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 45 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"

<400> 96
 Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 97
 5 <211> 13
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 10 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 97
 Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10
 15 <210> 98
 <211> 11
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 20 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 98
 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ser
 25 1 5 10
 <210> 99
 <211> 7
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 30 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 99
 35 Ser Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 100
 <211> 10
 <212> ПРТ
 40 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 45 <400> 100
 Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr Ser Thr
 1 5 10
 <210> 101

<211> 5
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 101
 Ser Tyr Ala Met Gly
 10 1 5
 <210> 102
 <211> 16
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 102
 20 Thr Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 103
 <211> 9
 <212> ПРТ
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 30 <400> 103
 Tyr Tyr Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile
 1 5
 <210> 104
 <211> 11
 35 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 40 пептид"
 <400> 104
 Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Arg Val Leu Ala
 1 5 10
 <210> 105
 45 <211> 7
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 105
 5 Asp Thr Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 106
 <211> 12
 <212> ПРТ
 10 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 15 <400> 106
 Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser Tyr Gly Ile Ala
 1 5 10
 <210> 107
 <211> 5
 20 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 25 <400> 107
 Ser Tyr Ala Met Gly
 1 5
 <210> 108
 30 <211> 16
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 35 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 108
 Thr Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 40 <210> 109
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 109

Tyr Tyr Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile
 1 5
 <210> 110
 <211> 11
 5 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 10 пептид"
 <400> 110
 Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Arg Val Leu Ala
 1 5 10
 <210> 111
 15 <211> 7
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 20 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 111
 Asp Thr Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5
 25 <210> 112
 <211> 12
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 30 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 112
 Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser Tyr Gly Ile Ala
 35 1 5 10
 <210> 113
 <211> 5
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 113
 45 Ser Tyr Ala Met Ile
 1 5
 <210> 114
 <211> 16

<212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 5 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 114
 Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 10 <210> 115
 <211> 17
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 115
 Gly Gly Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp
 20 1 5 10 15
 Leu
 <210> 116
 <211> 13
 <212> ПРТ
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 30 <400> 116
 Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Asn Leu Ala
 1 5 10
 <210> 117
 <211> 7
 35 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 40 пептид"
 <400> 117
 Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 118
 45 <211> 12
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 118
 5 Leu Gly Gly Cys Asp Asp Asp Ala Asp Thr Phe Ala
 1 5 10
 <210> 119
 <211> 5
 <212> ПРТ
 10 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 15 <400> 119
 Ser Tyr Ala Met Ile
 1 5
 <210> 120
 <211> 16
 20 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 25 <400> 120
 Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 121
 30 <211> 17
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 35 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 121
 Gly Gly Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp
 1 5 10 15
 40 Leu
 <210> 122
 <211> 13
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 45 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"

<400> 122
 Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Asn Leu Ala
 1 5 10
 <210> 123
 5 <211> 7
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 10 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 123
 Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5
 15 <210> 124
 <211> 12
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 20 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 124
 Leu Gly Gly Cys Asp Asp Asp Ala Asp Thr Phe Ala
 25 1 5 10
 <210> 125
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 30 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 125
 35 ggctatgggt tgtct 15
 <210> 126
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 126
 45 atgattagta gtggtggttag ttatacctac tatgcagaca gtgtgaaggg t 51
 <210> 127
 <211> 30
 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 5 олигонуклеотид"
 <400> 127
 catggggacg atcccgctg gttcgcttat 30
 <210> 128
 <211> 36
 10 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 15 олигонуклеотид"
 <400> 128
 agtgtcagct caagtataag ttccaacaac ttgcac 36
 <210> 129
 <211> 21
 20 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 25 олигонуклеотид"
 <400> 129
 ggcacatcca acctggcttc t 21
 <210> 130
 <211> 33
 30 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 35 олигонуклеотид"
 <400> 130
 caacagtgga gtagttaccc gtacatgtac acg 33
 <210> 131
 <211> 15
 40 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 45 олигонуклеотид"
 <400> 131
 ggctacacca tgaac 15
 <210> 132

<211> 51
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 132
 cttattactc cttacaatgg tgcttctagc tacaaccaga agttcagggg c 51
 10 <210> 133
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 133
 ggggggttacg acgggagggg ttttgactac 30
 20 <210> 134
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 25 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 134
 agtgccagct caagtgtgaag ttacatgcac 30
 30 <210> 135
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 35 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 135
 gacacatcca aactggcttc t 21
 40 <210> 136
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 136

cagcagtgga gtaagcaccs tctcacg
 <210> 137
 <211> 15
 <212> ДНК
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 10 <400> 137
 agcgatgcaa taagc 15
 <210> 138
 <211> 48
 <212> ДНК
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 20 <400> 138
 atcattaatg gtggtggtaa cacatactac gcgagctggg cgaaggg 48
 <210> 139
 <211> 54
 <212> ДНК
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 30 <400> 139
 ggcattcaac atggtgggtg taatagtgat tattattatt acggcatgga cctc 54
 <210> 140
 <211> 33
 <212> ДНК
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 40 <400> 140
 caggccagtc agagcattag tagtgtcttg tcc 33
 <210> 141
 <211> 21
 <212> ДНК
 45 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический

олигонуклеотид"

<400> 141
ctggcatcca ctctggcatc t 21

<210> 142

5 <211> 42

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

10 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 142
caaaccaatt atggtactag tagtagtaat tatggttttg ct 42

<210> 143

15 <211> 15

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

20 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 143
tccgacgcga ttagc 15

<210> 144

25 <211> 48

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

30 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 144
atcatcaacg gcggcggaac cacctactac gcctcctggg ccaagggc 48

<210> 145

35 <211> 54

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

40 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"

<400> 145
ggcatccagc acggtgggtgg aaacagcgac tactactact atgggatgga tctg 54

<210> 146

45 <211> 33

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"
 <400> 146
 5 caggcgtccc agtcaattag cagcgtgctc tcc 33
 <210> 147
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 10 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"
 <400> 147
 15 ttggcctcca ctctggcctc g 21
 <210> 148
 <211> 42
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 20 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"
 <400> 148
 25 сааассааст асггаасстс сасгтссаас тасггсттг сс 42
 <210> 149
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 30 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"
 <400> 149
 35 аастатгсаа тгагс 15
 <210> 150
 <211> 48
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"
 <400> 150
 45 тссаттагта сгггтггтсгт сгсаттсгтс гсгаастггг сааааггс 48
 <210> 151
 <211> 39
 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 5 олигонуклеотид"
 <400> 151
 aatggtggtg gtagttatat tttctattat tttgacttg 39
 <210> 152
 <211> 33
 10 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 15 олигонуклеотид"
 <400> 152
 caggccagtc agagcattag tagttactta tcc 33
 <210> 153
 <211> 21
 20 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 25 олигонуклеотид"
 <400> 153
 tctgcatcca ctctggcatc t 21
 <210> 154
 <211> 30
 30 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 35 олигонуклеотид"
 <400> 154
 caaagctatt atgatattgg tactagtact 30
 <210> 155
 <211> 15
 40 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 45 олигонуклеотид"
 <400> 155
 aactacgcca tgtcc 15
 <210> 156

<211> 48
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 156
 tccatcagca caggcggcct ggccttctac gccaattggg csaagggc 48
 10 <210> 157
 <211> 39
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 157
 aacggcggag gctcctacat cttctactac ttcgacctg 39
 20 <210> 158
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 25 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 158
 caggcctccc agtccatctc ctccctacctg tcc 33
 30 <210> 159
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 35 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 159
 tctgcctcca cactggcctc c 21
 40 <210> 160
 <211> 30
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 160

cagtcctact acgacatcgg cacctccacc
 <210> 161
 <211> 15
 <212> ДНК
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 10 <400> 161
 agctatgcaa tgggc 15
 <210> 162
 <211> 48
 <212> ДНК
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 20 <400> 162
 accattaata ttggtggtcg cgtatattac gcgagctggg caaaaggc 48
 <210> 163
 <211> 27
 <212> ДНК
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 30 <400> 163
 tattataatg gtggtagtta tgacatc 27
 <210> 164
 <211> 33
 <212> ДНК
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 40 <400> 164
 caggccagtg agagcattta tcgcgtattg gcc 33
 <210> 165
 <211> 21
 <212> ДНК
 45 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический

	олигонуклеотид"	
	<400> 165	
	gatacatcca ctctggcatc t	21
	<210> 166	
5	<211> 36	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
10	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"	
	<400> 166	
	caaggcgggtt attatgctga tagttatgggt attgct	36
	<210> 167	
15	<211> 15	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
20	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"	
	<400> 167	
	tcctacgcta tgggc	15
	<210> 168	
25	<211> 48	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
30	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"	
	<400> 168	
	accatcaaca tcggcggcag agtgtactac gcctcctggg ccaagggc	48
	<210> 169	
35	<211> 27	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
40	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"	
	<400> 169	
	tactacaacg gcggctccta cgatatc	27
	<210> 170	
45	<211> 33	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	

<221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"
 <400> 170
 5 caggcctccg agtccatcta ccgggtgctg gcc 33
 <210> 171
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 10 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"
 <400> 171
 15 gacaccagca cactggcctc c 21
 <210> 172
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 20 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"
 <400> 172
 25 cagggcggt actacgccga ctccctacgga atcgct 36
 <210> 173
 <211> 15
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 30 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"
 <400> 173
 35 agttatgcaa tgatc 15
 <210> 174
 <211> 48
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"
 <400> 174
 45 accattagta ctggtggtat cacatactac gcgagctggg cgaagggc 48
 <210> 175
 <211> 51
 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 5 олигонуклеотид"
 <400> 175
 gggggatatg ctgctagtag tgcttattat ctcccgtact actttgactt g 51
 <210> 176
 <211> 39
 10 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 15 олигонуклеотид"
 <400> 176
 cagtcctccc agtccgtgta taacaacaac aacctggcc 39
 <210> 177
 <211> 21
 20 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 25 олигонуклеотид"
 <400> 177
 ctggcatcca ctctggcatc t 21
 <210> 178
 <211> 36
 30 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 35 олигонуклеотид"
 <400> 178
 ctaggtgggtt gtgatgatga tgctgatact tttgct 36
 <210> 179
 <211> 15
 40 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 45 олигонуклеотид"
 <400> 179
 tcctacgcta tgatc 15
 <210> 180

<211> 48
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 180
 accatctcta ccggcggaat tacctactac gcctcctggg csaagggc 48
 10 <210> 181
 <211> 51
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 181
 ggccggctacg ccgccagctc cgcttactac ctgccctact acttcgacct g 51
 20 <210> 182
 <211> 39
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 25 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 182
 cagtcctccc agtccgtgta taacaacaac aacctggcc 39
 30 <210> 183
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 35 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 183
 ctggcctcca cactggcctc t 21
 40 <210> 184
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 184

ctgggcggt ggcagcagca cgccgatacc tttgct
 <210> 185
 <211> 8
 <212> ПРТ
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 10 <400> 185
 Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr
 1 5
 <210> 186
 <211> 8
 15 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 20 пептид"
 <400> 186
 Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser
 1 5
 <210> 187
 25 <211> 12
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 30 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 187
 Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Arg Gly Phe Asp Tyr
 1 5 10
 35 <210> 188
 <211> 5
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 40 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 188
 Ser Ser Val Ser Tyr
 45 1 5
 <210> 189
 <211> 3
 <212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 5 пептид"
 <400> 189
 Asp Thr Ser
 1
 <210> 190
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 15 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 190
 Gln Gln Trp Ser Lys His Pro Leu Thr
 1 5
 20 <210> 191
 <211> 8
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 25 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 191
 Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr
 30 1 5
 <210> 192
 <211> 8
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 35 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 192
 40 Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr
 1 5
 <210> 193
 <211> 13
 <212> ПРТ
 45 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический

пептид"

<400> 193
 Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

5 <210> 194
 <211> 6
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

10 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"

<400> 194
 Gln Asp Val Asn Thr Ala
 1 5

15 <210> 195
 <211> 3
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

20 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"

<400> 195
 Ser Ala Ser
 1

25 <210> 196
 <211> 9
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

30 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"

35 <400> 196
 Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
 1 5

<210> 197
 <211> 8
 <212> ПРТ

40 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"

45 <400> 197
 Gly Ile Ser Leu Ser Ser Asp Ala
 1 5

<210> 198
 <211> 7
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 198
 10 Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr
 1 5
 <210> 199
 <211> 20
 <212> ПРТ
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 20 <400> 199
 Ala Arg Gly Ile Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Gly Met Asp Leu
 20
 25 <210> 200
 <211> 6
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 30 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 200
 Gln Ser Ile Ser Ser Val
 35 1 5
 <210> 201
 <211> 3
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 201
 45 Leu Ala Ser
 1
 <210> 202
 <211> 14

<212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 5 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 202
 Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser Ser Asn Tyr Gly Phe Ala
 1 5 10
 10 <210> 203
 <211> 8
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 203
 Gly Ile Ser Leu Ser Ser Asp Ala
 20 1 5
 <210> 204
 <211> 7
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 25 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 204
 30 Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr
 1 5
 <210> 205
 <211> 20
 <212> ПРТ
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 40 <400> 205
 Ala Arg Gly Ile Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Gly Met Asp Leu
 20
 45 <210> 206
 <211> 6
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 5 <400> 206
 Gln Ser Ile Ser Ser Val
 1 5
 <210> 207
 <211> 3
 10 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 15 пептид"
 <400> 207
 Leu Ala Ser
 1
 <210> 208
 20 <211> 14
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 25 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 208
 Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser Ser Asn Tyr Gly Phe Ala
 1 5 10
 30 <210> 209
 <211> 8
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 35 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 209
 Gly Phe Ser Leu Asn Asn Tyr Ala
 40 1 5
 <210> 210
 <211> 7
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 45 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"

<400> 210
 Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala
 1 5
 <210> 211
 5 <211> 15
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 10 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 211
 Gly Arg Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10 15
 15 <210> 212
 <211> 6
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 20 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 212
 Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 25 1 5
 <210> 213
 <211> 3
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 30 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 213
 35 Ser Ala Ser
 1
 <210> 214
 <211> 10
 <212> ПРТ
 40 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 45 <400> 214
 Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr Ser Thr
 1 5 10
 <210> 215

<211> 8
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 215
 Gly Phe Ser Leu Asn Asn Tyr Ala
 10 1 5
 <210> 216
 <211> 7
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 216
 20 Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala
 1 5
 <210> 217
 <211> 15
 <212> ПРТ
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 30 <400> 217
 Ala Arg Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10 15
 <210> 218
 <211> 6
 35 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 40 пептид"
 <400> 218
 Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 1 5
 <210> 219
 45 <211> 3
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 219
 5 Ser Ala Ser
 1
 <210> 220
 <211> 10
 <212> ПРТ
 10 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 15 <400> 220
 Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr Ser Thr
 1 5 10
 <210> 221
 <211> 8
 20 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 25 <400> 221
 Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr Ala
 1 5
 <210> 222
 30 <211> 7
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 35 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 222
 Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val
 1 5
 40 <210> 223
 <211> 11
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 223

Ala Arg Tyr Tyr Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile
 1 5 10
 <210> 224
 <211> 6
 5 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 10 пептид"
 <400> 224
 Glu Ser Ile Tyr Arg Val
 1 5
 <210> 225
 15 <211> 3
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 20 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 225
 Asp Thr Ser
 1
 25 <210> 226
 <211> 12
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 30 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 226
 Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser Tyr Gly Ile Ala
 35 1 5 10
 <210> 227
 <211> 8
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 227
 45 Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr Ala
 1 5
 <210> 228
 <211> 7

<212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 5 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 228
 Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val
 1 5
 10 <210> 229
 <211> 11
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 229
 Ala Arg Tyr Tyr Asn Gly Gly Ser Tyr Asp Ile
 20 1 5 10
 <210> 230
 <211> 6
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 25 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 230
 30 Glu Ser Ile Tyr Arg Val
 1 5
 <210> 231
 <211> 3
 <212> ПРТ
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 40 <400> 231
 Asp Thr Ser
 1
 <210> 232
 <211> 12
 45 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 232
 Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser Tyr Gly Ile Ala
 5 1 5 10
 <210> 233
 <211> 8
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 10 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 233
 15 Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
 1 5
 <210> 234
 <211> 7
 <212> ПРТ
 20 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 25 <400> 234
 Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr
 1 5
 <210> 235
 <211> 19
 30 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 35 <400> 235
 Ala Arg Gly Gly Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr
 1 5 10 15
 Phe Asp Leu
 40 <210> 236
 <211> 8
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"
 <400> 236

Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Asn
 1 5
 <210> 237
 <211> 3
 5 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 10 пептид"
 <400> 237
 Leu Ala Ser
 1
 <210> 238
 15 <211> 12
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 20 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 238
 Leu Gly Gly Cys Asp Asp Asp Ala Asp Thr Phe Ala
 1 5 10
 25 <210> 239
 <211> 8
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 30 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 239
 Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr Ala
 35 1 5
 <210> 240
 <211> 7
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 240
 45 Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr
 1 5
 <210> 241
 <211> 19

<212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 5 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 241
 Ala Arg Gly Gly Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr
 1 5 10 15
 10 Phe Asp Leu
 <210> 242
 <211> 8
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 15 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 242
 20 Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Asn
 1 5
 <210> 243
 <211> 3
 <212> ПРТ
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 30 <400> 243
 Leu Ala Ser
 1
 <210> 244
 <211> 12
 35 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 40 пептид"
 <400> 244
 Leu Gly Gly Cys Asp Asp Asp Ala Asp Thr Phe Ala
 1 5 10
 <210> 245
 45 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 245
 5 ggcttcacct tcagcggcta tggg 24
 <210> 246
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 10 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 246
 15 attagtagtg gtggtagtta tacc 24
 <210> 247
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 20 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 247
 25 gcaagacatg gggacgatcc cgcctggttc gcttat 36
 <210> 248
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 30 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 248
 35 tcaagtataa gttccaacaa c 21
 <210> 249
 <211> 9
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 249
 45 ggcacatcc 9
 <210> 250
 <211> 33
 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 5 олигонуклеотид"
 <400> 250
 caacagtgga gtagttaccc gtacatgtac acg 33
 <210> 251
 <211> 24
 10 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 15 олигонуклеотид"
 <400> 251
 gggtactcat tcaactggcta cacc 24
 <210> 252
 <211> 24
 20 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 25 олигонуклеотид"
 <400> 252
 attactcctt acaatgggtgc ttct 24
 <210> 253
 <211> 36
 30 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 35 олигонуклеотид"
 <400> 253
 gcaagggggg gttacgacgg gaggggtttt gactac 36
 <210> 254
 <211> 15
 40 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 45 олигонуклеотид"
 <400> 254
 tcaagtgtaa gttac 15
 <210> 255

<211> 9
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 255
 gacacatcc 9
 10 <210> 256
 <211> 27
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 256
 cagcagtggga gtaagcaccs tctcacg 27
 20 <210> 257
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 25 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 257
 ggaatctccc tcagtagcga tgca 24
 30 <210> 258
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 35 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 258
 attaatgggtg gtggtaacas a 21
 40 <210> 259
 <211> 60
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 259

gccagaggca ttcaacatgg tggtaggtaat agtgattatt attattacgg catggacctc 60
 <210> 260
 <211> 18
 <212> ДНК
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 10 <400> 260
 cagagcatta gtagtgtc 18
 <210> 261
 <211> 9
 <212> ДНК
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 20 <400> 261
 ctggcatct 9
 <210> 262
 <211> 42
 <212> ДНК
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 30 <400> 262
 caaaccaatt atggtagtag tagtagtaat tatgggttttg ct 42
 <210> 263
 <211> 24
 <212> ДНК
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 40 <400> 263
 ggaatttccc tctcctccga cgcg 24
 <210> 264
 <211> 21
 <212> ДНК
 45 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический

олигонуклеотид"

<400> 264
atcaacggcg gcggaacac c 21

<210> 265

5 <211> 60
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник

10 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
олигонуклеотид"

<400> 265
gcgcgcggca tccagcacgg tgggtggaac agcgactact actactatgg gatggatctg 60

<210> 266

15 <211> 18
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник

20 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
олигонуклеотид"

<400> 266
cagtcaatta gcagcgtg 18

<210> 267

25 <211> 9
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник

30 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
олигонуклеотид"

<400> 267
ttggcctcc 9

<210> 268

35 <211> 42
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник

40 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
олигонуклеотид"

<400> 268
сааассааст acggaacctc cagctccaac tacggctttg cc 42

<210> 269

45 <211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>

<221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"
 <400> 269
 5 ggattctccc tcaataacta tgca 24
 <210> 270
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 10 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"
 <400> 270
 15 attagtactg gtggtctcgc a 21
 <210> 271
 <211> 45
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 20 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"
 <400> 271
 25 ggcagaaatg gtggtggtag ttatatatttc tattattttg acttg 45
 <210> 272
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 30 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"
 <400> 272
 35 cagagcatta gtagttac 18
 <210> 273
 <211> 9
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"
 <400> 273
 45 tctgcatcc 9
 <210> 274
 <211> 30
 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 5 олигонуклеотид"
 <400> 274
 caaagctatt atgatattgg tactagtact 30
 <210> 275
 <211> 24
 10 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 15 олигонуклеотид"
 <400> 275
 ggcttctccc tgaacaacta cgcc 24
 <210> 276
 <211> 21
 20 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 25 олигонуклеотид"
 <400> 276
 atcagcacag gcggcctggc c 21
 <210> 277
 <211> 45
 30 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 35 олигонуклеотид"
 <400> 277
 gccagaaacg gcggaggctc ctacatcttc tactacttcg acctg 45
 <210> 278
 <211> 18
 40 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 45 олигонуклеотид"
 <400> 278
 cagtccatct cctcctac 18
 <210> 279

<211> 9
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 279
 tctgcctcc 9
 10 <210> 280
 <400> 280
 000
 <210> 281
 <400> 281
 15 000
 <210> 282
 <400> 282
 000
 <210> 283
 20 <400> 283
 000
 <210> 284
 <400> 284
 000
 25 <210> 285
 <400> 285
 000
 <210> 286
 <400> 286
 30 000
 <210> 287
 <400> 287
 000
 <210> 288
 35 <400> 288
 000
 <210> 289
 <400> 289
 000
 40 <210> 290
 <400> 290
 000
 <210> 291
 <400> 291
 45 000
 <210> 292
 <400> 292
 000

<210> 293
 <400> 293
 000
 <210> 294
 5 <400> 294
 000
 <210> 295
 <400> 295
 000
 10 <210> 296
 <400> 296
 000
 <210> 297
 <400> 297
 15 000
 <210> 298
 <400> 298
 000
 <210> 299
 20 <400> 299
 000
 <210> 300
 <211> 30
 <212> ДНК
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 30 <400> 300
 cagtcctact acgacatcgg cacctccacc 30
 <210> 301
 <211> 24
 <212> ДНК
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 40 <400> 301
 ggaatcgacc tcagtagcta tgca 24
 <210> 302
 <211> 21
 <212> ДНК
 45 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический

олигонуклеотид"

<400> 302
 attaatattg gtggtcgcgt a 21

<210> 303

5 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник

10 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"

<400> 303
 gccagatatt ataatggtgg tagttatgac atc 33

<210> 304

15 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник

20 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"

<400> 304
 gagagcattt atcgcgta 18

<210> 305

25 <211> 9
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник

30 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"

<400> 305
 gatacatcc 9

<210> 306

35 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник

40 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"

<400> 306
 caaggcgggtt attatgctga tagttatggt attgct 36

<210> 307

45 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>

<221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"
 <400> 307
 5 ggaatcgacc tgcctccta cgct 24
 <210> 308
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 10 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"
 <400> 308
 15 atcaacatcg gcggcagagt g 21
 <210> 309
 <211> 33
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 20 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"
 <400> 309
 25 gcccgggtact acaacggcgg ctcctacgat atc 33
 <210> 310
 <211> 18
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 30 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"
 <400> 310
 35 gagtccatct accgggtg 18
 <210> 311
 <211> 9
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 40 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический олигонуклеотид"
 <400> 311
 45 gacassagc 9
 <210> 312
 <211> 36
 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 5 олигонуклеотид"
 <400> 312
 cagggcggt actacgcca ctcctacga atcgct 36
 <210> 313
 <211> 24
 10 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 15 олигонуклеотид"
 <400> 313
 ggattctccc tcagtagtta tgca 24
 <210> 314
 <211> 21
 20 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 25 олигонуклеотид"
 <400> 314
 attagtactg gtggatcac a 21
 <210> 315
 <211> 57
 30 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 35 олигонуклеотид"
 <400> 315
 gccagagggg gatatgctgc tagtagtgct tattatctcc cgtactactt tgacttg 57
 <210> 316
 <211> 24
 40 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 45 олигонуклеотид"
 <400> 316
 cagagtgttt ataataataa caac 24
 <210> 317

<211> 9
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 5 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 317
 ctggcatcc 9
 10 <210> 318
 <211> 36
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 15 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 318
 ctaggtgggtt gtgatgatga tgctgatact tttgct 36
 20 <210> 319
 <211> 24
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 25 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 319
 ggcttctccc tgtcctccta cgct 24
 30 <210> 320
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 35 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 320
 atctctaccg gcggaattac c 21
 40 <210> 321
 <211> 57
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 45 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 <400> 321

gctagaggcg gctacgccgc cagctccgct tactacctgc cctactactt cgacctg 57
 <210> 322
 <211> 24
 <212> ДНК
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 10 <400> 322
 cagtccgtgt ataacaaca саас 24
 <210> 323
 <211> 9
 <212> ДНК
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 20 <400> 323
 ctggcctcc 9
 <210> 324
 <211> 36
 <212> ДНК
 25 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 олигонуклеотид"
 30 <400> 324
 ctgggaggct gcgacgacga cgccgatacc ttgct 36
 <210> 325
 <211> 449
 <212> ПРТ
 35 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 полипептид"
 40 <400> 325
 Gln Val Gln Leu Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr
 20 25 30
 45 Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Leu Ile Thr Pro Tyr Asn Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

RU 2754369 C2

	Arg	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr
	65					70				75						80
	Met	Asp	Leu	Leu	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
					85				90						95	
5	Ala	Arg	Gly	Gly	Tyr	Asp	Gly	Arg	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Ser	Gly
				100					105					110		
	Thr	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
				115				120					125			
	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
10				130			135					140				
	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
	145					150				155						160
	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
					165				170							175
15	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
				180					185					190		
	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
				195				200					205			
	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
20				210				215					220			
	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
	225					230				235						240
	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
					245				250							255
25	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
				260					265						270	
	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
				275				280					285			
	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
30				290				295					300			
	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
	305					310				315						320
	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys
					325				330						335	
35	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
				340				345						350		
	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr
				355				360					365			
	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu
40				370				375					380			
	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu
	385					390				395						400
	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
					405				410							415
45	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
				420				425					430			
	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
				435				440					445			

Lys
 <210> 326
 <211> 213
 <212> ПРТ
 5 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"
 10 <400> 326
 Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 15 His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu
 20 65 70 75 80
 Asp Asp Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Lys His Pro Leu Thr
 85 90 95
 Phe Gly Ser Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 100 105 110
 25 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 115 120 125
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 130 135 140
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 30 145 150 155 160
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 165 170 175
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 180 185 190
 35 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 195 200 205
 Asn Arg Gly Glu Cys
 210
 <210> 327
 40 <211> 451
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 45 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"
 <400> 327
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

RU 2754369 C2

	1		5		10		15									
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr
				20				25					30			
	Tyr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
5			35				40					45				
	Ala	Arg	Ile	Tyr	Pro	Thr	Asn	Gly	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
		50					55				60					
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr
	65					70				75					80	
10	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90				95			
	Ser	Arg	Trp	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105				110				
	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
15			115				120				125					
	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
		130					135				140					
	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
	145					150				155					160	
20	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
				165					170				175			
	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
			180					185				190				
	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
25			195				200				205					
	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Pro	Lys	Ser	Cys
		210					215				220					
	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
	225				230				235				240			
30	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
				245					250				255			
	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
		260					265				270					
	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
35			275				280				285					
	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
		290				295			300							
	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
	305				310				315				320			
40	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
				325					330				335			
	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
			340				345				350					
	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
45			355				360				365					
	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
		370				375			380							
	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro

RU 2754369 C2

385 390 395 400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
405 410 415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
5 420 425 430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
435 440 445
Pro Gly Lys
450
10 <210> 328
<211> 214
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность
<220>
15 <221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
полипептид"
<400> 328
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
20 1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
25 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Arg 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 His Tyr Thr Thr Pro Pro
30 85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125
35 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
40 165 170 175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
45 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210
<210> 329
<211> 453

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

5 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 329

	Gln	Ser	Val	Glu	Glu	Ser	Gly	Gly	Arg	Leu	Val	Thr	Pro	Gly	Thr	Pro
	1				5					10					15	
10	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Ile	Ser	Leu	Ser	Ser	Asp	Ala
				20					25					30		
	Ile	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Tyr	Ile	Gly
			35					40					45			
	Ile	Ile	Asn	Gly	Gly	Gly	Asn	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Trp	Ala	Lys	Gly
15		50					55					60				
	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Ser	Thr	Thr	Val	Asp	Leu	Lys	Ile	Thr
	65					70					75				80	
	Ser	Pro	Thr	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Gly	Ile
					85					90				95		
20	Gln	His	Gly	Gly	Gly	Asn	Ser	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Leu
				100					105					110		
	Trp	Gly	Pro	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly
			115					120						125		
	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly
25		130					135					140				
	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val
	145					150					155				160	
	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe
					165					170				175		
30	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val
				180					185					190		
	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val
			195					200					205			
	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys
35		210					215					220				
	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu
	225					230					235				240	
	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
				245						250					255	
40	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
				260					265						270	
	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
			275						280					285		
	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser
45		290					295					300				
	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu
	305					310					315				320	
	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala

325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 5 355 360 365
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 10 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 15 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 330
 <211> 219
 20 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 25 полипептид"
 <400> 330
 Glu Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Val
 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 35 Ser Arg Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
 65 70 75 80
 Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Thr Asn Tyr Gly Thr Ser Ser
 85 90 95
 Ser Asn Tyr Gly Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 40 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 45 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205
5 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215
<210> 331
<211> 456
<212> ПРТ
10 <213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
полипептид"
15 <400> 331
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ile Ser Leu Ser Ser Asp
20 25 30
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
35 40 45
Gly Ile Ile Asn Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg His Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
25 65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Gly Ile Gln His Gly Gly Gly Asn Ser Asp Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
100 105 110
30 Met Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125
Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
130 135 140
Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro
35 145 150 155 160
Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val
165 170 175
His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser
180 185 190
40 Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile
195 200 205
Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
210 215 220
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
45 225 230 235 240
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
245 250 255
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val

		260		265		270													
		Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val		
		275							280					285					
		Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln		
5		290						295					300						
		Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln		
		305					310					315				320			
		Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala		
					325						330					335			
10		Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro		
				340						345					350				
		Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr		
				355					360					365					
		Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser		
15		370						375					380						
		Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr		
		385					390					395				400			
		Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr		
					405						410					415			
20		Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe		
				420						425					430				
		Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys		
				435					440					445					
		Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
25		450						455											
		<210>	332																
		<211>	219																
		<212>	ПРТ																
		<213>	Искусственная последовательность																
30		<220>																	
		<221>	источник																
		<223>	/примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"																
		<400>	332																
35		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	Gln	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Val		
				20						25					30				
		Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile		
40				35					40					45					
		Tyr	Leu	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala	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	Cys		
		65				70					75					80			
45		Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Thr	Asn	Tyr	Gly	Thr	Ser	Ser		
					85					90					95				
		Ser	Asn	Tyr	Gly	Phe	Ala	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys		
				100						105					110				

RU 2754369 C2

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140
5 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
10 180 185 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215
15 <210> 333
<211> 448
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность
<220>
20 <221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
полипептид"
<400> 333
Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
25 1 5 10 15
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Asn Asn Tyr Ala
20 25 30
Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
35 40 45
30 Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
50 55 60
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met Thr
65 70 75 80
Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Gly Arg Asn Gly
35 85 90 95
Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125
40 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
45 165 170 175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

	195		200		205														
	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr			
	210							215					220						
	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser			
5	225					230					235					240			
	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg			
					245					250					255				
	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro			
				260						265				270					
10	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala			
	275							280				285							
	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val			
	290						295					300							
	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr			
15	305					310					315					320			
	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr			
					325					330					335				
	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu			
				340					345					350					
20	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys			
			355					360					365						
	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser			
	370						375					380							
	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp			
25	385					390					395					400			
	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser			
					405					410					415				
	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala			
				420					425					430					
30	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			
			435					440					445						
	<210> 334																		
	<211> 215																		
	<212> ПРТ																		
35	<213> Искусственная последовательность																		
	<220>																		
	<221> источник																		
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"																		
40	<400> 334																		
	Ala	Phe	Glu	Leu	Thr	Gln	Thr	Pro	Ser	Ser	Val	Glu	Ala	Ala	Val	Gly			
	1				5					10					15				
	Gly	Thr	Ile	Thr	Ile	Lys	Cys	Gln	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr			
				20					25					30					
45	Leu	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile			
		35						40					45						
	Tyr	Ser	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Ser	Ser	Arg	Phe	Lys	Gly			
	50						55						60						

RU 2754369 C2

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu Glu Cys
65 70 75 80
Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr
85 90 95
5 Ser Thr Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
10 130 135 140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175
15 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
180 185 190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
195 200 205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
20 210 215
<210> 335
<211> 451
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность
25 <220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
полипептид"
<400> 335
30 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asn Asn Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 35 40 45
Gly Ser Ile Ser Thr Gly Gly Leu Ala Phe Tyr Ala Asn Trp Ala Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80
40 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
Arg Asn Gly Gly Gly Ser Tyr Ile Phe Tyr Tyr Phe Asp Leu Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
45 115 120 125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
130 135 140
Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

RU 2754369 C2

	145		150		155		160									
	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
					165					170					175	
	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
5					180					185					190	
	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His
					195					200					205	
	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
					210					215					220	
10	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
					225						230				235	
	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
					245						250				255	
	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
15					260					265					270	
	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
					275					280					285	
	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
					290					295					300	
20	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
					305						310				315	
	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
					325						330				335	
	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
25					340					345					350	
	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser
					355					360					365	
	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu
					370					375					380	
30	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro
					385						390				395	
	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val
					405						410				415	
	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met
35					420					425					430	
	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser
					435					440					445	
	Pro	Gly	Lys													
					450											
40	<210>	336														
	<211>	215														
	<212>	ПРТ														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
45	<221>	источник														
	<223>	/примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"														
	<400>	336														

RU 2754369 C2

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 Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 5 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Ala 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 Cys
 10 65 70 75 80
 Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Tyr Asp Ile Gly Thr
 85 90 95
 Ser Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 15 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 20 145 150 155 160
 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 25 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 <210> 337
 30 <211> 444
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 35 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 полипептид"
 <400> 337
 Gln Ser Val Lys Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15
 40 Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr Ala
 20 25 30
 Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
 35 40 45
 Thr Ile Asn Ile Gly Gly Arg Val Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 45 50 55 60
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Ala Pro
 65 70 75 80
 Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Tyr

RU 2754369 C2

				85					90				95			
	Asn	Gly	Gly	Ser	Tyr	Asp	Ile	Trp	Gly	Pro	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val
				100					105				110			
	Ser	Leu	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser
5			115					120					125			
	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys
		130				135					140					
	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu
	145				150					155					160	
10	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu
				165					170						175	
	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr
			180					185						190		
	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val
15			195					200					205			
	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro
		210					215					220				
	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe
	225					230					235				240	
20	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val
				245						250					255	
	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe
			260						265					270		
	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro
25			275					280					285			
	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr
		290					295						300			
	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val
	305				310					315					320	
30	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala
				325						330					335	
	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg
			340						345					350		
	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly
35			355					360					365			
	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro
		370					375					380				
	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser
	385				390						395				400	
40	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln
				405						410					415	
	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His
			420						425					430		
	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys				
45			435					440								
	<210>	338														
	<211>	217														
	<212>	IIPT														

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 338

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Ala Ser Glu Pro Val Gly

1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Arg Val

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Asp Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Ala Pro Ser Arg Phe Lys Gly

50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys

65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser

85 90 95

Tyr Gly Ile Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys Arg Thr

100 105 110

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu

115 120 125

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro

130 135 140

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly

145 150 155 160

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr

165 170 175

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His

180 185 190

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val

195 200 205

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

<210> 339

<211> 447

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 339

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile

RU 2754369 C2

		35					40					45							
		Gly	Thr	Ile	Asn	Ile	Gly	Gly	Arg	Val	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Trp	Ala	Lys		
		50					55					60							
5		Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu		
	65						70					75					80		
	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala			
						85					90					95			
		Arg	Tyr	Tyr	Asn	Gly	Gly	Ser	Tyr	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu		
							100					105					110		
10		Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu		
						115					120					125			
	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys			
						130					135					140			
		Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser		
15							145					150					155		
	145						150					155					160		
	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser			
						165					170					175			
		Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser		
							180					185					190		
20		Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn		
						195					200					205			
	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His			
						210					215					220			
		Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val		
25							225					230					235		
	225						230					235					240		
	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr			
						245					250					255			
		Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu		
							260					265					270		
30		Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys		
						275					280					285			
	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser			
						290					295					300			
		Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys		
35							305					310					315		
	305						310					315					320		
	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile			
						325					330					335			
		Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro		
							340					345					350		
40		Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu		
						355					360					365			
	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn			
						370					375					380			
		Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser		
45							385					390					395		
	385						390					395					400		
	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg			
						405					410					415			
		Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu		

420 425 430
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 340
 5 <211> 217
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 10 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 полипептид"
 <400> 340
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 15 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ser Ile Tyr Arg Val
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 20 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Cys
 65 70 75 80
 Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Tyr Ala Asp Ser
 85 90 95
 25 Tyr Gly Ile Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr
 100 105 110
 Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
 115 120 125
 Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
 30 130 135 140
 Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 145 150 155 160
 Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
 165 170 175
 35 Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
 180 185 190
 Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
 195 200 205
 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 40 210 215
 <210> 341
 <211> 452
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 45 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 полипептид"

<400> 341

	Gln	Ser	Val	Glu	Glu	Ser	Gly	Gly	Arg	Leu	Val	Lys	Pro	Asp	Glu	Ser
	1				5					10					15	
	Leu	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Ser	Tyr	Ala
5				20					25					30		
	Met	Ile	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Glu	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly
			35					40					45			
	Thr	Ile	Ser	Thr	Gly	Gly	Ile	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Trp	Ala	Lys	Gly
		50					55					60				
10	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Ser	Thr	Thr	Val	Asp	Leu	Lys	Ile	Thr
	65					70					75				80	
	Ser	Pro	Thr	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Ala	Arg	Gly	Gly
					85					90					95	
	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Leu	Pro	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Leu	Trp
15				100					105					110		
	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro
			115					120					125			
	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr
		130					135					140				
20	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr
	145					150					155				160	
	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro
				165					170						175	
	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr
25				180					185					190		
	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn
		195						200					205			
	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser
		210					215					220				
30	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
	225					230					235				240	
	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
				245					250					255		
	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
35				260					265					270		
	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
		275						280					285			
	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr
		290					295					300				
40	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
	305					310					315				320	
	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro
				325					330					335		
	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln
45				340					345					350		
	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val
		355						360					365			
	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val

370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 5 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 10 Ser Pro Gly Lys
 450
 <210> 342
 <211> 219
 <212> ПРТ
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 полипептид"
 20 <400> 342
 Ala Ala Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn
 20 25 30
 25 Asn Asn Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val
 30 65 70 75 80
 Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Gly Cys Asp Asp
 85 90 95
 Asp Ala Asp Thr Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110
 35 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 40 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 45 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 343

<211> 455

<212> ПРТ

<213> Искусственная последовательность

5 <220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 343

10 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 15 35 40 45
 Gly Thr Ile Ser Thr Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 20 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Gly Tyr Ala Ala Ser Ser Ala Tyr Tyr Leu Pro Tyr Tyr Phe
 100 105 110
 Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
 25 115 120 125
 Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
 130 135 140
 Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
 145 150 155 160
 30 Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
 165 170 175
 Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190
 Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
 35 195 200 205
 Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
 210 215 220
 Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 225 230 235 240
 40 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 245 250 255
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 260 265 270
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 45 275 280 285
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 290 295 300
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

RU 2754369 C2

	305		310		315		320									
	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu
				325					330						335	
	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg
5				340					345						350	
	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys
				355					360						365	
	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp
				370					375						380	
10	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys
				385					390						395	400
	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser
					405					410					415	
	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser
15				420					425						430	
	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser
				435					440						445	
	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys									
				450					455							
20	<210>	344														
	<211>	219														
	<212>	ПРТ														
	<213>	Искусственная последовательность														
	<220>															
25	<221>	источник														
	<223>	/примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"														
	<400>	344														
	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
30	1			5					10					15		
	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Gln	Ser	Ser	Gln	Ser	Val	Tyr	Asn	Asn
				20					25					30		
	Asn	Asn	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Val	Pro	Lys	Leu
				35					40					45		
35	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe
				50					55					60		
	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu
				65					70					75		80
	Gln	Cys	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Leu	Gly	Gly	Cys	Asp	Asp
40					85					90					95	
	Asp	Ala	Asp	Thr	Phe	Ala	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
				100					105					110		
	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
				115					120					125		
45	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
				130					135					140		
	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
				145					150					155		160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190
5 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215
<210> 345
10 <211> 1350
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
<220>
<221> источник
15 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
полинуклеотид"
<400> 345
gaggtccaac tgggtggagag cgggtggaggt gttgtgcaac ctggccggtc cctgcgcttg 60
tcctgctccg catctggctt caccttcagc ggctatgggt tgtcttgggt gagacaggca 120
20 cctggaaaag gtcttgagtg ggttgcaatg attagtagtg gtggtagtta tacctactat 180
gcagacagtg tgaagggtag atttgcaata tcgcgagaca acgccaagaa cacattgttc 240
ctgcaaatgg acagcctgag acccgaagac accgggggtct atttttgtgc aagacatggg 300
gacgatcccc cctggttcgc ttattggggc caagggaccc cggtcaccgt ctctcagcc 360
tccaccaagg gcccatcgggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 420
25 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccgggtgac ggtgtcgtgg 480
aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtctcagga 540
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 600
atctgcaacg tgaatcaca gcccagcaac accaagggtg acaagaaagt tgagcccaaa 660
tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 720
30 tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 780
gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 840
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 900
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 960
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccc tcgagaaaac catctccaaa 1020
35 gccaaagggc agccccgaga accacagggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1080
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1140
gtggagtggtg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1200
gactccgacg gctccttctt cttatatcca aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1260
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1320
40 aagagcctct ccctgtctcc cgggaaatga 1350
<210> 346
<211> 654
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность
45 <220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
полинуклеотид"

	<400> 346	
	gacatccagc tgacccagag cccaagcagc ctgagcgcca gcgtaggtga cagagtgacc	60
	atcacctgta gtgtcagctc aagtataagt tccaacaact tgcactggta ccagcagaag	120
	ccaggtaagg ctccaaagcc atggatctac ggacatcca acctggcttc tgggtgtgcca	180
5	agcagattca gcggtagcgg tagcgggtacc gactacacct tcaccatcag cagcctccag	240
	ccagaggaca tcgccaccta ctactgccaa cagtggagta gttaccgta catgtacacg	300
	ttcggccaag ggaccaaggt ggaaatcaaa cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac	360
	ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat	420
	aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaagggtg ataacgccct ccaatcgggt	480
10	aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc	540
	accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc	600
	catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaaag agcttcaaca ggggagagtg ttaa	654
	<210> 347	
	<211> 1350	
15	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический	
20	полинуклеотид"	
	<400> 347	
	cagggtacaac tgcagcagtc tgggcctgag ctggagaagc ctggcgcttc agtgaagata	60
	tcttgcaagg ctcttggtta ctcatctact ggctacacca tgaactgggt gaagcagagc	120
	catggaaaga gccttgagtg gattggactt attactcctt acaatgggtg ttctagctac	180
25	aaccagaagt tcaggggcaa ggccacatta actgtagaca agtcatccag cacagcctac	240
	atggacctcc tcagtctgac atctgaagac tctgcagtct atttctgtgc aagggggggt	300
	tacgacggga ggggttttga ctactgggga tccgggaccc cggtcaccgt ctctcagcc	360
	tccaccaagg gcccatcggt ctccccctg gcacctcct ccaagagcac ctctgggggc	420
	acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg	480
30	aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtctcagga	540
	ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac	600
	atctgcaacg tgaatcacaa gccagcaac accaagggtg acaagaaagt tgagcccaaa	660
	tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg	720
	tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccc gaccctgag	780
35	gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac	840
	gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc	900
	acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag	960
	tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa	1020
	gccaaagggc agccccgaga accacagggtg tacaccctgc cccatccccg ggatgagctg	1080
40	accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc	1140
	gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg	1200
	gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag cagggtggcag	1260
	caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag	1320
	aagagcctct ccctgtctcc cgggaaatga	1350
45	<210> 348	
	<211> 642	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"

5 <400> 348

gacatcgagc	tactcagtc	tccagcaatc	atgtctgcat	ctccagggga	gaaggtcacc	60
atgacctgca	gtgccagctc	aagtgtaat	tacatgact	ggtaccagca	gaagtcaggc	120
acctcccca	aaagatggat	ttatgacaca	tccaaactgg	cttctggagt	cccaggtcgc	180
ttcagtggca	gtgggtcttg	aaactcttac	tctctcaca	tcagcagcgt	ggaggctgaa	240
gatgatgcaa	cttattactg	ccagcagtgg	agtaagcacc	ctctcacgtt	cggatccggg	300
accaaggtgg	aaatcaaacg	aactgtggct	gcaccatctg	tcttcatctt	cccgccatct	360
gatgagcagt	tgaatcttg	aactgcctct	gttgtgtgcc	tgctgaataa	cttctatccc	420
agagaggcca	aagtacagtg	gaaggtggat	aacgccctcc	aatcgggtaa	ctcccaggag	480
agtgtcacag	agcaggacag	caaggacagc	acctacagcc	tcagcagcac	cctgacgctg	540
agcaaagcag	actacgagaa	acacaaagtc	tacgcctgcg	aagtcaccca	tcagggcctg	600
agctcgcccc	tcacaaagag	cttcaacagg	ggagagtgtt	aa		642

<210> 349

<211> 1362

<212> ДНК

20 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"

25 <400> 349

cagtcggtgg	aggagtccgg	gggtcgcttg	gtcacgcctg	ggacaccct	gacactcacc	60
tgcaccgtct	ctggaatctc	cctcagtagc	gatgcaataa	gctgggtccg	ccaggctcca	120
gggaaggggg	tcgaatacat	cggaatcatt	aatggtgggt	gtaacacata	ctacgcgagc	180
tgggcgaaag	gccgattcac	catctccaaa	acctcgacca	cgggtgatct	gaaaatcacc	240
agtccgacaa	ccgaggacac	ggccacctat	ttctgtgcc	gaggcattca	acatggtggt	300
ggtaatagt	attattatta	ttacggcatg	gacctctggg	gccaggcac	cctggtcact	360
gtctcttcag	catccacca	gggcccatcg	gtcttcccc	tggcaccctc	ctccaagagc	420
acctctgggg	gcacagcggc	cctgggctgc	ctggtcaagg	actacttccc	cgaaccggtg	480
acggtgtcgt	ggaactcagg	cgccctgacc	agcggcgtgc	acaccttccc	ggctgtccta	540
cagtcctcag	gactctactc	cctcagcagc	gtggtgaccg	tgccctccag	cagcttgggc	600
acccagacct	acatctgcaa	cgtgaatcac	aagcccagca	acaccaaggt	ggacaagaaa	660
gttgagccca	aatcttgtga	caaaactcac	acatgcccac	cgtgcccagc	acctgaactc	720
ctgggggggac	cgtcagtcct	cctcttcccc	ccaaaaccca	aggacaccct	catgatctcc	780
cggacccctg	aggtcacatg	cgtggtgggt	gacgtgagcc	acgaagaccc	tgaggtaag	840
ttcaactggt	acgtggacgg	cgtggagggt	cataatgcca	agacaaagcc	gcgggaggag	900
cagtacaaca	gcacgtaccg	tgtggtcagc	gtcctcaccg	tcctgcacca	ggactggctg	960
aatggcaagg	agtacaagt	caaggtctcc	aacaaagccc	tcccagcccc	catcgagaaa	1020
accatctcca	aagccaaagg	gcagccccga	gaaccacagg	tgtacaccct	gcccccatcc	1080
cgggatgagc	tgaccaagaa	ccaggtcagc	ctgacctgcc	tggtaaaagg	cttctatccc	1140
agcgacatcg	ccgtggagt	ggagagcaat	gggcagccgg	agaacaacta	caagaccacg	1200
cctcccgtgc	tggactccga	cggctccttc	ttcttatatt	caaagctcac	cgtggacaag	1260
agcagggtgg	agcaggggaa	cgtcttctca	tgctccgtga	tgcagtaggc	tctgcacaac	1320
cactacacgc	agaagagcct	ctccctgtct	cccgggaaat	ga		1362

<210> 350
 <211> 660
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"
 <400> 350
 10 gaagtgttga tgacccagac tccatcctcc gtgtctgcag ctgtgggaga cacagtcacc 60
 atcaagtgcc aggccagtca gagcattagt agtgtcttgt cctggtatca gcagaaacca 120
 gggcagcctc ccaagctcct gatctatctg gcatccactc tggcatctgg ggtcccatcg 180
 cgggttcagcg gcagtagatc tgggacagag ttcactctca ccatcagcga cctggagtgt 240
 gacgatgctg ccacttacta ctgtcaaacc aattatggta ctagtagtag taattatggg 300
 15 tttgcttttcg gcggaggggac cgagggtggtc gtcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 360
 ttcactcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
 ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggg aggtggataa cgccctccaa 480
 tcgggtaact ccagggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 540
 agcagcacc ctcagctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa 600
 20 gtcacccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttga 660
 <210> 351
 <211> 1371
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность
 25 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"
 <400> 351
 30 gaagtccaac tgggtgaaaag cggggggagga ctgggtgcagc cggggcggatc cctccggctg 60
 tcatgtgctg catcggaat ttccctctcc tccgacgcga ttagctgggt cagacaggcc 120
 cccggaaggg ggctggagta catcggtatc atcaacggcg gcggaacac ctactacgcc 180
 tcctggggcca agggccgctt caccatctcg cggcataatt ccaagaacac tctgtacttg 240
 caaatgaact ccctgagggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcgcg cggcatccag 300
 35 cacggtgggtg gaaacagcga ctactactac tatgggatgg atctgtgggg ccagggaact 360
 cttgtgaccg tgtcgtcagc atccaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc 420
 tccaagagca cctctggggg cacagcggcc ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc 480
 gaaccggtga cgggtgctg gaactcaggc gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc 540
 gctgtcctac agtcctcagg actctactcc ctacgcagcg tggtgaccgt gccctccagc 600
 40 agcttgggca ccagaccta catctgcaac gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg 660
 gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca 720
 cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc 780
 atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc gtgggtgggtg acgtgagcca cgaagaccct 840
 gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc gtggagggtgc ataatgcaa gacaaagccg 900
 45 cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag 960
 gactggctga atggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaagccct ccagccccc 1020
 atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg 1080
 ccccatccc gggatgagct gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc 1140

	ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac	1200
	aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac ggctccttct tcttatattc aaagctcacc	1260
	gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct	1320
	ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc tccctgtctc ccgggaaatg a	1371
5	<210> 352	
	<211> 660	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
10	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"	
	<400> 352	
	gacattcaga tgacccagtc cccaagctcg ctgtccgcct ccgtgggcca ccgctgacc	60
15	atcacgtgcc aggcgtccca gtcaattagc agcgtgctct cctggtacca acagaagccg	120
	gggaaagcac ccaagctgct gatctacttg gcctccactc tggcctcggg agtgccttca	180
	cggttctccg gatcgggatac ttgtactgat ttaccctca ccatctcgag ccttcagtgc	240
	gaggacatcg ctacttacta ttgtcaaacc aactacgga cctccagctc caactacggc	300
	tttgccttcg gtggcgggac caaggctcga atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc	360
20	ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg	420
	ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggg aggtggataa cgccctccaa	480
	tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc	540
	agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa	600
	gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttga	660
25	<210> 353	
	<211> 1347	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
30	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"	
	<400> 353	
	cagtcggtgg aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacaccctc gacactcacc	60
35	tgcacagtct ctggattctc cctcaataac tatgcaatga gctgggtccg ccaggctcca	120
	gggaaggggc tggaatggat cggatccatt agtactggtg gtctcgcatc ctacgcgaac	180
	tgggcaaaaag gccgattcac catctccaga acctcgacca cggtggtatc gaaaatgacc	240
	agtctgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtggca gaaatgggtg ttgtagttat	300
	atcttctatt atcttgactt gtggggccaa ggcaccctcg tcaactgtctc ttacagcatc	360
40	accaagggcc catcggctct cccctggca cctcctcca agagcacctc tgggggcaca	420
	gcggccctgg gctgcctggc caaggactac ttccccgaac cggtgacggg gtcgtggaac	480
	tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttccgggctg tcctacagtc ctcaggactc	540
	tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc	600
	tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agaaagtga gcccaaactc	660
45	tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	720
	gtcttctctt tcccccaaaa acccaaggac accctcatga tctccgggac ccctgaggctc	780
	acatgcgtgg ttgtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	840
	gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	900

	taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtag	960
	aagtgcgaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc	1020
	aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catccccgga tgagctgacc	1080
	aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg	1140
5	gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	1200
	tccgacggct ccttcttctt atattcaaaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	1260
	gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cagcagaag	1320
	agcctctccc tgtctcccgg gaaatga	1347
	<210> 354	
10	<211> 648	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
15	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"	
	<400> 354	
	gcattcgaat tgaccsagac tccatcctcc gtggaggcag ctgtgggagg cacaatcacc	60
	atcaagtgcc aggccagtca gagcattagt agttacttat cctgggtatca gcagaaacca	120
20	gggcagcctc ccaagctcct gatctattct gcatccactc tggcatctgg ggtctcatcg	180
	cggttcaaaag gcagtggatc tgggacagag tacactctca ccatcagcga cctggagtgt	240
	gccgatgctg ccacttactt ctgtcaaagc tattatgata ttggtactag tactttcggc	300
	ggagggaccg aggtggtcgt caaacgaact gtggctgcac catctgtctt catcttcccg	360
	ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc	420
25	tatcccagag aggccaaagt acagtggaa gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc	480
	caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcacctg	540
	acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag	600
	ggcctgagct cggccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgttga	648
	<210> 355	
30	<211> 1356	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
	<220>	
	<221> источник	
35	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"	
	<400> 355	
	gaagtgcagc tgggtggaatc tggcggcgga ctggtgcagc ctggcggatc tctgagactg	60
	tcttgtgccg cctccggctt ctccctgaac aactacgcca tgtcctgggt gcgacaggcc	120
40	cctggcaaag gcctggaatg gatcggctcc atcagcacag gcggcctggc cttctacgcc	180
	aattgggcca agggccggtt caccatcagc cgggacaact ccaagaacac cctgtacctc	240
	cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgtgccag aaacggcgga	300
	ggctcctaca tcttctacta cttcgacctg tggggccagg gcaccctcgt gacagtgtca	360
	tctgcatcca ccaaggcccc atcgggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct	420
45	gggggcacag cggccctggg ctgcctgggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacgggtg	480
	tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc	540
	tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcaccag	600
	acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttag	660

	cccaaattctt	gtgacaaaac	tcacacatgc	ccaccgtgcc	cagcacctga	actcctgggg	720
	ggaccgtcag	tcttcctctt	cccccaaaa	cccaaggaca	ccctcatgat	ctcccggacc	780
	cctgaggtca	catgcgtggt	ggtggacgtg	agccacgaag	accctgaggt	caagttcaac	840
	tggtagctgg	acggcgtgga	ggtgcataat	gccaaagacaa	agccgcggga	ggagcagtac	900
5	aacagcacgt	accgtgtggt	cagcgtcctc	accgtcctgc	accaggactg	gctgaatggc	960
	aaggagtaca	agtgcaaggt	ctccaacaaa	gccctcccag	cccccatcga	gaaaaccatc	1020
	tccaaagcca	aagggcagcc	ccgagaacca	caggtgtaca	ccctgcccc	atcccgggat	1080
	gagctgacca	agaaccaggt	cagcctgacc	tgcttggtca	aaggcttcta	tcccagcgac	1140
	atcgccgtgg	agtgggagag	caatgggcag	ccggagaaca	actacaagac	cagcctccc	1200
10	gtgctggact	ccgacggctc	cttcttctta	tattcaaaagc	tcaccgtgga	caagagcagg	1260
	tggcagcagg	ggaacgtctt	ctcatgctcc	gtgatgcatg	aggctctgca	caaccactac	1320
	acgcagaaga	gcctctccct	gtctcccggg	aaatga			1356
	<210> 356						
	<211> 648						
15	<212> ДНК						
	<213> Искусственная последовательность						
	<220>						
	<221> источник						
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический						
20	полинуклеотид"						
	<400> 356						
	gatattcaga	tgaccagtc	cccctccagc	ctgtccgctt	ctgtgggcga	cagagtgacc	60
	atcacctgtc	aggcctccca	gtccatctcc	tcctacctgt	cctggatatca	gcagaagccc	120
	ggcaaggccc	ccaagctgct	gatctactct	gcctccacac	tggcctccgg	cgtgccctct	180
25	agattctccg	gctctggctc	tggcaccgac	tttaccctga	ccatcagctc	cctccagtgc	240
	gaggatgccg	ccacctacta	ctgccagtcc	tactacgaca	tcggcacctc	caccttcggc	300
	ggaggcacca	aggtggaaat	caaacgaact	gtggctgcac	catctgtctt	catcttcccg	360
	ccatctgatg	agcagttgaa	atctggaaact	gcctctgttg	tgtgcctgct	gaataacttc	420
	tatcccagag	aggccaaagt	acagtggaa	gtggataacg	ccctccaatc	gggtaactcc	480
30	caggagagtg	tcacagagca	ggacagcaag	gacagcacct	acagcctcag	cagcaccttg	540
	acgctgagca	aagcagacta	cgagaacac	aaagtctacg	cctgcgaagt	cacccatcag	600
	ggcctgagct	cgcccgtcac	aaagagcttc	aacaggggag	agtgttga		648
	<210> 357						
	<211> 1335						
35	<212> ДНК						
	<213> Искусственная последовательность						
	<220>						
	<221> источник						
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический						
40	полинуклеотид"						
	<400> 357						
	cagtcagtga	aggagtccgg	gggtcgcctg	gtcacgcctg	ggacaccctc	gacactcacc	60
	tgcacagtct	ctggaatcga	cctcagtagc	tatgcaatgg	gctggttccg	ccaggctcca	120
	gggaaggggc	tggaatacat	cggaaccatt	aatattggtg	gtcgcgtata	ttacgcgagc	180
45	tgggcaaaaag	gccgattcac	catctccaga	acctcgacca	cggtggtatc	gaaagcgccc	240
	agtctgacag	ccgaggacac	ggccacctat	ttctgtgcca	gatattataa	tgggtgtagt	300
	tatgacatct	ggggcccagg	cacctgggtc	accgtctctt	tagcatccac	caagggccca	360
	tcgggtcttcc	ccctggcacc	ctcctccaag	agcacctctg	ggggcacagc	ggcctggggc	420

	tgccctggtca	aggactactt	ccccgaaccg	gtgacggtgt	cgtggaactc	aggcgccctg	480
	accagcggcg	tgcacacctt	cccggctgtc	ctacagtcct	caggactcta	ctccctcagc	540
	agcgtggtga	ccgtgccctc	cagcagcttg	ggcaccacga	cctacatctg	caacgtgaat	600
	cacaagccca	gcaacaccaa	ggtggacaag	aaagttgagc	ccaaatcttg	tgacaaaact	660
5	cacacatgcc	caccgtgccc	agcacctgaa	ctcctggggg	gaccgtcagt	cttcctcttc	720
	cccccaaaac	ccaaggacac	cctcatgata	tcccggaccc	ctgaggtcac	atgcgtgggtg	780
	gtggacgtga	gccacgaaga	ccctgagggtc	aagttcaact	ggtacgtgga	cggcgtggag	840
	gtgcataatg	ccaagacaaa	gccgcgggag	gagcagtaca	acagcacgta	ccgtgtgggtc	900
	agcgtcctca	ccgtcctgca	ccaggactgg	ctgaatggca	aggagtacaa	gtgcaagggtc	960
10	tccaacaaaag	ccctcccagc	ccccatcgag	aaaaccatct	ccaaagccaa	agggcagccc	1020
	cgagaaccac	aggtgtacac	cctgccccca	tcccgggatg	agctgaccaa	gaaccagggtc	1080
	agcctgacct	gcctggtcaa	aggcttctat	cccagcgaca	tcgccgtgga	gtgggagagc	1140
	aatgggcagc	cggagaacaa	ctacaagacc	acgcctcccg	tgctggactc	cgacgggtcc	1200
	ttcttcttat	attcaaagct	caccgtggac	aagagcaggt	ggcagcaggg	gaacgtcttc	1260
15	tcatgctccg	tgatgcatga	ggctctgcac	aaccactaca	cgcagaagag	cctctccctg	1320
	tctcccggga	aatga					1335
	<210>	358					
	<211>	654					
	<212>	ДНК					
20	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
	<221>	источник					
	<223>	/примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"					
25	<400>	358					
	gatgttgtga	tgacccagac	tccagcctcc	gcgtctgaac	ctgtgggagg	cacagtcacc	60
	atcaagtgcc	aggccagtga	gagcatctat	cgcgtatttg	cctggatatca	gcagaaacca	120
	gggcagcctc	ccaagctcct	gatctatgat	acatccactc	tggcatctgg	ggccccatcg	180
	cggttcaaaag	gcagtggata	tgggacagag	ttcactctca	ccatcagcgg	cgtgcagtgt	240
30	gaagatgctg	ccacttacta	ctgtcaaggc	ggttattatg	ctgatagtta	tggatttgct	300
	ttcggcggag	ggaccgaggt	ggtggtcaaa	cgaactgtgg	ctgcaccatc	tgtcttcac	360
	ttcccgccat	ctgatgagca	gttgaaatct	ggaactgcct	ctgttggtgtg	cctgctgaat	420
	aacttctatc	ccagagaggg	caaagtacag	tgggaagggtg	ataacgccct	ccaatcgggt	480
	aactcccagg	agagtgtcac	agagcaggac	agcaaggaca	gcacctacag	cctcagcagc	540
35	accctgacgc	tgagcaaaag	agactacgag	aaacacaaaag	tctacgcctg	cgaagtcacc	600
	catcagggcc	tgagctcgcc	cgtcacaaaag	agcttcaaca	ggggagagtg	ttga	654
	<210>	359					
	<211>	1344					
	<212>	ДНК					
40	<213>	Искусственная последовательность					
	<220>						
	<221>	источник					
	<223>	/примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"					
45	<400>	359					
	caggtgcagc	tggtggaatc	tggcggagga	ctggtgcagc	ctggcggctc	tctgagactg	60
	tcctgttccg	cctccggaat	cgacctgtcc	tcctacgcta	tgggctgggt	gcgacaggct	120
	cctggcaagg	gcctggagta	catcggcacc	atcaacatcg	gcggcagagt	gtactacgcc	180

	tcctgggcca agggccggtt caccatctcc agagacaact ccaagaacac cctgtacctc	240
	cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccgt gtactacaac	300
	ggcggctcct acgatatctg gggccagggc aactcgtga ccgtgtcctc tgcattccacc	360
	aagggcccat cgggtcttccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg	420
5	gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca	480
	ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtccctc aggactctac	540
	tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc	600
	aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt	660
	gacaaaactc acacatgccc accgtgccc gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc	720
10	ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca	780
	tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac	840
	ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac	900
	cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag	960
	tgcaagggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa	1020
15	gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag	1080
	aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag	1140
	tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc	1200
	gacggctcct tcttcttata ttcaaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg	1260
	aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc	1320
20	ctctccctgt ctcccgggaa atga	1344
	<210> 360	
	<211> 654	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
25	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"	
	<400> 360	
30	gatatccaga tgaccagtc cccctccacc ctgtctgcct ctgtgggcca cagagtgacc	60
	atcacctgtc aggcctccga gtccatctac cgggtgctgg cctggatatca gcagaagcct	120
	ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac accagcacac tggcctccgg cgtgccctct	180
	agattctccg gctctggctc tggcaccgag tttaccctga ccatctccag cctccagtgc	240
	gacgacgcc ccacctacta ttgtcagggc ggctactacg ccgactccta cggaatcgct	300
35	ttcggcggag gcaccaaggt ggaaatcaaa cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc	360
	ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat	420
	aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaagggtg ataacgccct ccaatcgggt	480
	aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc	540
	accctgacgc tgagcaaaag agactacgag aaacacaaaag tctacgcctg cgaagtcacc	600
40	catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaaag agcttcaaca ggggagagtg ttga	654
	<210> 361	
	<211> 1359	
	<212> ДНК	
	<213> Искусственная последовательность	
45	<220>	
	<221> источник	
	<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"	

<400> 361

	cagtcggtgg	aggagtcagg	cggtcgccctg	gtaaagcctg	acgaatccct	gacactcacc	60
	tgcacagcct	ctggattctc	cctcagtagt	tatgcaatga	tctgggtccg	ccaggctcca	120
	ggggaggggg	tgggaatggat	cggaaccatt	agtactgggtg	gtatcacata	ctacgcgagc	180
5	tgggcgaaaag	gccgattcac	catctccaaa	acctcgacca	cggtggatct	gaaaatcacc	240
	agtccgacaa	ccgaggacac	ggccacctat	ttctgtgcc	gagggggata	tgctgctagt	300
	agtgtttatt	atctcccgta	ctactttgac	ttgtggggcc	aaggaccct	ggtcaccgtc	360
	tcctcagcat	ccaccaagg	cccacggtc	ttccccctgg	cacctcctc	caagagcacc	420
	tctgggggca	cagcggccct	gggctgcctg	gtcaaggact	acttccccga	accggtgacg	480
10	gtgtcgtgga	actcaggcgc	cctgaccagc	ggcgtgcaca	ccttcccggc	tgtcctacag	540
	tcctcaggac	tctactccct	cagcagcgtg	gtgaccgtgc	cctccagcag	cttgggcacc	600
	cagacctaca	tctgcaacgt	gaatcacaa	cccagcaaca	ccaaggtgga	caagaaagtt	660
	gagcccaaat	cttgtgacaa	aactcacaca	tgcccaccgt	gccagcacc	tgaactcctg	720
	gggggaccgt	cagtcttcct	cttcccccca	aaaccaagg	acacctcat	gatctcccg	780
15	acccttgagg	tcacatgcgt	ggtggtggac	gtgagccacg	aagaccctga	ggtcaagttc	840
	aactggtacg	tggacggcgt	ggaggtgcat	aatgccaaga	caaagcccg	ggaggagcag	900
	tacaacagca	cgtaccgtgt	ggtcagcgtc	ctcaccgtcc	tgcaccagga	ctggctgaat	960
	ggcaaggagt	acaagtgcaa	ggtctccaac	aaagccctcc	cagcccccat	cgagaaaacc	1020
	atctccaaa	ccaaagggca	gccccgagaa	ccacaggtgt	acacctgcc	cccattcccg	1080
20	gatgagctga	ccaagaacca	ggtcagcctg	acctgcctgg	tcaaaggctt	ctatcccagc	1140
	gacatcgccg	tggagtggga	gagcaatggg	cagccggaga	acaactacaa	gaccacgcct	1200
	cccgtgctgg	actccgacgg	ctccttcttc	ttatatcaa	agctcaccgt	ggacaagagc	1260
	aggtggcagc	aggggaacgt	cttctcatgc	tccgtgatgc	atgaggctct	gcacaaccac	1320
	tacacgcaga	agagcctctc	cctgtctccc	gggaaatga			1359

25 <210> 362

<211> 660

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

30 <221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 362

	gcagccgtgc	tgaccagac	accatcacc	gtgtctgcag	ctgtgggagg	cacagtcacc	60
35	atcagttgcc	agtccagtca	gagtgtttat	aataataaca	acttagcctg	gtttcagcag	120
	aaaccgggg	agcctccaa	gcttctgatc	tatctggcat	ccactctggc	atctggggtc	180
	ccatcacggg	tcagcggcag	tggatctggg	acacagttca	ctctaccat	cagcggcgtg	240
	cagtgtgacg	atgctgccac	ttattactgt	ctaggtgggt	gtgatgatga	tgctgatact	300
	tttgctttcg	gcgaggggac	tgaggtgggtg	gtcaaacgaa	ctgtggctgc	accatctgtc	360
40	ttcatcttcc	cgccatctga	tgagcagttg	aaatctggaa	ctgcctctgt	tgtgtgcctg	420
	ctgaataact	tctatcccag	agaggccaaa	gtacagtggg	aggtggataa	cgccctccaa	480
	tcgggtaact	cccaggagag	tgtcacagag	caggacagca	aggacagcac	ctacagcctc	540
	agcagcacc	tgacgtgag	caaagcagac	tacgagaaac	acaaagtcta	cgctgcgaa	600
	gtcaccatc	agggcctgag	ctcgcccgtc	acaaagagct	tcaacagggg	agagtgttga	660

45 <210> 363

<211> 1368

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"

5 <400> 363

gaagtgcagc	tgggtggaatc	tggcggcgga	ctgggtgcagc	ctggcggatc	tctgagactg	60
tcttgtgccg	cctccggctt	ctccctgtcc	tcctacgcta	tgatctgggt	gcgacaggcc	120
cctggcaagg	gcctggaatg	gatcggcacc	atctctaccg	gcggaattac	ctactacgcc	180
tcctgggcca	agggccggtt	caccatctcc	agagacaact	ccaagaacac	cctgtacctc	240
10 cagatgaact	ccctgcgggc	cgaggacacc	gccgtgtact	attgtgctag	aggcggctac	300
gccgccagct	ccgcttacta	cctgccctac	tacttcgacc	tgtggggcca	gggcaccctc	360
gtgacagtgt	catctgcata	caccaagggc	ccatcggtct	tccccctggc	accctcctcc	420
aagagcacct	ctggggggcac	agcggccctg	ggctgcctgg	tcaaggacta	cttccccgaa	480
ccggtgacgg	tgtcgtgga	ctcaggcgcc	ctgaccagcg	gcgtgcacac	cttccccggt	540
15 gtccctacagt	cctcaggact	ctactccctc	agcagcgtgg	tgaccgtgcc	ctccagcagc	600
ttgggcaccc	agacctacat	ctgcaacgtg	aatcacaagc	ccagcaacac	caaggtggac	660
aagaaagttg	agcccaaata	ttgtgacaaa	actcacacat	gccaccgtg	cccagcacct	720
gaactcctgg	ggggaccgtc	agtcttcctc	ttcccccaa	aaccaagga	caccctcatg	780
atctcccggg	cccctgaggt	cacatgcgtg	gtggtggacg	tgagccacga	agaccctgag	840
20 gtcaagttca	actggtacgt	ggacggcgtg	gaggtgcata	atgccaagac	aaagccgcgg	900
gaggagcagt	acaacagcac	gtaccgtgtg	gtcagcgtcc	tcaccgtcct	gcaccaggac	960
tggctgaatg	gcaaggagta	caagtgcagg	gtctccaaca	aagccctccc	agccccatc	1020
gagaaaacca	tctccaaagc	caaagggcag	ccccgagaac	cacaggtgta	caccctgccc	1080
ccatcccggg	atgagctgac	caagaaccag	gtcagcctga	cctgcctggg	caaaggcttc	1140
25 tatcccagcg	acatcgccgt	ggagtgggag	agcaatgggc	agccggagaa	caactacaag	1200
accacgcctc	ccgtgctgga	ctccgacggc	tccttcttct	tatatcctaa	gtcaccgtg	1260
gacaagagca	ggtggcagca	ggggaacgtc	ttctcatgct	ccgtgatgca	tgaggctctg	1320
cacaaccact	acacgcagaa	gagcctctcc	ctgtctcccg	ggaaatga		1368

<210> 364

30 <211> 660

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

35 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полинуклеотид"

<400> 364

gatattcaga	tgaccacagtc	cccctccagc	ctgtccgctt	ctgtgggcca	cagagtgacc	60
atcacctgtc	agtcctccca	gtccgtgtat	aacaacaaca	acctggcctg	gtatcagcag	120
40 aaacccggca	aggtgccccaa	gctgctgatc	tacctggcct	ccacactggc	ctctggcgtg	180
ccctctagat	tctccggctc	tggctctggc	accgacttta	ccctgaccat	cagctccctc	240
cagtgcgagg	atgccggcac	ctactattgc	ctgggcggct	gcgacgacga	cgccgatacc	300
tttgcttttg	gcggaggcac	caaggtggaa	atcaaacgaa	ctgtggctgc	accatctgtc	360
ttcatcttcc	cgccatctga	tgagcagttg	aaatctggaa	ctgcctctgt	tgtgtgcctg	420
45 ctgaataact	tctatcccag	agaggccaaa	gtacagtggg	aggtggataa	cgccctccaa	480
tcgggtaact	cccaggagag	tgtcacagag	caggacagca	aggacagcac	ctacagcctc	540
agcagcacc	tgacgtgag	caaagcagac	tacgagaaac	acaaagtcta	cgctgcgaa	600
gtcaccatc	agggcctgag	ctcgcccgctc	acaaagagct	tcaacagggg	agagtgttga	660

<210> 365
 <211> 4
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 5 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 365
 10 Ala His Lys Asp
 1
 <210> 366
 <211> 13
 <212> ПРТ
 15 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 20 <400> 366
 Asn Thr Ser Gln Glu Ala His Lys Asp Val Ser Tyr Leu
 1 5 10
 <210> 367
 <211> 4
 25 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 30 пептид"
 <400> 367
 Gly Phe Leu Gly
 1
 <210> 368
 35 <211> 4
 <212> ПРТ
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 40 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический
 пептид"
 <400> 368
 Ala Leu Ala Leu
 1
 45

(57) Формула изобретения

1. Конъюгат антитело-лекарственное средство Формулы (I) для лечения рака, который экспрессирует рецептор фолиевой кислоты альфа:

$Ab-(L-D)_p, (I)$

в которой Ab представляет собой интернализирующееся антитело к рецептору фолиевой кислоты альфа или его интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент, содержащие три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR),
 5 содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 2 (HCDR1), SEQ ID NO: 3 (HCDR2) и SEQ ID NO: 4 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 7 (LCDR1), SEQ ID NO: 8 (LCDR2) и SEQ ID NO: 9 (LCDR3), как определено системой нумерации Кабата; или три определяющие комплементарность области тяжелой цепи
 10 (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 (HCDR1), SEQ ID NO: 14 (HCDR2) и SEQ ID NO: 15 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16 (LCDR1), SEQ ID NO: 17 (LCDR2) и SEQ ID NO: 18 (LCDR3), как определено системой нумерации IMGT;

15 D представляет собой эрибулин;

L представляет собой расщепляемый линкер, содержащий группу присоединения антитела, спейсерную единицу и расщепляемую единицу, где группа присоединения антитела присоединена к Ab, и расщепляемая единица прямо или опосредованно присоединена к D; а также

20 p представляет собой целое число от 1 до 8.

2. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 1, отличающийся тем, что p равно 3 или 4.

3. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 1 или 2, где группа присоединения антитела прямо или опосредованно присоединена к спейсерной единице.

25 4. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-3, где спейсерная единица прямо или опосредованно присоединена к расщепляемой единице.

5. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что расщепляемая единица расположена так, что никакая часть линкера, или антитела, или антигенсвязывающего фрагмента не остается связанной с эрибулином
 30 после расщепления.

6. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что расщепляемая единица содержит расщепляемый пептидный фрагмент.

7. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что расщепляемый пептидный фрагмент или расщепляемая единица содержит
 35 аминокислотную единицу.

8. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 7, отличающийся тем, что аминокислотная единица содержит валин-цитруллин (Val-Cit).

9. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что спейсерная единица содержит полиэтиленгликолевый (ПЭГ) фрагмент.

40 10. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 9, отличающийся тем, что ПЭГ-фрагмент содержит $-(P\ddot{E}G)_m-$ и m представляет собой целое число от 1 до 10

11. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 10, отличающийся тем, что m равно 2.

45 12. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-11, отличающийся тем, что спейсерная единица прикрепляется к антителу или антигенсвязывающему фрагменту через группу присоединения к антителу.

13. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 12, где группа присоединения антитела содержит малеимидный (Mal) фрагмент (Mal-спейсерная единица).

14. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 13, отличающийся тем, что Mal-спейсерная единица соединена с антителом или антигенсвязывающим фрагментом через остаток цистеина на антителе или антигенсвязывающем фрагменте.

15. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 13 или 14, отличающийся тем, что расщепляемый линкер содержит Mal-спейсерную единицу и расщепляемый пептидный фрагмент.

16. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 15, отличающийся тем, что расщепляемый пептидный фрагмент содержит Val-Cit.

17. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 13-16, отличающийся тем, что Mal-спейсерная единица прикрепляет антитело или антигенсвязывающий фрагмент к расщепляемой единице в линкере.

18. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 17, отличающийся тем, что расщепляемая единица в линкере содержит расщепляемый пептидный фрагмент.

19. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 18, отличающийся тем, что расщепляемый пептидный фрагмент содержит Val-Cit.

20. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 17-19, отличающийся тем, что расщепляемый линкер содержит Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit.

21. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-20, отличающийся тем, что расщепляемая единица в линкере соединена с эрибулином прямо или опосредованно через необязательную дополнительную спейсерную единицу.

22. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 21, отличающийся тем, что указанная дополнительная спейсерная единица содержит п-аминобензилоксикарбонил (pAB).

23. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 21 или 22, отличающийся тем, что расщепляемая единица в линкере содержит расщепляемый пептидный фрагмент.

24. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 23, отличающийся тем, что расщепляемый пептидный фрагмент содержит Val-Cit.

25. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 21-24, отличающийся тем, что расщепляемый линкер содержит Val-Cit-pAB.

26. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 21-25, отличающийся тем, что расщепляемый линкер содержит Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB.

27. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 21-26, отличающийся тем, что расщепляемый линкер ковалентно присоединяется к эрибулину через амин C-35.

28. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-27, отличающийся тем, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 23, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 24.

29. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-28, отличающийся тем, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит константный домен тяжелой цепи IgG1 человека и константный домен легкой цепи Ig каппа человека.

30. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 28 или 29, отличающийся тем, что *p* представляет собой 3 или 4.

31. Конъюгат антитело-лекарственное средство Формулы (I) для лечения рака, который экспрессирует рецептор фолиевой кислоты альфа:



в которой Ab представляет собой интернализирующееся антитело к рецептору фолиевой кислоты альфа или его интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент, содержащий три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 2 (HCDR1), SEQ ID NO: 3 (HCDR2) и SEQ ID NO: 4 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 7 (LCDR1), SEQ ID NO: 8 (LCDR2) и SEQ ID NO: 9 (LCDR3), как определено системой нумерации Кабата; или три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 13 (HCDR1), SEQ ID NO: 14 (HCDR2) и SEQ ID NO: 15 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности из SEQ ID NO: 16 (LCDR1), SEQ ID NO: 17 (LCDR2) и SEQ ID NO: 18 (LCDR3), как определено системой нумерации IMGT;

D представляет собой эрибулин;

L представляет собой расщепляемый линкер, содержащий Mal-(ПЭГ)₂-Val-Cit-pAB, где Mal присоединен к Ab, и pAb присоединен к D; и

p представляет собой целое число от 1 до 8.

32. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 31, отличающийся тем, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 23, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 24.

33. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 31 или 32, отличающийся тем, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит константный домен тяжелой цепи IgG1 человека и константный домен легкой цепи Ig каппа человека.

34. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 31-33, отличающийся тем, что *p* представляет собой 3 или 4.

35. Композиция для лечения рака, который экспрессирует рецептор фолиевой кислоты альфа, отличающаяся тем, что композиция содержит множественные копии конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-34, и тем, что среднее *p* конъюгатов антитело-лекарственное средство в указанной композиции составляет от около 3,2 до около 4,4.

36. Способ лечения пациента, имеющего рак или имеющего риск возникновения рака, который экспрессирует рецептор фолиевой кислоты альфа, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-34 или композиции по п. 35.

37. Способ по п. 36, согласно которому рак представляет собой рак желудка, серозный рак яичников, светлоклеточный рак яичника, немелкоклеточный рак легкого, колоректальный рак, трижды негативный рак молочной железы, рак эндометрия, карциноид легких, остеосаркому, рак мочевого пузыря или карциному уротелиальных клеток.

38. Способ снижения или ингибирования роста опухоли, которая экспрессирует рецептор фолиевой кислоты альфа, включающий введение терапевтически эффективного количества конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-34 или композиции по п. 35.

39. Способ по п. 38, согласно которому указанная опухоль представляет собой рак желудка, серозный рак яичников, светлоклеточный рак яичника, немелкоклеточный рак легкого, колоректальный рак, трижды негативный рак молочной железы, рак

эндометрия, карциноид легких, остеосаркому, рак мочевого пузыря или карциному уротелиальных клеток.

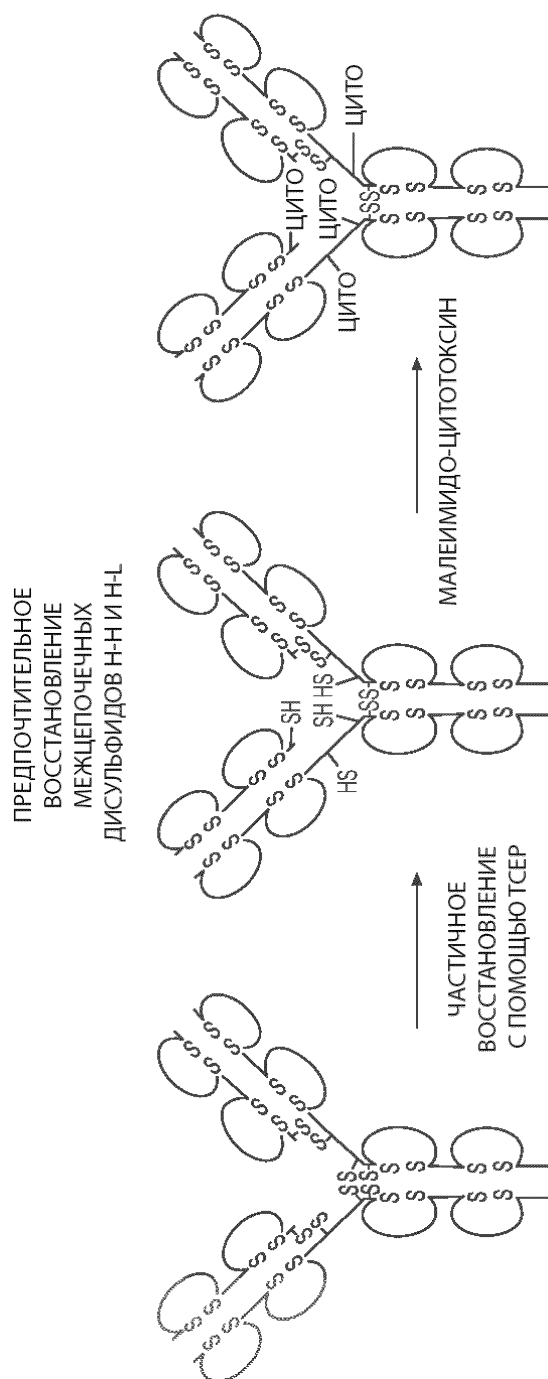
40. Применение конъюгата антитело-лекарственное средство по п. 1-34 или композиции по п. 35 в лечении рака, который экспрессирует рецептор фолиевой кислоты альфа.

41. Применение по п. 40, отличающееся тем, что рак представляет собой рак желудка, серозный рак яичников, светлоклеточный рак яичника, немелкоклеточный рак легкого, колоректальный рак, трижды негативный рак молочной железы, рак эндометрия, карциноид легких, остеосаркому, рак мочевого пузыря или карциному уротелиальных клеток.

42. Применение конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-34 или композиции по п. 35 в способе изготовления медицинского препарата для лечения рака, который экспрессирует рецептор фолиевой кислоты альфа.

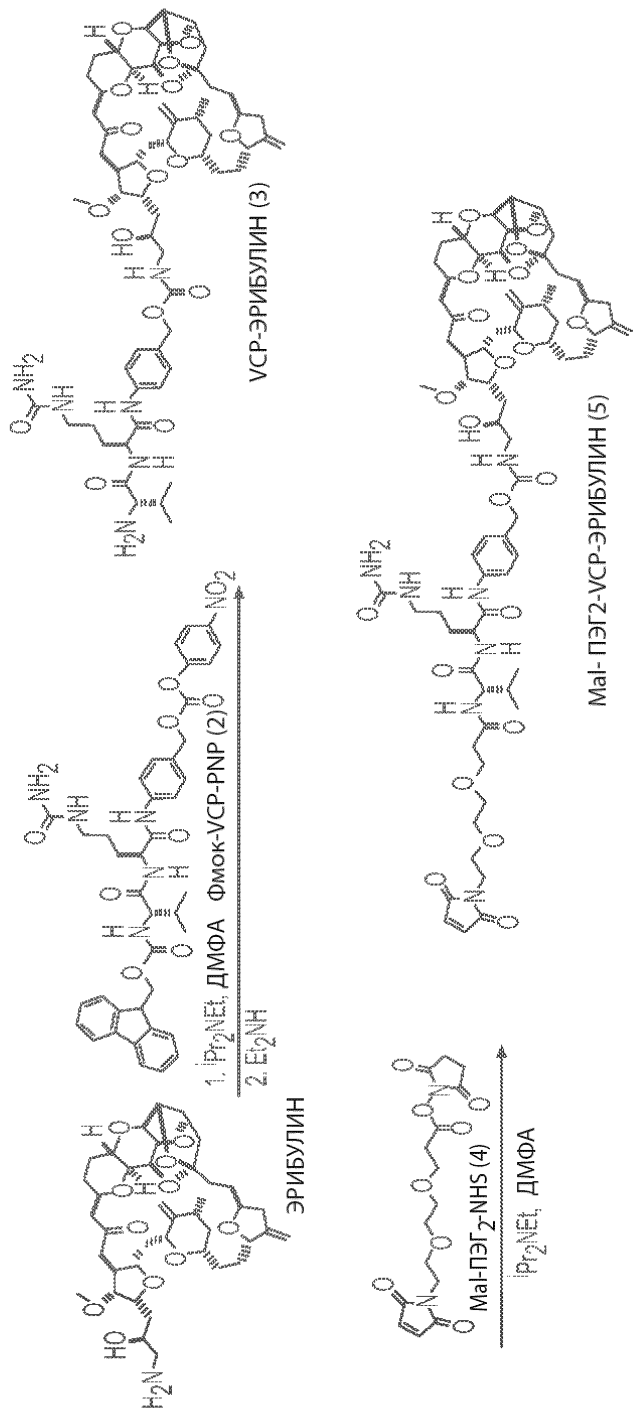
43. Применение по п. 42, отличающееся тем, что рак представляет собой рак желудка, серозный рак яичников, светлоклеточный рак яичника, немелкоклеточный рак легкого, колоректальный рак, трижды негативный рак молочной железы, рак эндометрия, карциноид легких, остеосаркому, рак мочевого пузыря или карциному уротелиальных клеток.

44. Фармацевтическая композиция для лечения рака, который экспрессирует рецептор фолиевой кислоты альфа, содержащая конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-34 или композицию по п. 35 и фармацевтически приемлемый носитель.



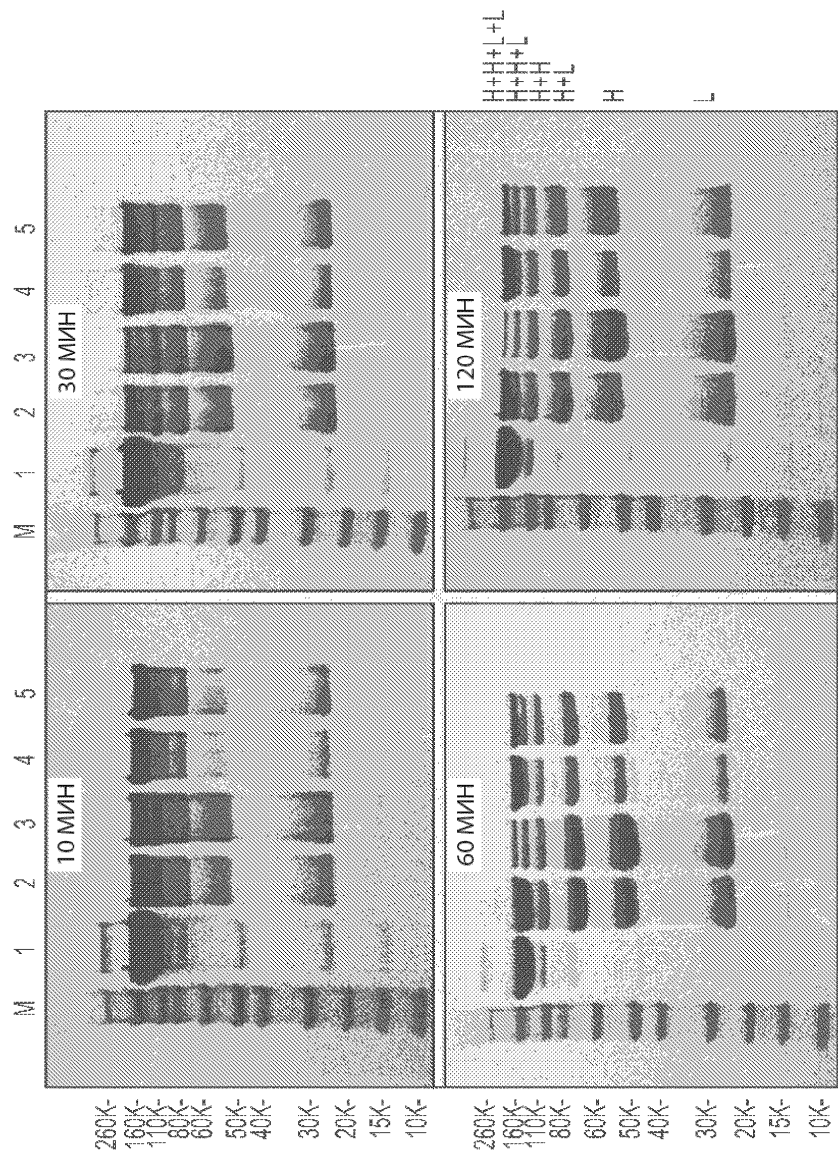
Фиг. 1

2/32



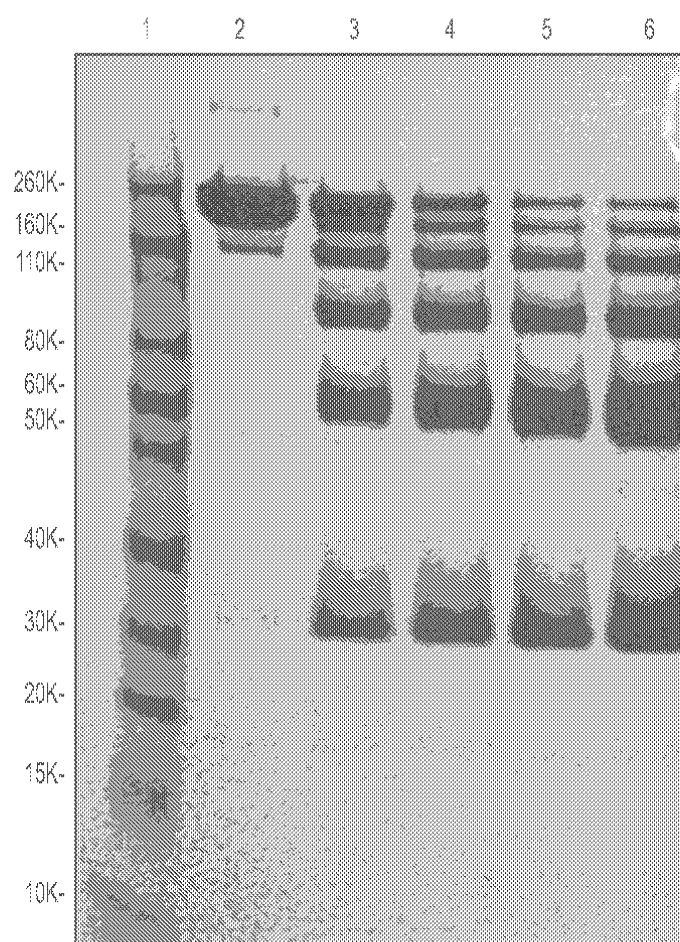
ФИГ. 2

3/32



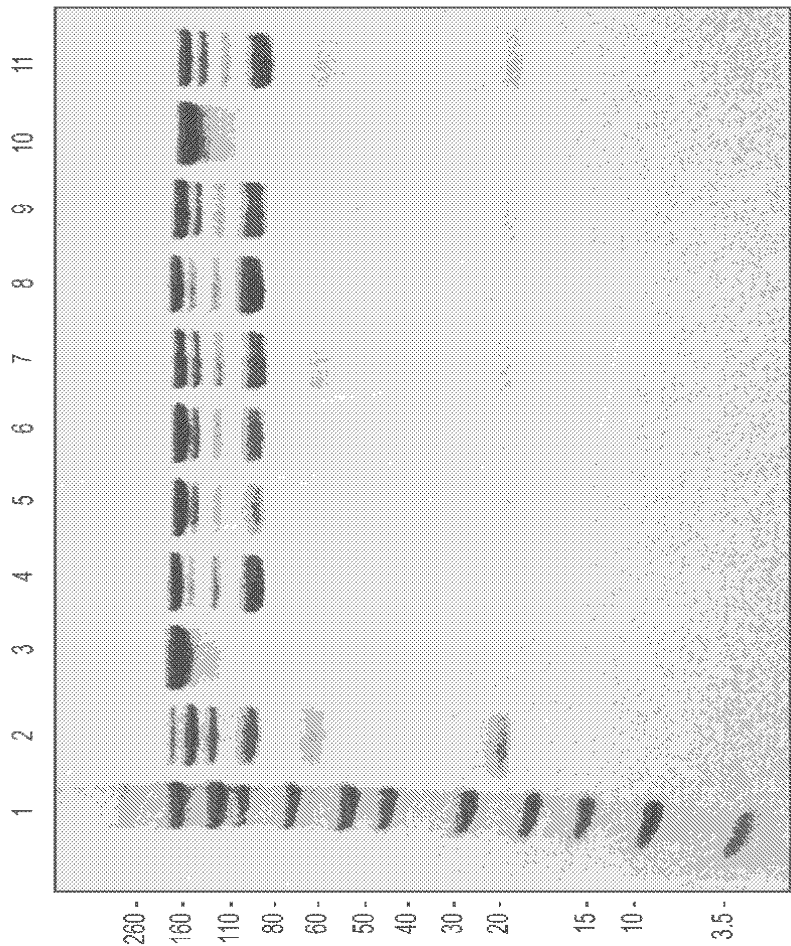
ФИГ. 3

4/32



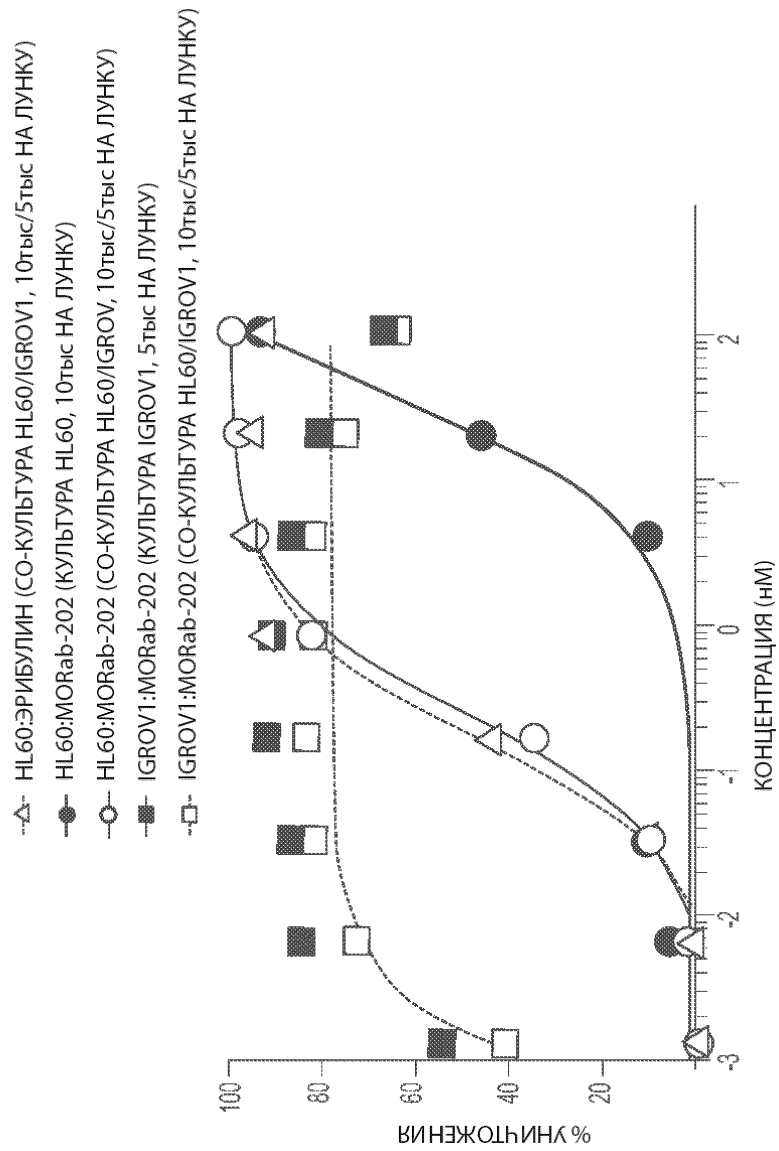
ФИГ. 4

5/32



ФИГ. 5

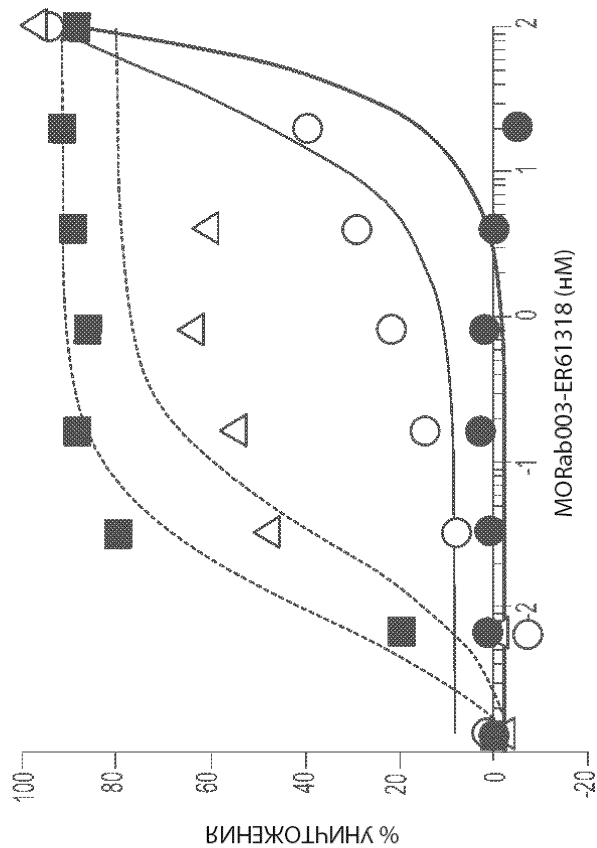
6/32



ФИГ. 6А

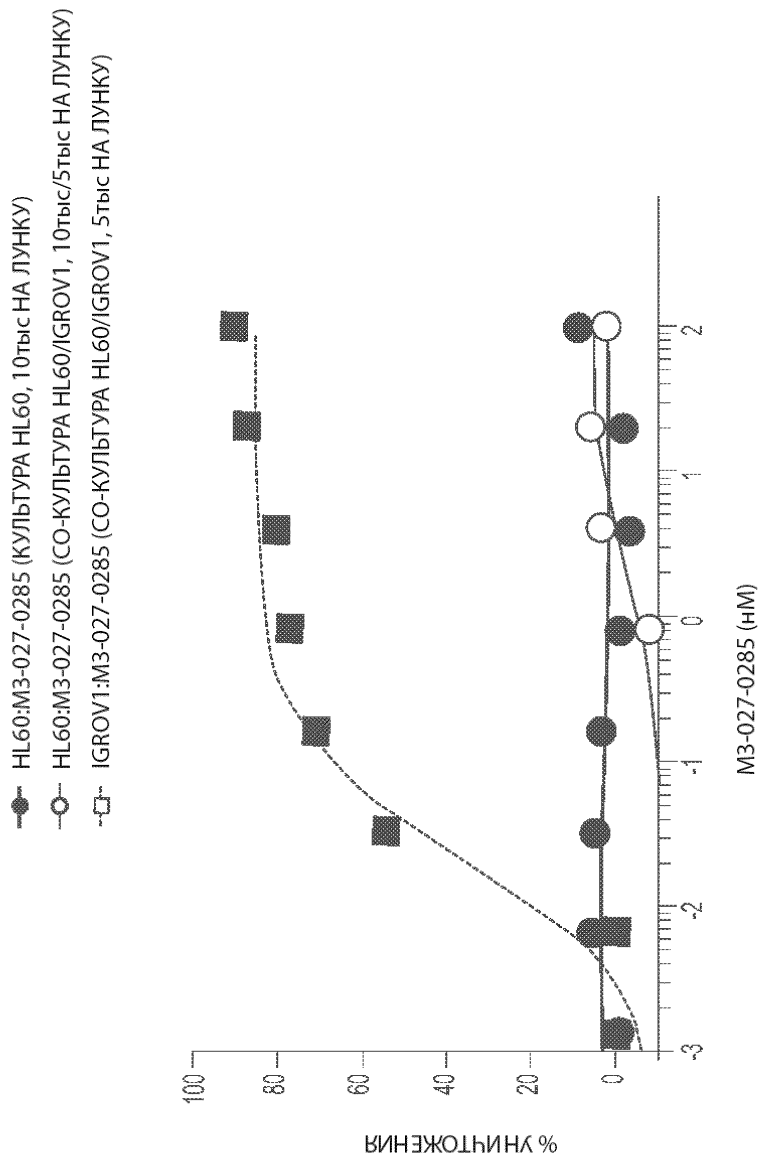
7/32

- HL60:M3-ER61318 (КУЛЬТУРА HL60, 10тыс НА ЛУНКУ)
- HL60:M3-ER61318 (СО-КУЛЬТУРА HL60/IGROV1, 10тыс/5тыс НА ЛУНКУ)
- △ HL60:M3-ER61318 (СО-КУЛЬТУРА HL60/IGROV1, 2,5тыс/5тыс НА ЛУНКУ)
- IGROV1:M3-ER61318 (КУЛЬТУРА IGROV1, 5тыс НА ЛУНКУ)



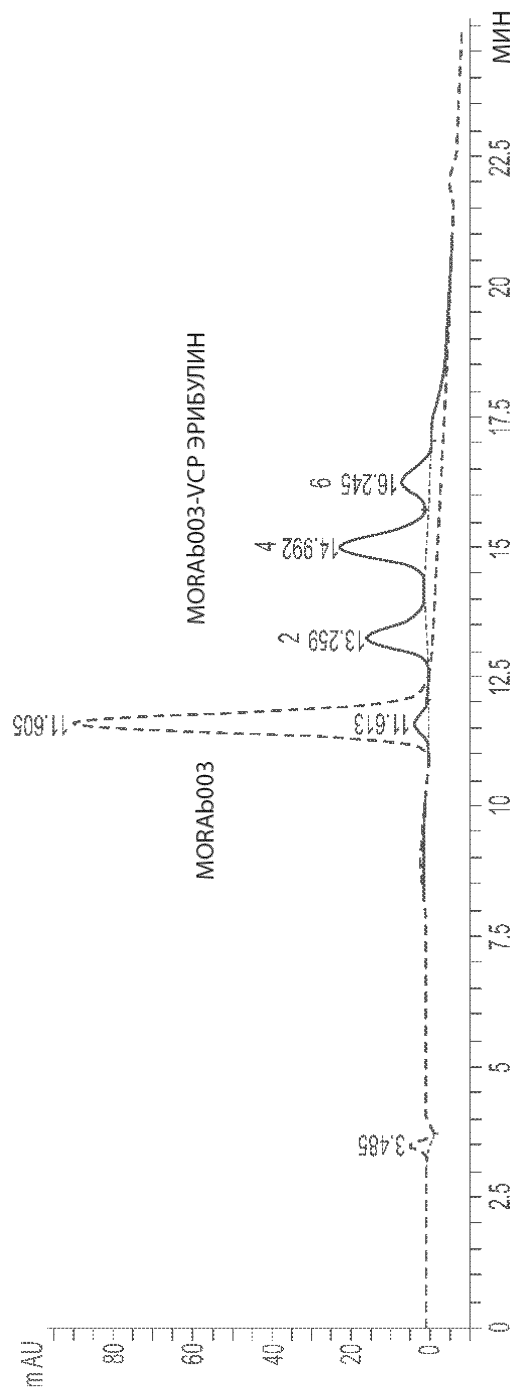
ФИГ. 6В

8/32



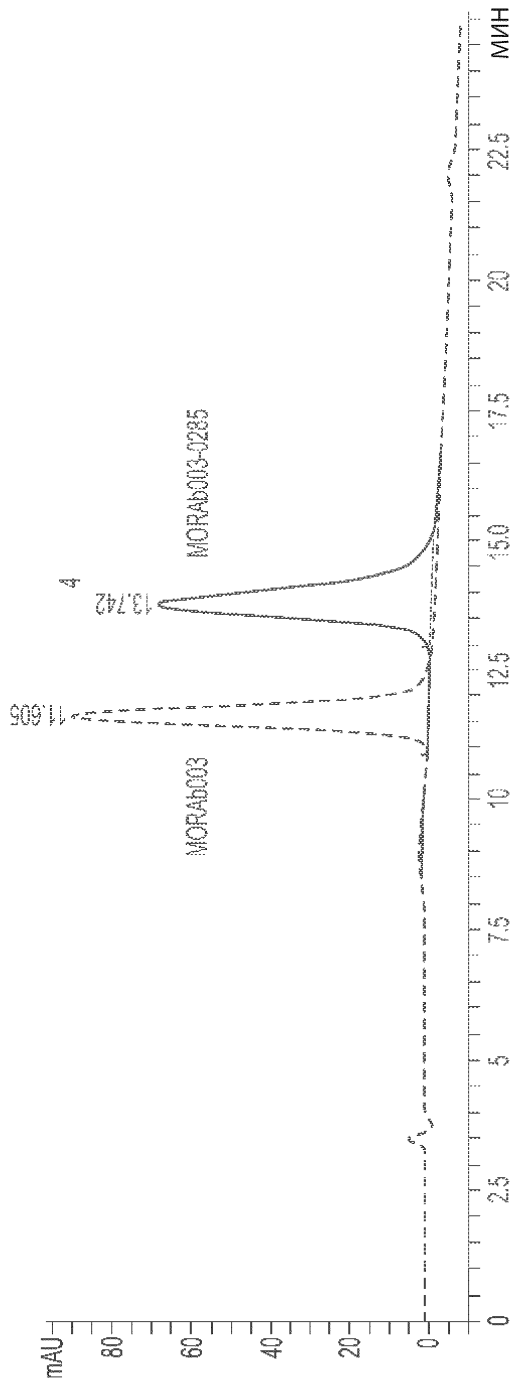
ФИГ. 6С

9/32



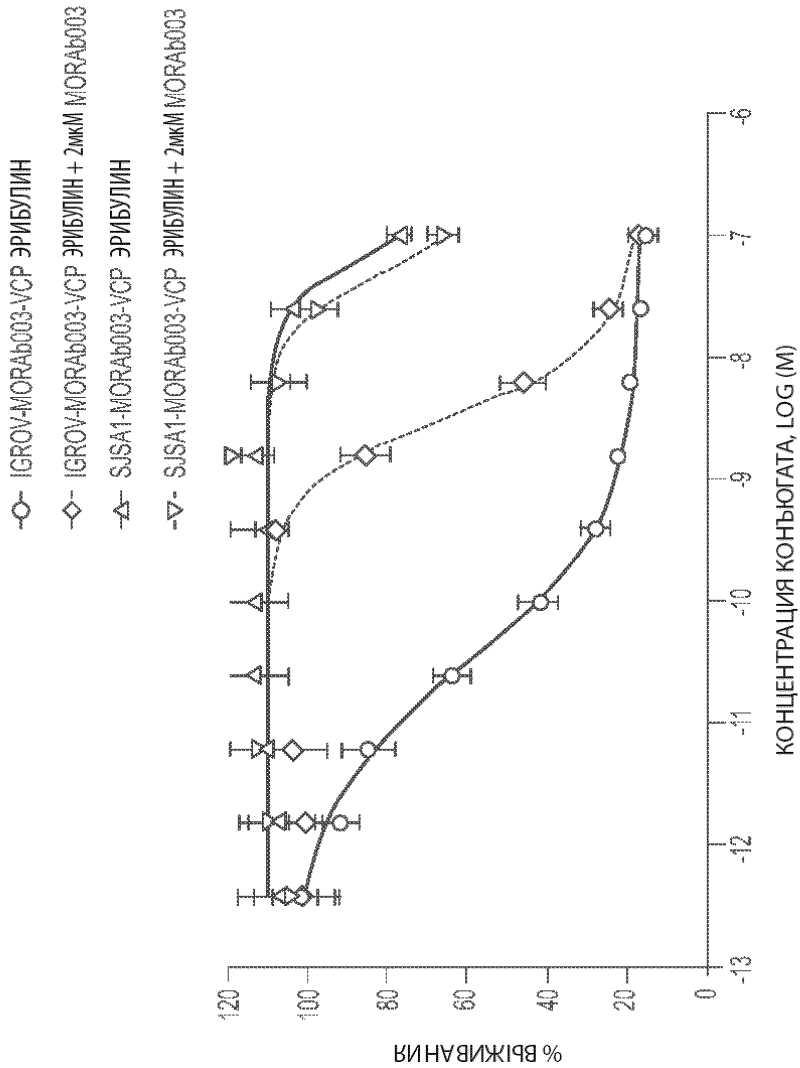
ФИГ. 7А

10/32



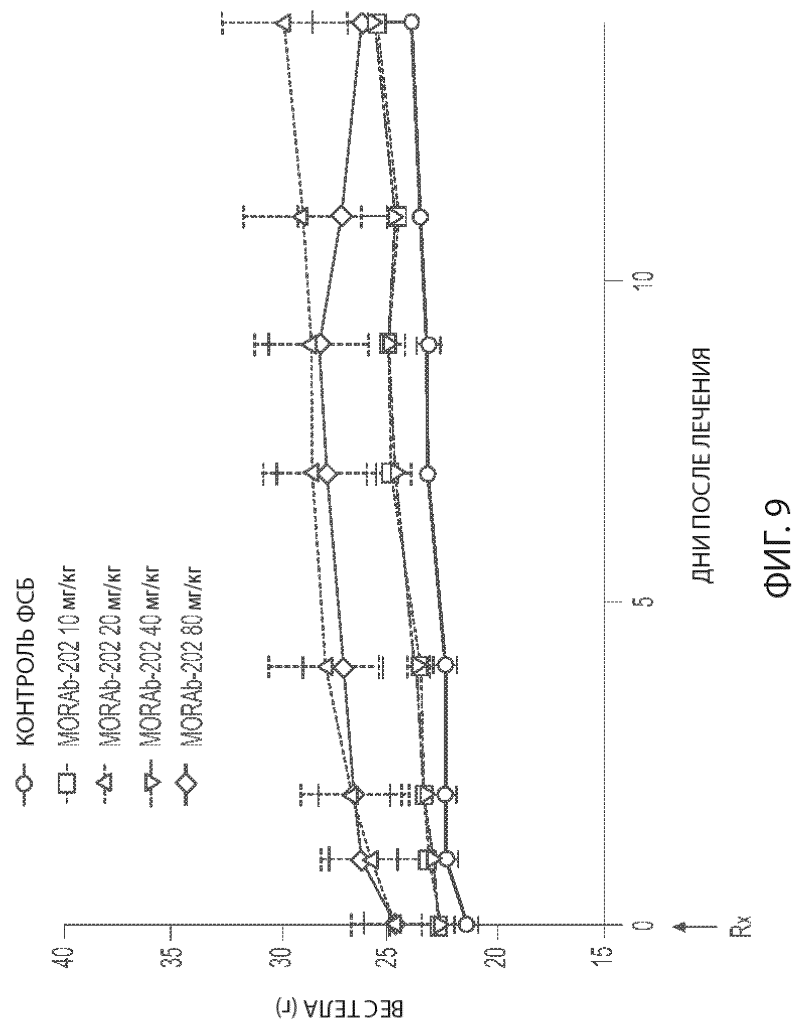
ФИГ. 7В

11/32

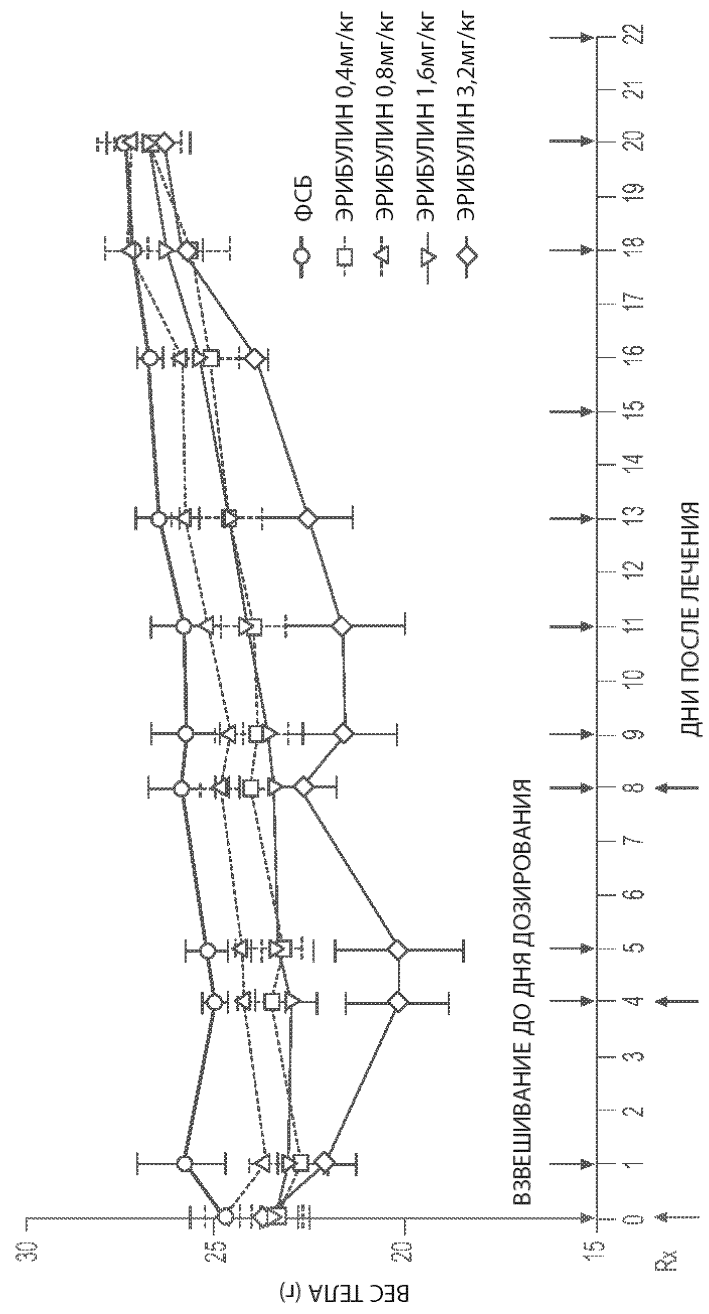


ФИГ. 8

12/32

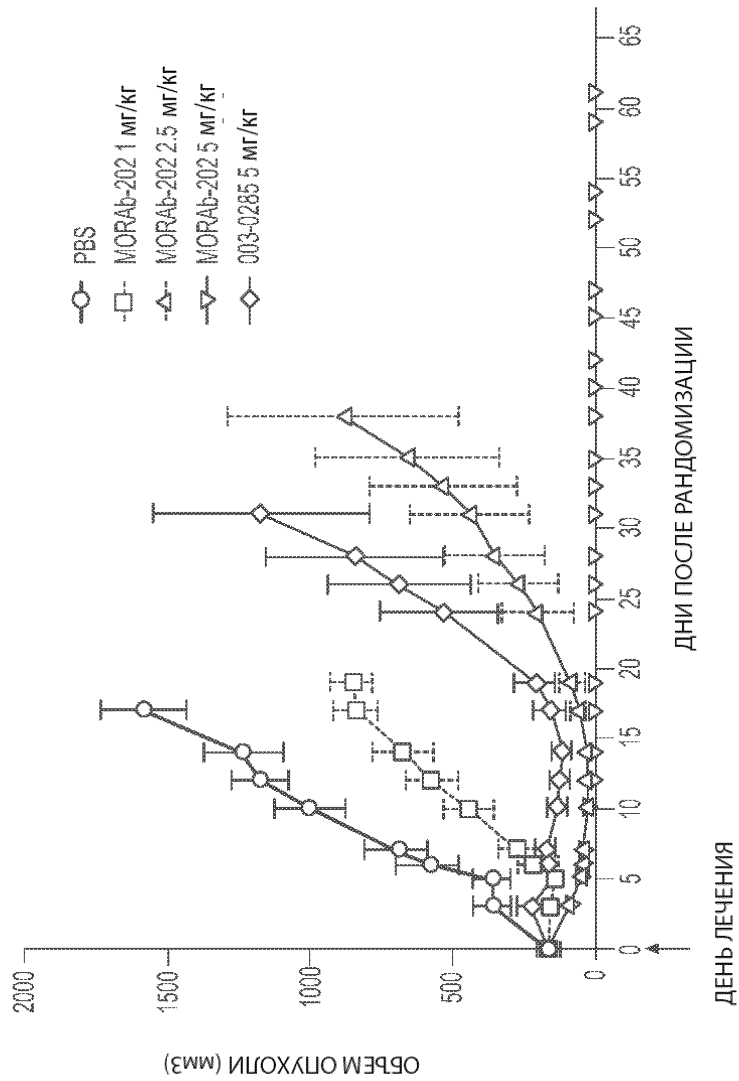


13/32



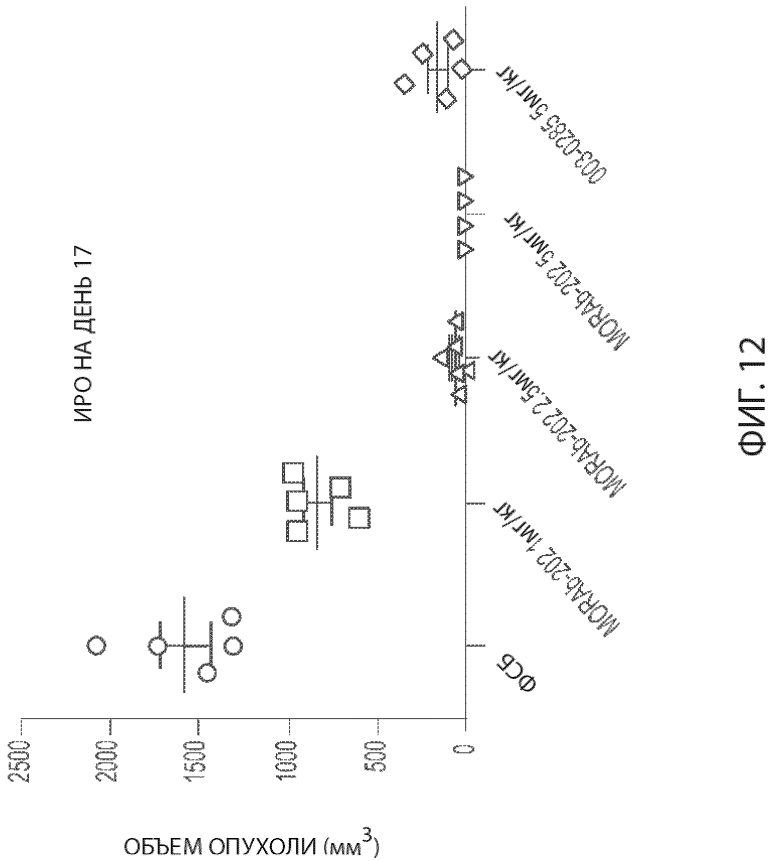
ФИГ. 10

14/32

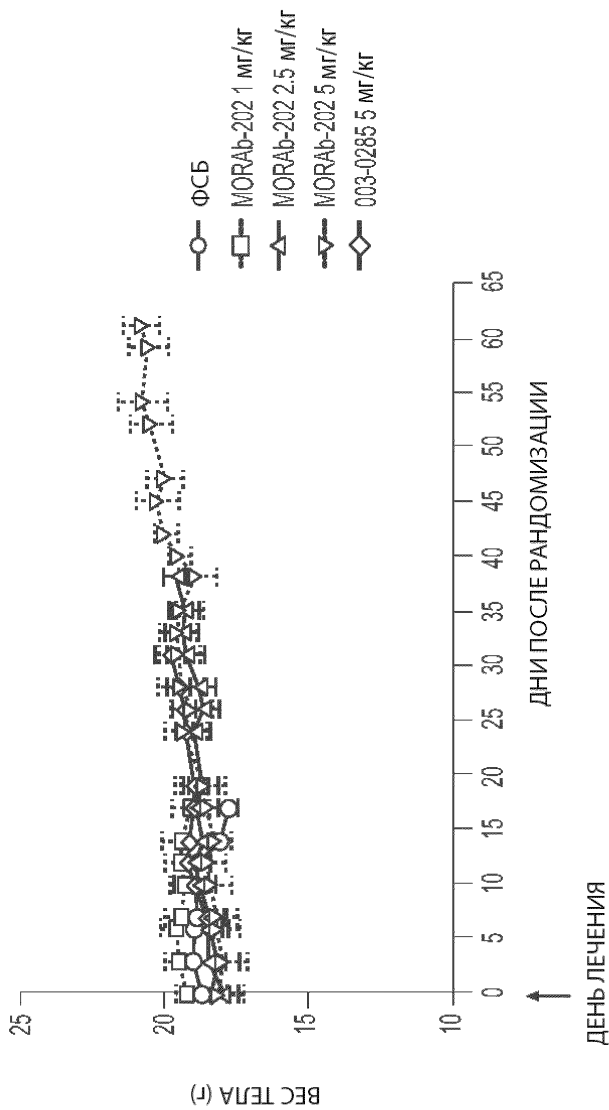


ФИГ. 11

15/32

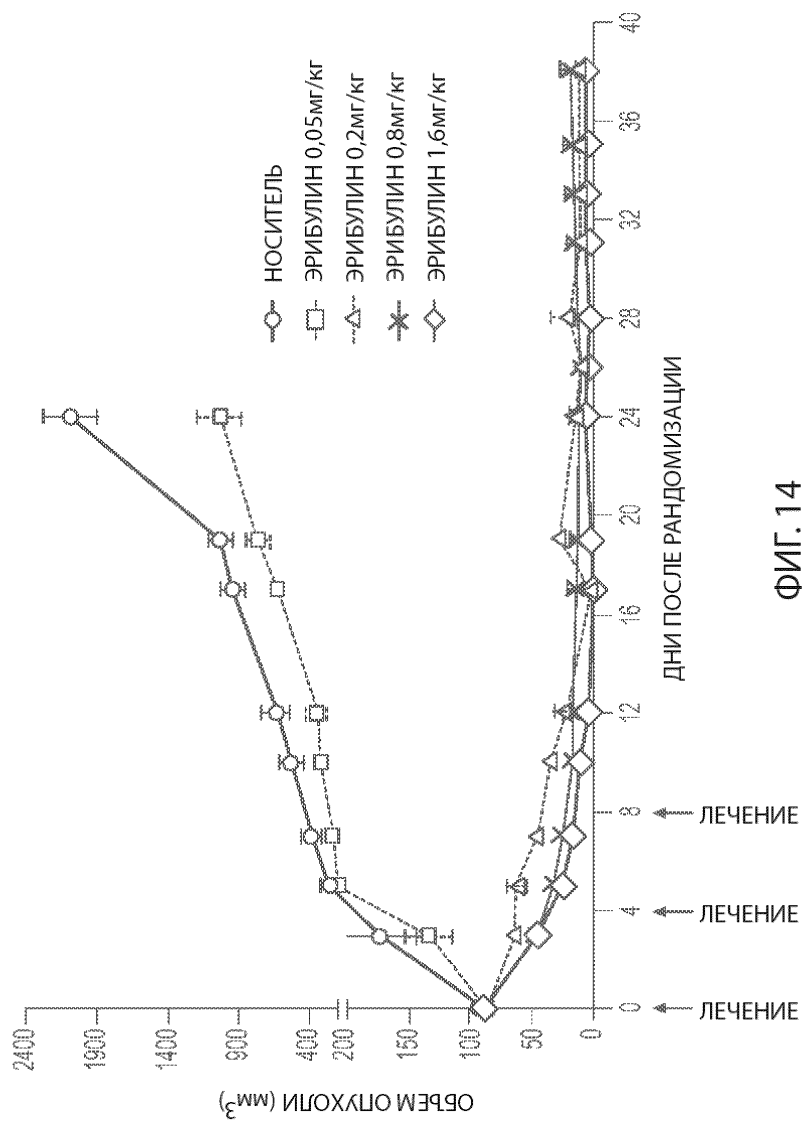


16/32



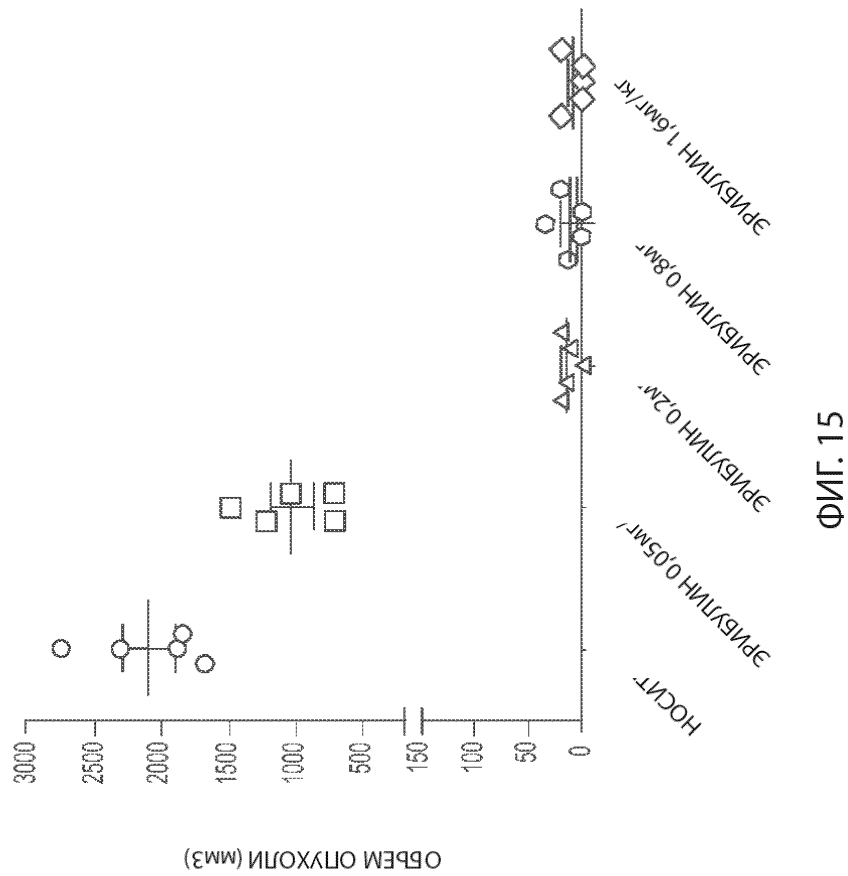
ФИГ. 13

17/32

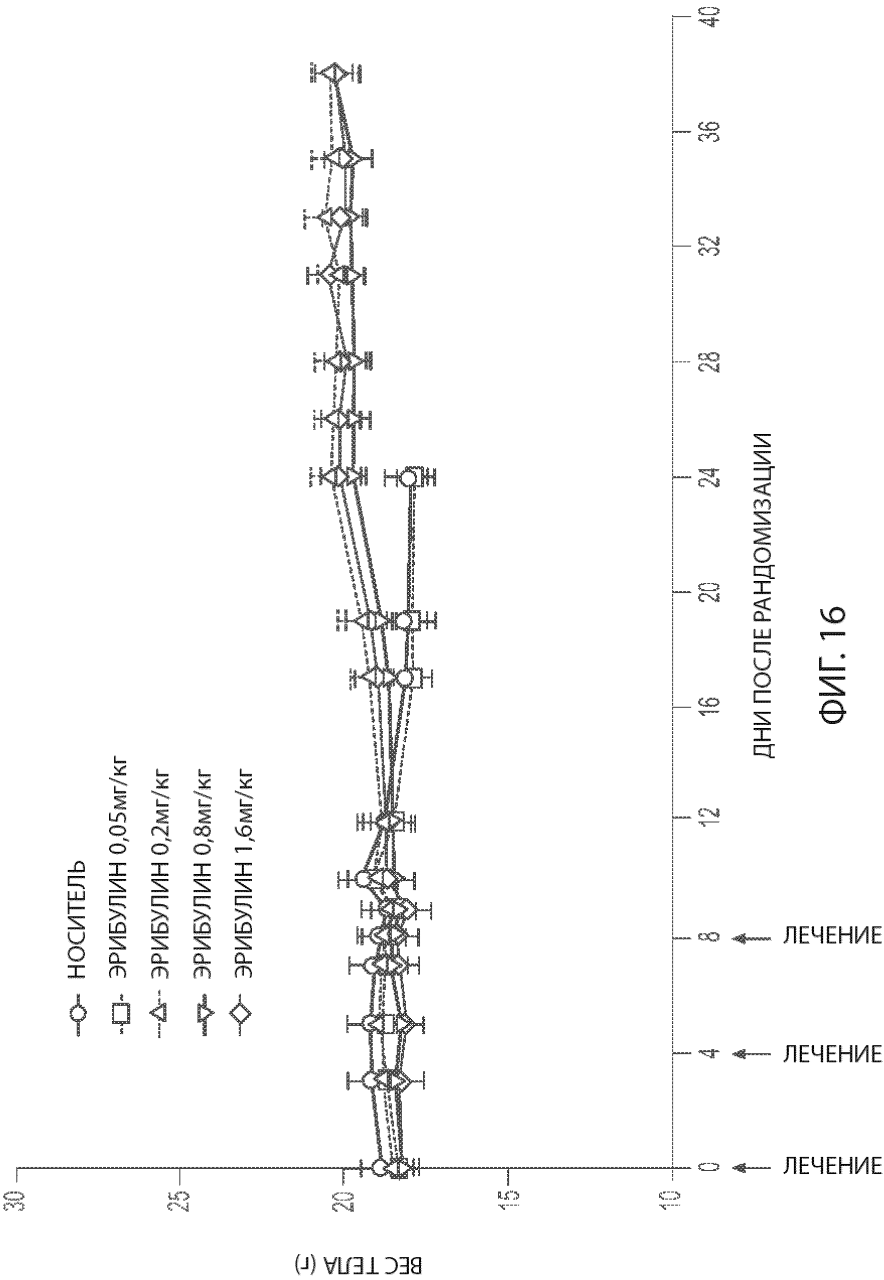


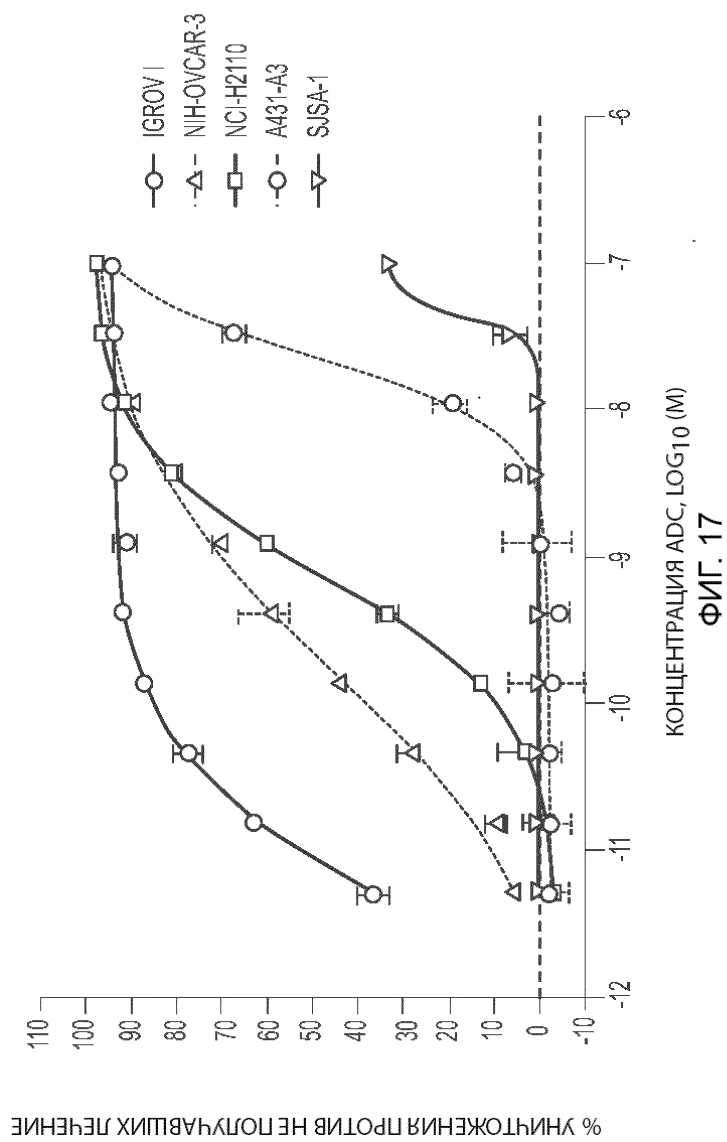
ФИГ. 14

18/32

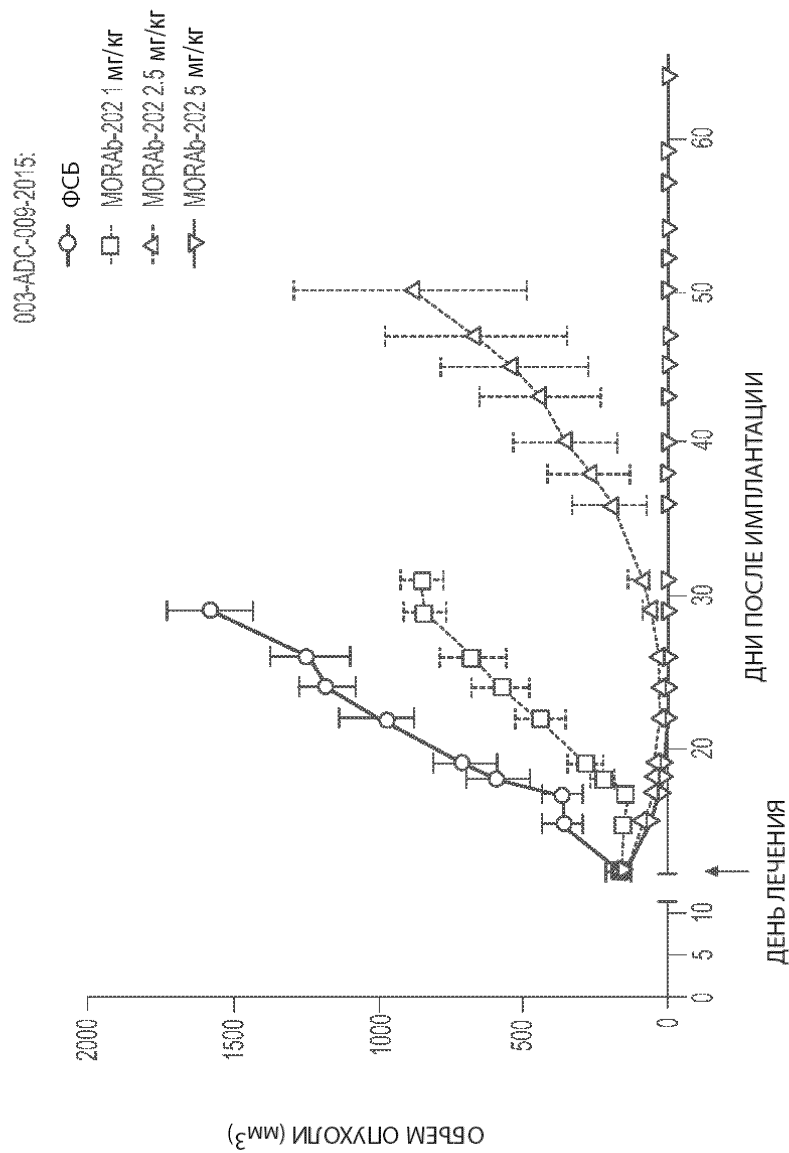


19/32

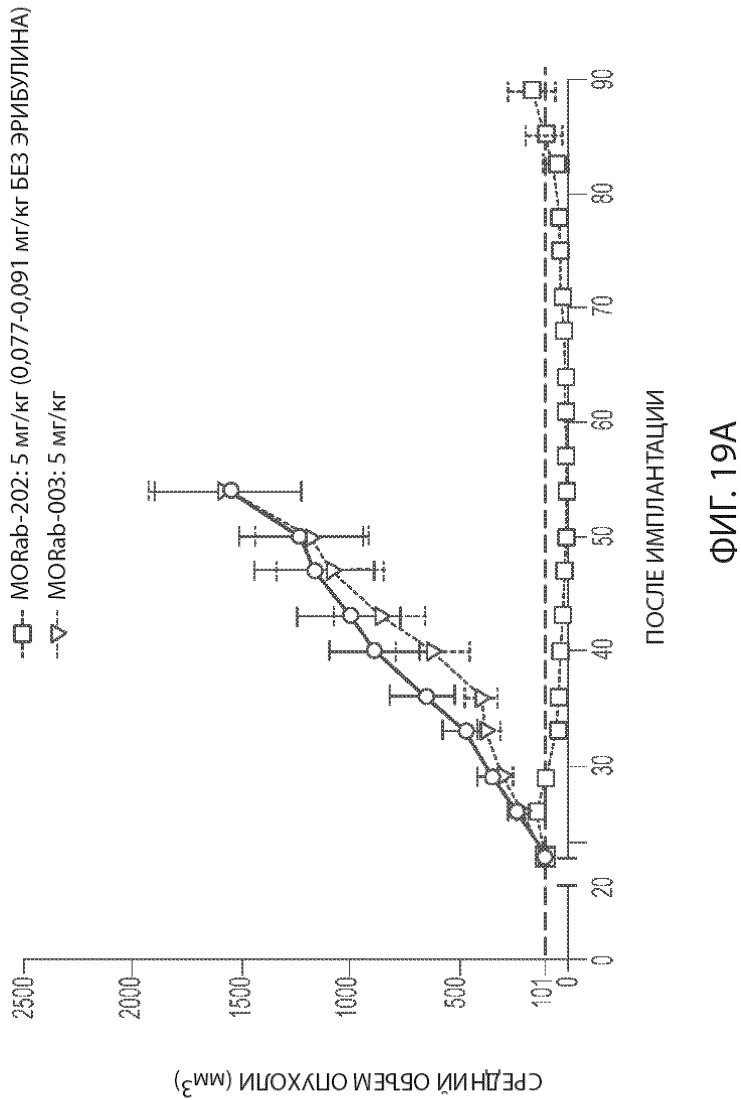




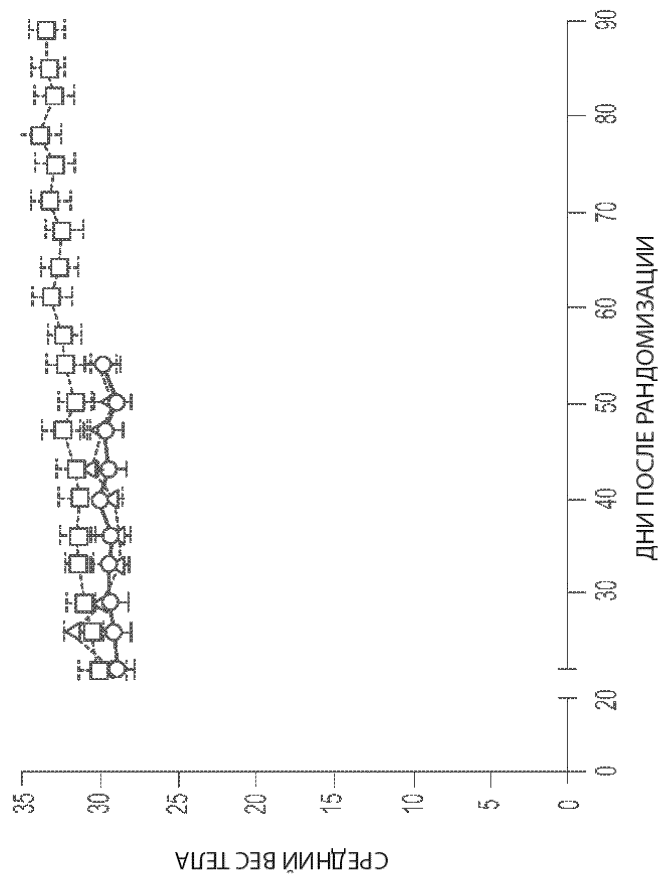
21/32



ФИГ. 18

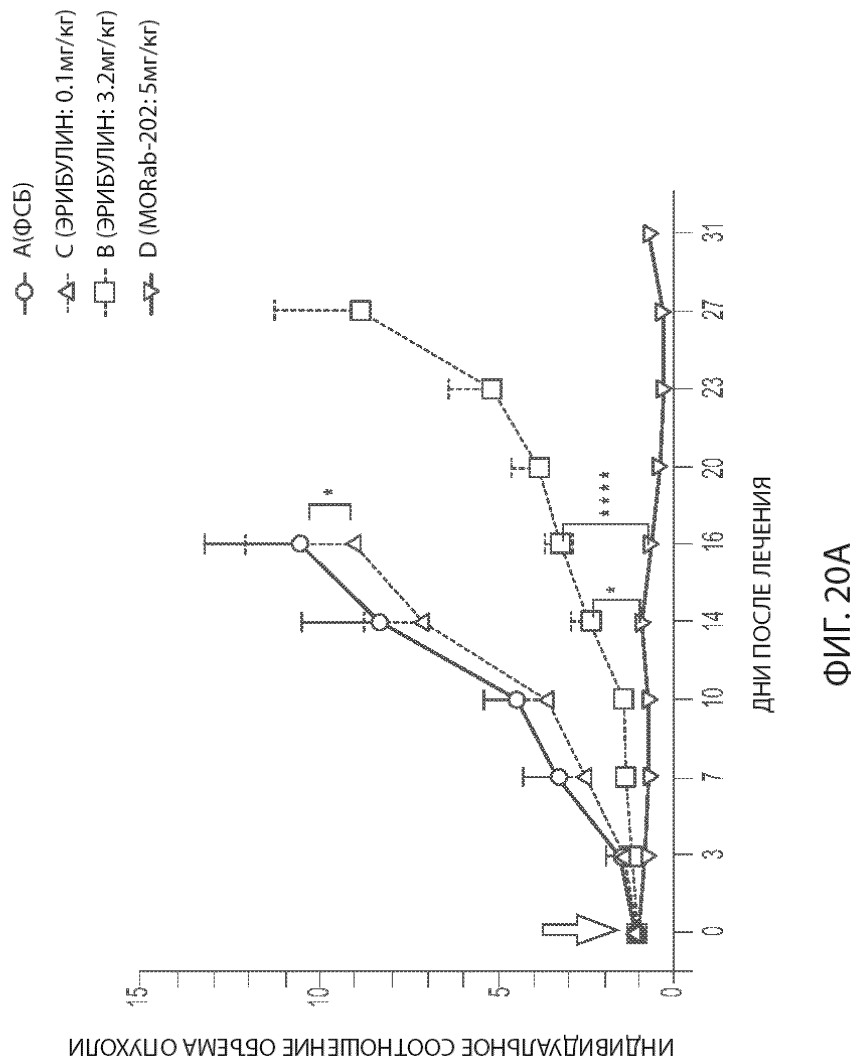


23/32

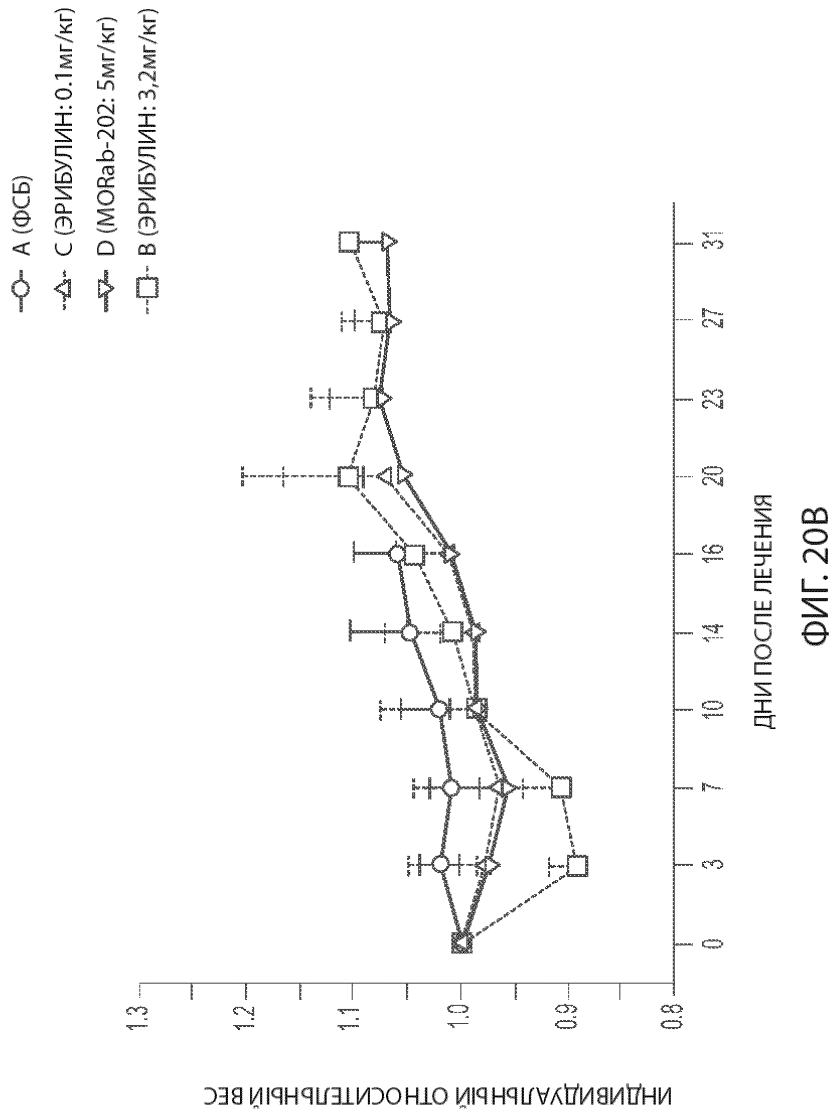


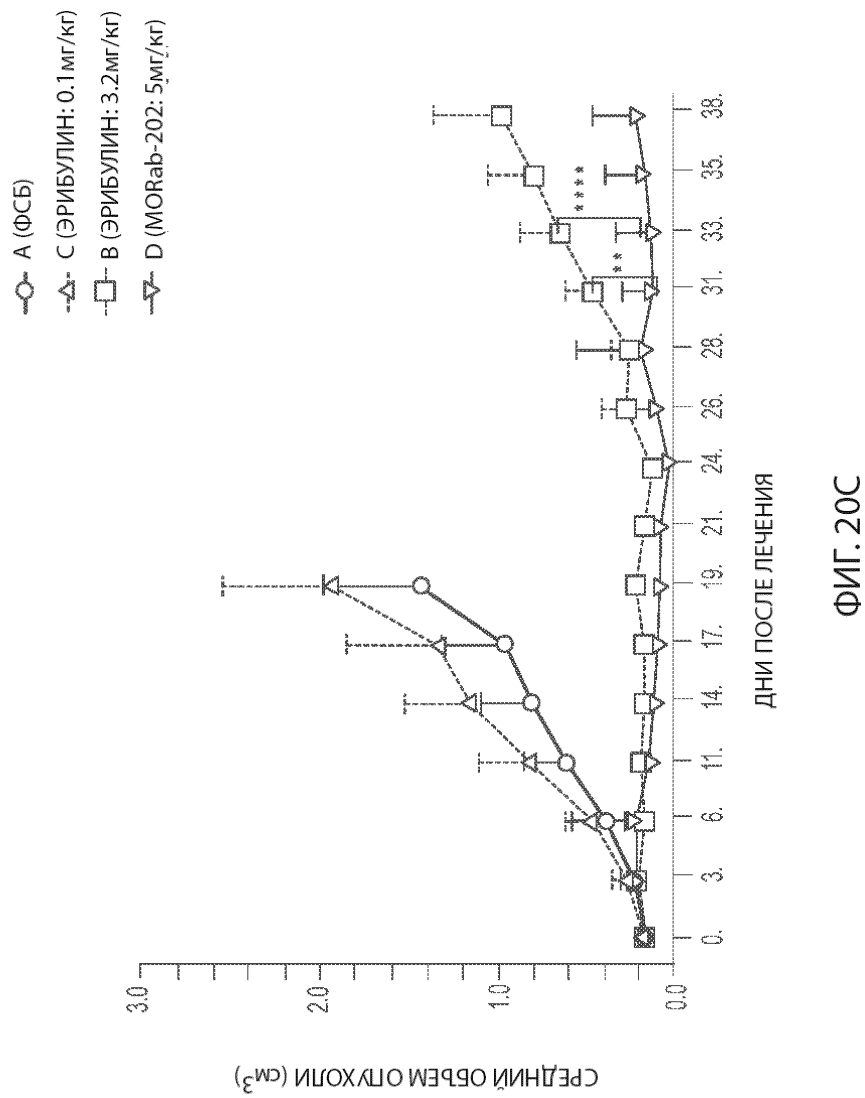
ФИГ. 19В

24/32

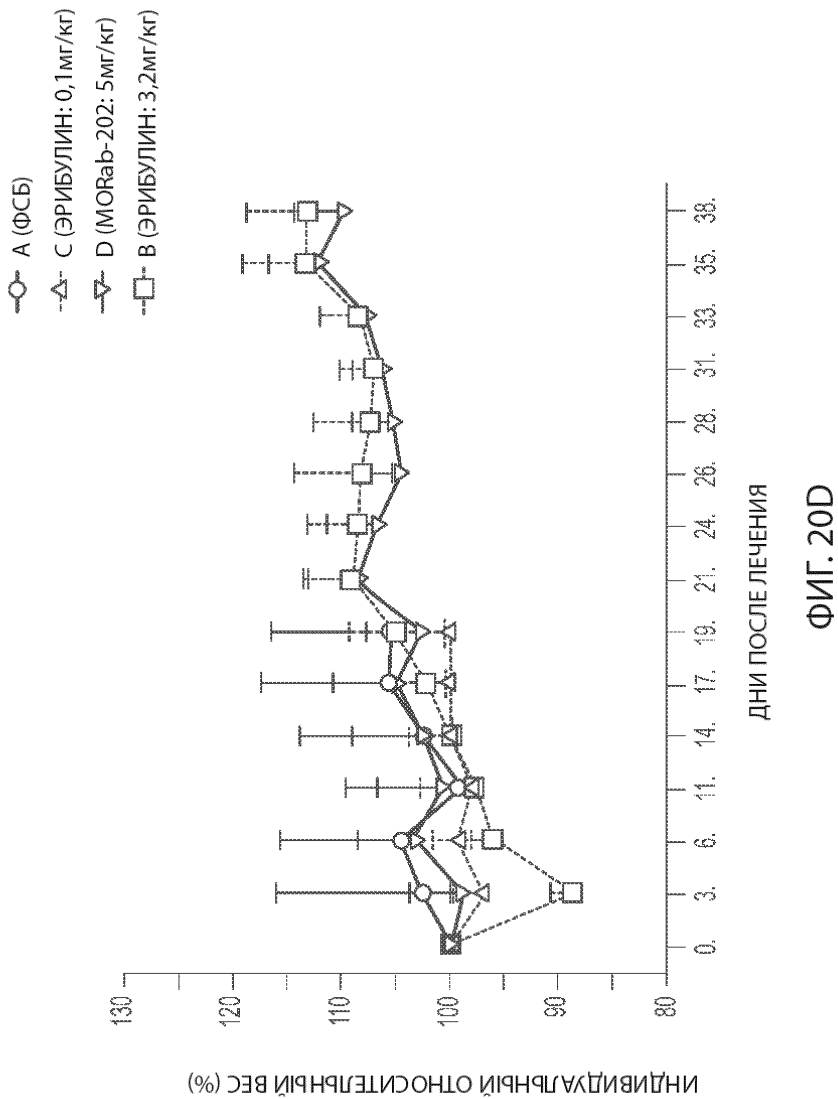


25/32



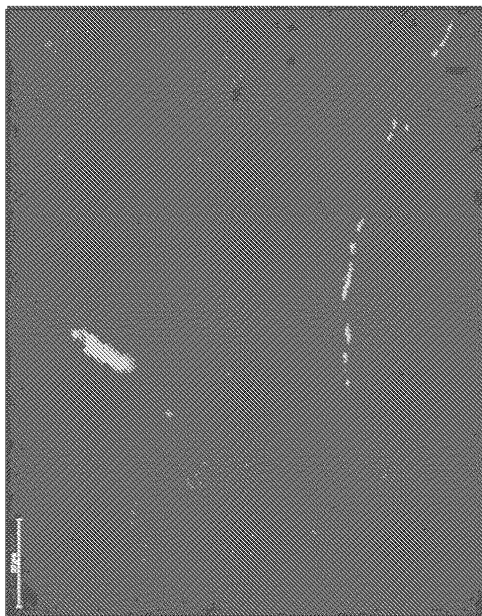


27/32

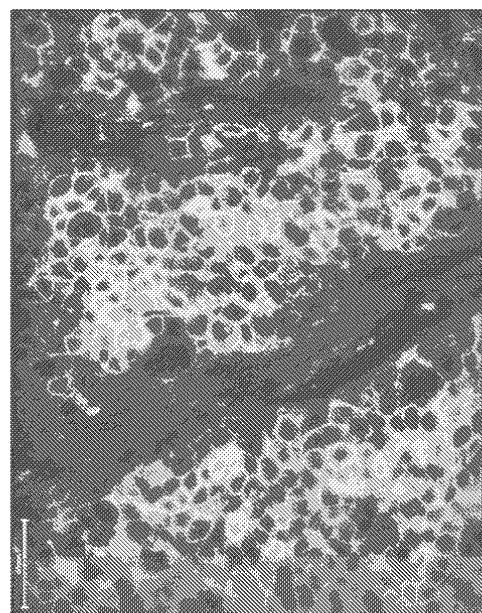


28/32

НОСИТЕЛЬ



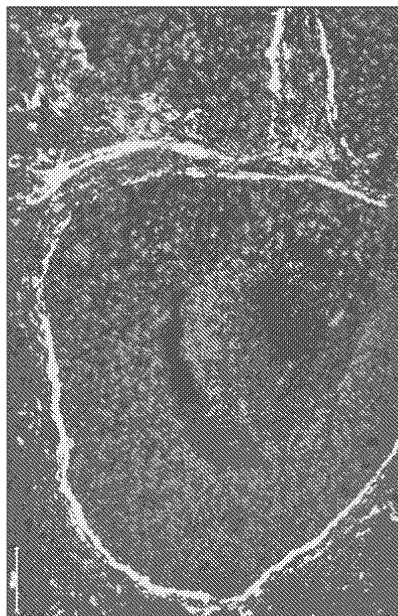
MORab-202 (5мг/кг)



ФИГ. 21А

29/32

МORab-202 (5мг/кг)

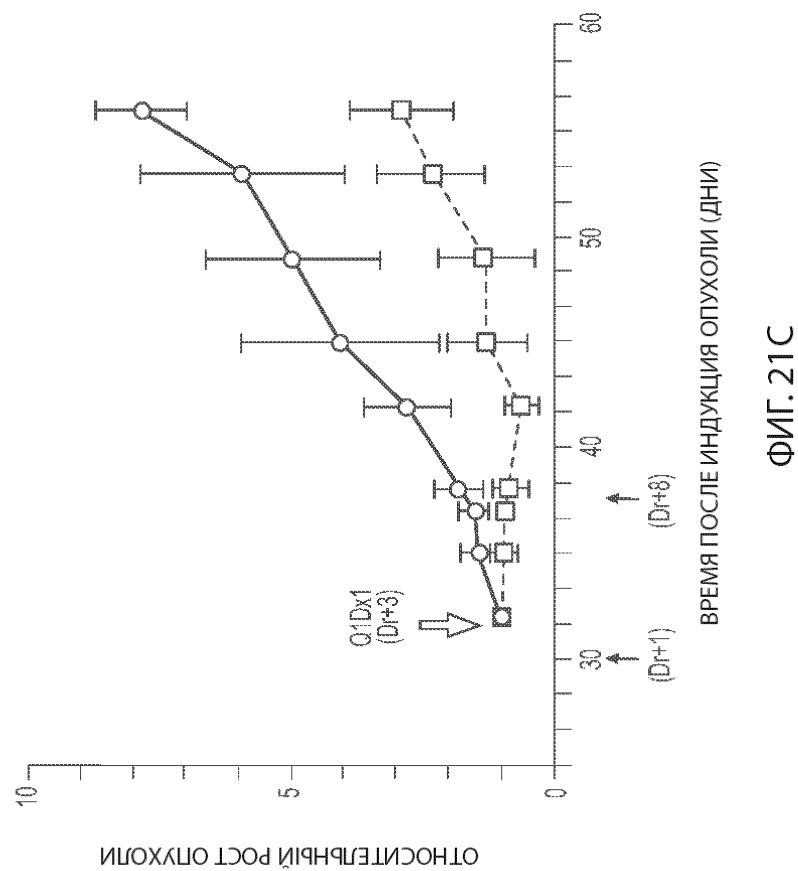


БЕЗ ЛЕЧЕНИЯ

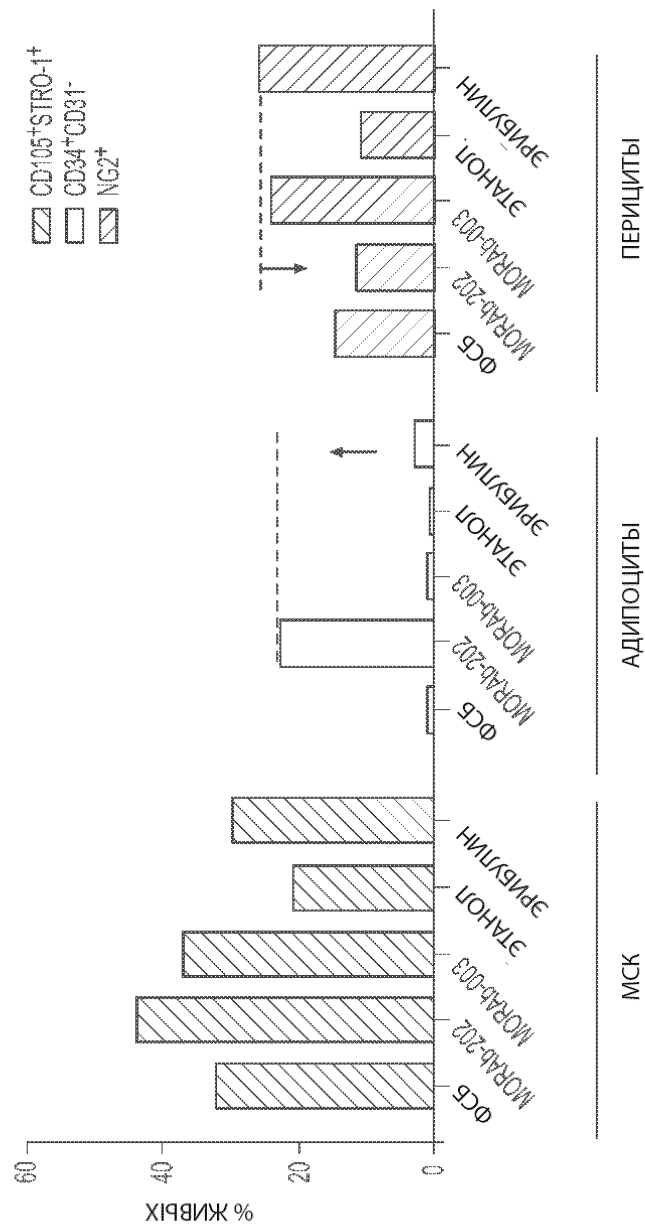


ФИГ. 21В

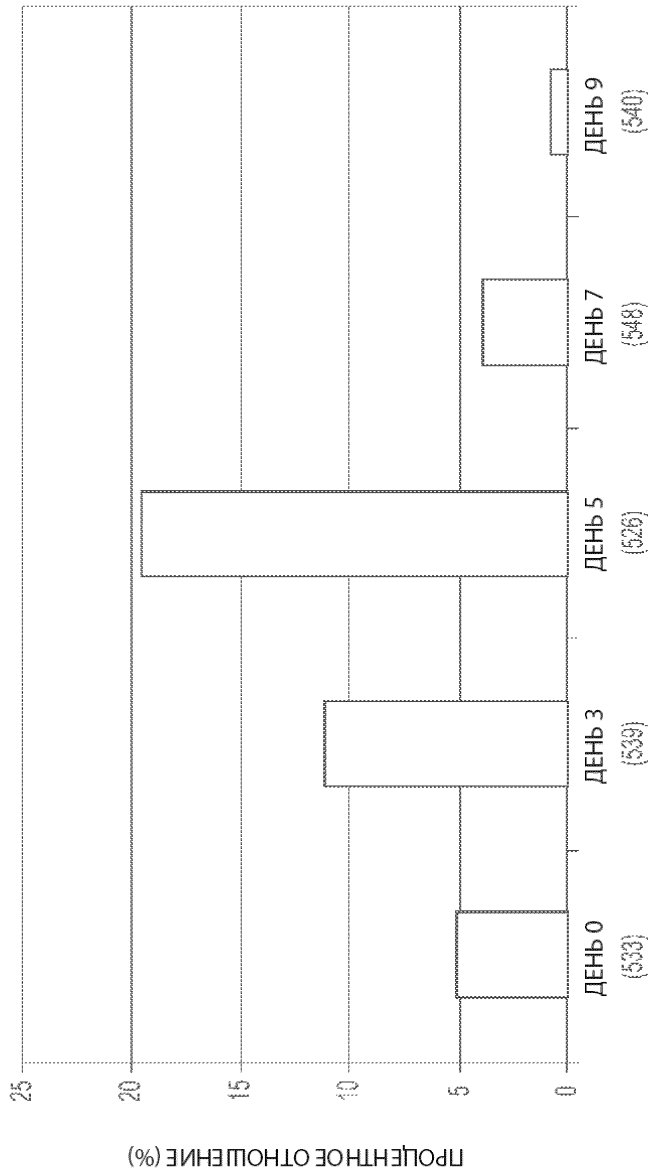
30/32



ФИГ. 21С



ФИГ. 22



ФИГ. 23