



(51) МПК
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 16/2893 (2019.08); *A61K 47/549* (2019.08); *A61K 47/6869* (2019.08); *C07K 16/28* (2019.08); *C07K 16/2809* (2019.08); *C07K 16/2851* (2019.08); *C07K 16/32* (2019.08); *C07K 16/40* (2019.08)

(21)(22) Заявка: 2015143057, 10.03.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
10.03.2014Дата регистрации:
05.12.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
 11.03.2013 US 61/776,724;
 11.03.2013 US 61/776,715;
 11.03.2013 US 61/776,710

(43) Дата публикации заявки: 17.04.2017 Бюл. № 11

(45) Опубликовано: 05.12.2019 Бюл. № 34

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 12.10.2015(86) Заявка РСТ:
US 2014/022623 (10.03.2014)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2014/164503 (09.10.2014)Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр. 3, ООО
"Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ПАН Кларк (US),
ЦЮ Хуавэй (US),
ДХАЛ Прадип (US),
ЧЭНЬ Бо (US),
ДЖАНОЛИО Диего (US)

(73) Патентообладатель(и):

ДЖЕНЗИМ КОРПОРЕЙШН (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: QU Z. et al., Carbohydrates engineered
at antibody constant domains can be used for site-
specific conjugation of drugs and chelates, Journal
of Immunological Methods, 1998, v.213, p.131-
144, реферат, стр.131-142. JUNUTULA J.R. et
al., Site-specific conjugation of a cytotoxic drug
to an antibody improves the therapeutic index,
Nature Biotech., (см. прод.)

2708314 C2

RU 2708314 C2

(54) ГИПЕРГЛИКОЗИЛИРОВАННЫЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ ПОЛИПЕПТИДЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биохимии. Описано выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для доставки цитотоксина, содержащие домен CH1 IgG, где домен CH1 IgG содержит остаток аспарагина в положении аминокислоты 114 в соответствии с нумерацией Kabat, где боковая цепь указанного остатка аспарагина связана с гликаном. Также описано выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для доставки цитотоксина, содержащие домен CH1

антигенсвязывающий фрагмент для доставки средства для детекции, содержащие домен CH1 IgG, где домен CH1 IgG содержит остаток аспарагина в положении аминокислоты 114 в соответствии с нумерацией Kabat, где боковая цепь указанного остатка аспарагина связана с гликаном. Также описано выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для доставки цитотоксина, содержащие домен CH1

IgG, где домен CH1 IgG содержит остаток аспарагина в положении аминокислоты 114 в соответствии с нумерацией Kabat, где боковая цепь указанного остатка аспарагина связана с гликаном посредством β -гликозиламидной связи и где гликан связан с цитотоксином. Кроме того, описано выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для доставки средства для детекции, содержащие домен CH1 IgG, где домен CH1 IgG содержит остаток аспарагина в положении аминокислоты 114 в соответствии с нумерацией Kabat, где боковая цепь указанного остатка аспарагина связана с гликаном посредством β -гликозиламидной связи и где гликан связан со средством детекции. Также

представлено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для связывания цитокина, содержащий домен CH1 IgG, где домен CH1 IgG содержит свободный остаток аспарагина в положении аминокислоты 114 в соответствии с нумерацией Kabat. Представлено выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для связывания средства для детекции, содержащие домен CH1 IgG, где домен CH1 IgG содержит свободный остаток аспарагина в положении аминокислоты 114 в соответствии с нумерацией Kabat. Изобретение может быть использовано для лечения рака, для диагностического применения. 15 н. и 21 з.п. ф-лы, 35 ил., 15 табл., 15 пр.

(56) (продолжение):

2008, v.26, n.8, реферат, стр. 925-931. JUNUTULA J.R. et al., Engineered Thio-Trastuzumab-DM1 Conjugate with an Improved Therapeutic Index to Target Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer, Clinical Cancer Research, 2010, v.16, no.19, p.4769-4778, реферат, стр.4769-4777. UA 40611 C2, 15.08.2001.

R U 2 7 0 8 3 1 4 C 2

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19)

RU

(11)

2 708 314⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(52) CPC

C07K 16/2893 (2019.08); *A61K 47/549* (2019.08); *A61K 47/6869* (2019.08); *C07K 16/28* (2019.08); *C07K 16/2809* (2019.08); *C07K 16/2851* (2019.08); *C07K 16/32* (2019.08); *C07K 16/40* (2019.08)

(21)(22) Application: 2015143057, 10.03.2014

(24) Effective date for property rights:
10.03.2014

Registration date:
05.12.2019

Priority:

(30) Convention priority:
11.03.2013 US 61/776,724;
11.03.2013 US 61/776,715;
11.03.2013 US 61/776,710

(43) Application published: 17.04.2017 Bull. № 11

(45) Date of publication: 05.12.2019 Bull. № 34

(85) Commencement of national phase: 12.10.2015

(86) PCT application:
US 2014/022623 (10.03.2014)

(87) PCT publication:
WO 2014/164503 (09.10.2014)

Mail address:
129090, Moskva, ul. B. Spasskaya, 25, str. 3, OOO
"Yuridicheskaya firma Gorodisskij i Partnery"

(72) Inventor(s):

PAN Klark (US),
TSYU Khuavej (US),
DKHAL Pradip (US),
CHEN Bo (US),
DZHANOLIO Diego (US)

(73) Proprietor(s):

DZHENZIM KORPOREJSHN (US)

(54) HYPERGLYCOSYLATED BINDING POLYPEPTIDES

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to biochemistry.

Described is an isolated antibody or antigen-binding fragment thereof for delivering a cytotoxin comprising a CH1 IgG domain, where the CH1 IgG domain contains an asparagine residue in the amino acid position 114 in accordance with the Kabat numbering, where the side chain of the said asparagine residue is linked to the glycan. Also described is an isolated antibody or its antigen-binding fragment for the delivery of a cytotoxin containing a CH1 domain of IgG, where the CH1 domain of the IgG contains an asparagine residue in the amino acid position 114 in accordance with the Kabat numbering, where the side chain of said asparagine residue is bound to glycan by β -

where the CH1 domain of the IgG contains an asparagine residue in the amino acid position 114 in accordance with the Kabat numbering, where the side chain of the said asparagine residue is linked to the glycan. Also described is an isolated antibody or its antigen-binding fragment for the delivery of a cytotoxin containing a CH1 domain of IgG, where the CH1 domain of the IgG contains an asparagine residue in the amino acid position 114 in accordance with the Kabat numbering, where the side chain of said asparagine residue is bound to glycan by β -

R U 2 7 0 8 3 1 4 C 2

glycosylamide linkage and where glycan is linked to detection agent. Also described is an isolated antibody or antigen-binding fragment thereof for the delivery of a detection agent containing a CH1 IgG domain, where the CH1 IgG domain contains the asparagine residue in the amino acid position 114 in accordance with the Kabat numbering, where the side chain of said asparagine residue is bound to glycan by β -glycosylamide linkage and where glycan is linked to cytotoxin. Also disclosed is an isolated antibody or an antigen-binding fragment thereof for cytotoxin binding, containing an CH1 domain of IgG, wherein the CH1

domain of IgG contains a free asparagine residue in the position of amino acid 114 in accordance with the Kabat numbering. Disclosed is an isolated antibody or antigen-binding fragment thereof for binding a detection agent containing a CH1 IgG domain, wherein the CH1 domain of the IgG contains a free asparagine residue at amino acid position 114 in accordance with the Kabat numbering.

EFFECT: invention can be used for treating cancer, for diagnostic use.

36 cl, 35 dwg, 15 tbl, 15 ex

R U 2 7 0 8 3 1 4 C 2

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке испрашивается приоритет Предварительной патентной заявки США 61/776724, озаглавленной «Site-Specific Antibody Drug Conjugation Through Glycoengineering», поданной 11 марта 2013 г.; Предварительной патентной заявки США 5 61/776710, озаглавленной «Hyperglycosylated Binding Polypeptides», поданной 11 марта 2013 г.; Предварительной патентной заявки США 61/776715, озаглавленной «Fc Containing Polypeptides with Altered Glycosylation and Reduced Effector Function», поданной 11 марта 2013 г., и Международной заявки PCT/US13/59481, поданной 12 сентября 2013 г. Полное содержание вышеупомянутых заявок, таким образом, приведено в настоящем 10 документе путем ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Конъюгация лекарственных средств с моноклональными антителами или другими полипептидами часто приводит к формированию гетерогенной смеси конъюгатов антитела с лекарственным средством (ADC), несущих различное количество молекул 15 на полипептид. Способность присоединять молекулы прочно и эффективно к одному или нескольким определенным участку (участкам) антитела является очень желательной для получения химически гомогенных соединений. Соответственно, в данной области существует необходимость в новых сконструированных полипептидах, позволяющих стехиометрически постоянную конъюгацию групп.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее описание относится к связывающим полипептидам (например, антителам) и их конъюгатам с эффекторными группами, содержащим домен CH1 (например, домен CH1 IgG1 человека), где домен CH1 обладает сконструированным участком N-связанного гликозилирования в положении аминокислоты 114, в соответствии с 25 нумерацией Kabat. Настоящее описание относится также к нуклеиновым кислотам, кодирующими антигенсвязывающие полипептиды, рекомбинантным экспрессирующим векторам и клеткам-хозяевам для получения таких антигенсвязывающих полипептидов. Представлены также способы использования антигенсвязывающих полипептидов, описанных в настоящем документе, для лечения заболевания.

Связывающие полипептиды (например, антитела) по настоящему описанию являются 30 преимущественными в том, что сконструированный участок N-связанного гликозилирования в положении Kabat 114 также может присутствовать в качестве участка для конъюгации эффекторных групп (например, групп лекарственного средства и нацеливающих групп), без помех для антигенсвязывающих свойств связывающих 35 полипептидов.

Соответственно, в одном аспекте описание относится к выделенному связывающему полипептиду, содержащему домен CH1, где домен CH1 содержит остаток аспарагина в положении аминокислоты 114, в соответствии с нумерацией Kabat. В одном варианте осуществления, домен CH1 дополнительно содержит: любой аминокислотный остаток, 40 за исключением пролина в положении 115, в соответствии с нумерацией Kabat; и остаток серина или треонина в положении 116, в соответствии с нумерацией Kabat. В одном варианте осуществления домен CH1 представляет собой домен CH1 IgG1 или его вариант. В другом варианте осуществления домен CH1 представляет собой домен CH1 IgG1 человека или его вариант.

В другом варианте осуществления боковая цепь остатка аспарагина связана с гликаном через β -гликозиламидную связь. В другом варианте осуществления гликан представляет собой двухантенный гликан. В другом варианте осуществления гликан представляет собой природную гликоформу млекопитающих. В другом варианте

осуществления гликан содержит реакционноспособную альдегидную группу. В другом варианте осуществления гликан содержит окисленный остаток сахарида, содержащий реакционноспособную альдегидную группу. В другом варианте осуществления окисленный остаток сахарида представляет собой концевую сиаловую кислоту или

5 галактозу.

В другом варианте осуществления гликан связан с эффекторной группой. В другом варианте осуществления эффекторная группа представляет собой цитотоксин. В другом варианте осуществления цитотоксин выбран из группы, состоящей из цитотоксинов, перечисленных в таблице 1. В другом варианте осуществления эффекторная группа

10 представляет собой средство для детекции. В конкретных вариантах осуществления эффекторная группа представляет собой нацеливающую группу. В одном варианте осуществления нацеливающая группа представляет собой углевод или гликопептид. В другом варианте осуществления нацеливающая группа представляет собой гликан.

В другом варианте осуществления эффекторная группа связана через оксимную или

15 гидразоновую связь с сахаридным остатком гликана. В другом варианте осуществления сахарид представляет собой концевой остаток сиаловой кислоты или галактозы гликана. В другом варианте осуществления эффекторная группа содержит рН-чувствительный линкер, дисульфидный линкер, фермент-чувствительный линкер или другую

отщепляемую линкерную группу. В другом варианте осуществления эффекторная

20 группа содержит линкерную группу, выбранную из группы линкерных групп, показанных в таблице 2 или 14.

В другом аспекте изобретение относится к выделенному связывающему полипептиду, содержащему домен CH1, где домен CH1 содержит свободный остаток аспарагина в положении аминокислоты 114, в соответствии с нумерацией Kabat.

25 В другом аспекте изобретение относится к выделенному связывающему полипептиду, содержащему домен CH1, где домен CH1 содержит модифицированный остаток аспарагина в положении аминокислоты 114, в соответствии с нумерацией Kabat, где указанный остаток аспарагина связан с эффекторной группой. В одном варианте осуществления эффекторная группа связана через боковую цепь модифицированного

30 остатка аспарагина с сахаридным остатком гликана. В другом варианте осуществления сахарид представляет собой концевой остаток сиаловой кислоты или галактозы гликана. В другом варианте осуществления эффекторная группа связана через оксимную или гидразоновую связь с сахаридным остатком гликана. В другом варианте осуществления сахарид представляет собой концевой остаток сиаловой кислоты или галактозы гликана.

35 В конкретных вариантах осуществления связывающий полипептид представляет собой антитело или фрагмент, или его производное. В другом варианте осуществления, антитело, фрагмент или производное антитела связаны с эффекторной группой лекарственного средства для формирования конъюгата антитела с лекарственным средством (ADC).

40 В конкретных аспектах изобретение относится к композиции, содержащей связывающий полипептид по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

В других аспектах изобретение относится к способу лечения нуждающегося в этом пациенте, включающему введение эффективного количества композиции по

45 изобретению.

В другом аспекте изобретение относится к выделенному полинуклеотиду, кодирующему связывающий полипептид по изобретению.

В другом аспекте изобретение относится к вектору, содержащему полинуклеотид.

В другом аспекте изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей полинуклеотид. В другом аспекте, изобретение относится к способу получения связывающего полипептида, включающему экспрессию полинуклеотида или вектора в клетке.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

5 Фигура 1 представляет собой схематическую иллюстрацию синтеза конъюгата антитела с лекарственным средством, где группа токсина связана с окисленным остатком сиаловой кислоты гликана антитела с использованием оксимной связи.

Фигура 2 представляет собой окрашенный Кумасси синим гель, показывающий экспрессию и очистку мутантов по гликозилированию.

10 На фигуре 3 изображены результаты экспериментов поверхностного плазмонного резонанса, использованных для оценки связывания мутантов антитела $\alpha\beta$ TCR HEBE1 IgG с рекомбинантным Fc γ RIIIa (V158 и F158) человека.

На фигуре 4 изображены результаты экспериментов поверхностного плазмонного резонанса, использованных для оценки связывания мутантов антитела $\alpha\beta$ TCR HEBE1 IgG с рекомбинантным Fc γ RI человека.

На фигуре 5 изображен профиль высвобождения цитокинов из PBMC для TNFa, GM-CSF, IFNy и IL10 в присутствии мутантных антител анти- $\alpha\beta$ TCR (сутки 2).

На фигуре 6 изображен профиль высвобождения цитокинов из PBMC для IL6, IL4 и IL2 в присутствии мутантных антител анти- $\alpha\beta$ TCR (сутки 2).

20 На фигуре 7 изображен профиль высвобождения цитокинов из PBMC для TNFa, GM-CSF, IFNy и IL10 в присутствии мутантных антител анти- $\alpha\beta$ TCR (сутки 4).

На фигуре 8 изображен профиль высвобождения цитокинов из PBMC для IL6, IL4 и IL2 в присутствии мутантных антител анти- $\alpha\beta$ TCR (сутки 4).

На фигуре 9 изображены результаты экспериментов, исследующих уровень экспрессии 2C3 посредством Вестерн-блоттинга и поверхностного плазмонного резонанса.

На фигуре 10 изображены результаты экспериментов, исследующих гликозилирование мутантов 2C3 до и после обработки PNGase F.

На фигуре 11 изображены результаты экспериментов в SDS-PAGE, исследующих участки гликозилирования на мутантах 2C3, выделенных из культуры клеток.

30 На фигуре 12 изображены результаты экспериментов поверхностного плазмонного резонанса, использованных для оценки связывания модифицированного анти-CD52 с рекомбинантным Fc γ RIIIa (V158) человека. Анти-CD52, содержащее мутации S298N/Y300S в домене Fc, использовали для оценки эффекторной функции модифицированной молекулы, связывания с пептидом CD52 (A), связывания с Fc γ RIIIa (V158, B) и

35 контрольного связывания с FcRn (C) мыши.

На фигуре 13 изображены результаты экспериментов поверхностного плазмонного резонанса, исследующих свойства связывания Fc мутантов 2C3.

На фигуре 14 изображены результаты экспериментов поверхностного плазмонного резонанса, исследующих связывание модифицированного анти-CD52 как с Fc γ RIIIa (Val158) (как выше), так и с Fc γ RIIIa (Phe158). Антитела против CD52, содержащие мутации S298N/Y300S в домене Fc, использовали для оценки эффекторной функции модифицированной молекулы, связывающейся с Fc γ RIIIa (Val158, фиг. 14A) и Fc γ RIIIa (Phe158, фиг. 14B).

40 На фигуре 15 изображен анализ связывания C1q для мутанта S298N/Y300S и контроля WT 2C3 (A), и результаты анализа Eliza, подтверждающие эквивалентное покрытие лунок.

На фигуре 16 изображены результаты экспериментов плазмонного резонанса, измеряющих кинетику связывания мутантов 2C3 с пептидом 741 CD-52.

На фигуре 17 изображены результаты экспериментов плазмонного резонанса, сравнивающих аффинность связывания антигена для анти-CD-52 2C3 WT и мутанта A114N с гипергликозилированием.

На фигурах 18(A-D) изображены результаты экспериментов характеризации заряда изоэлектрическим фокусированием и масс-спектрометрией для определения содержания гликанов мутантов 2C3.

На фигуре 19 изображены результаты экспериментов определения концентрации (Octet) и плазмонного резонанса, сравнивающих аффинность связывания антигена для анти-CD52 2C3 WT и мутантов.

На фигуре 20 показаны результаты экспериментов SDS-PAGE, чтобы продемонстрировать дополнительное гликозилирование мутанта A114N анти-TEM1.

На фигуре 21 показаны результаты анализа SDS-PAGE и хроматографии гидрофобного взаимодействия мутанта A114N анти-Her2.

На фигуре 22 показаны результаты экспериментов SDS-PAGE, чтобы продемонстрировать конъюгацию PEG с мутантом A114N 2C3 через аминоокси-связь.

На фигуре 23 показаны результаты экспериментов LC-MS для определения содержания гликанов A114N мутанта анти-TEM1 с гипергликозилированием.

На фигуре 24 показаны результаты экспериментов LC-MS для определения содержания гликанов антитела анти-HER2 дикого типа и мутанта A114N анти-Her2 с гипергликозилированием.

На фигурах 25(A-C) изображен иллюстративный способ осуществления сайт-специфической конъюгации антитела в соответствии со способами по изобретению.

На фигуре 26 изображен синтез иллюстративных эффекторных групп по изобретению: аминоокси-Cys-MC-VC-PABC-MMAE и аминоокси-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol110.

На фигуре 27 изображена информация по характеризации сиалированного антитела против HER2.

На фигурах 28(A-D) изображена информация по характеризации окисленного сиалированного антитела анти-HER2.

На фигурах 29(A-D) изображены хроматограммы гидрофобного взаимодействия гликоконъюгатов, полученных с тремя различными сиализованными антителами с двумя различными аминооксигруппами.

На фигурах 30(A-C) показана хроматограмма НС сиалированного антитела, успешно конъюгированного с аминоокси-дериативизированным токсином MMAE (АО-ММАЕ) через сконструированный гликан, присутствующий в сконструированном участке гликозилирования A114N.

На фигурах 31(A-D) изображено сравнение активности *in vitro* гликоконъюгата и тиолового конъюгата анти-HER2.

На фигуре 32 изображено сравнение активности *in vitro* гликоконъюгата и тиолового конъюгата анти-FAP B11.

На фигурах 33(A-D) изображено сравнение эффективности *in vivo* гликоконъюгатов и тиоловых конъюгатов анти-HER2 в модели ксенотрансплантата Her2+ клеток опухоли.

На фигуре 34 изображены результаты экспериментов LC-MS для определения содержания гликанов мутантного антитела анти- $\alpha\beta$ TCR, содержащего мутацию S298N/Y300S.

На фигуре 35 изображены результаты экспериментов кругового дихроизма для определения относительной термостабильности антитела анти- $\alpha\beta$ TCR дикого типа и мутантного антитела анти- $\alpha\beta$ TCR, содержащего мутацию S298N/Y300S.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Настоящее описание относится к связывающим полипептидам (например, антителам) и их конъюгатам с эффекторной группой, содержащим домен СН1 (например, домен СН1 IgG1 человека), где домен СН1 обладает сконструированным участком N-связанного гликозилирования в положении аминокислоты 114, в соответствии с 5 нумерацией Kabat. Настоящее описание относится также к нуклеиновым кислотам, кодирующими антигенсвязывающие полипептиды, рекомбинантным экспрессирующими векторам и клеткам-хозяевам для получения таких антигенсвязывающих полипептидов. Представлены также способы использования антигенсвязывающих полипептидов, описанных в настоящем документе, для лечения заболевания.

10 I. Определения

Как применяют в настоящем документе, термин «связывающий белок» или «связывающий полипептид» могут относиться к полипептиду (например, антителу), содержащему по меньшей мере один участок связывания, являющийся ответственным за избирательное связывание с представляющим интерес антигеном-мишенью (например, 15 антигеном человека). Иллюстративные участки связывания включают вариабельный домен антитела, участок связывания лиганда из рецептора или участок связывания рецептора из лиганда. В конкретных аспектах связывающие полипептиды по изобретению содержат множество (например, два, три, четыре или более) участков связывания.

20 Как применяют в настоящем документе, термин «природный остаток» может относиться к аминокислотному остатку, который встречается в природе в конкретном положении аминокислоты связывающего полипептида (например, антитела или его фрагмента) и который не был модифицирован, введен или изменен человеком. Как применяют в настоящем документе, термин «измененный связывающий белок» или 25 «измененный связывающий полипептид» включает связывающие полипептиды (например, антитело или его фрагмент), содержащие по меньшей мере один неприродный мутантный аминокислотный остаток.

30 Термин «специфически связывает», как применяют в настоящем документе, относится к способности антитела или его антигенсвязывающего фрагмента связывать антиген с константой диссоциации (K_d) не более приблизительно $1 \times 10^{-6} M$, $1 \times 10^{-7} M$, $1 \times 10^{-8} M$, $1 \times 10^{-9} M$, $1 \times 10^{-10} M$, $1 \times 10^{-11} M$, $1 \times 10^{-12} M$ или менее, и/или связывать антиген с аффинностью, по меньшей мере в два раза превышающей его аффинность для неспецифического антигена.

35 Как применяют в настоящем документе, термин «антитело» относится к таким соединениям (например, интактным молекулам антител, фрагментам антител или их вариантам), обладающим значительной известной иммунореактивной активностью для представляющего интерес антигена (например, опухолеассоциированного антигена). Антитела и иммуноглобулины содержат легкие и тяжелые цепи, с межцепевой 40 ковалентной связью между ними или без нее. Основные структуры иммуноглобулинов в системах позвоночных относительно хорошо известны.

45 Как более подробно обсуждают ниже, общий термин «антитело» включает пять различных классов антител, которые можно различать биохимически. Все пять классов антител явно входят в объем настоящего описания, следующее обсуждение в основном направлено на класс IgG молекул иммуноглобулинов. В отношении IgG, иммуноглобулины содержат две идентичных легких цепи молекулярной массой приблизительно 23000 Дальтон и две идентичных тяжелых цепи молекулярной массой 53000-70000. Четыре цепи соединены дисульфидными связями в конфигурации «Y», где легкие цепи охватывают тяжелые цепи, начиная с сужения «Y» и продолжая на

протяжении вариабельной области.

Легкие цепи иммуноглобулинов классифицируют какkapпа либо лямбда (κ, λ).

Каждый класс тяжелой цепи может быть связан либо с каппа, либо с лямбда легкой цепью. Как правило, легкие и тяжелые цепи ковалентно связаны друг с другом, и

5 «хвостовые» части двух тяжелых цепей связаны друг с другом посредством ковалентных дисульфидных связей или нековалентных связей, когда иммуноглобулины получены посредством гибридом, В-клеток или полученных с помощью генной инженерии клеток-хозяев. В тяжелой цепи аминокислотные последовательности проходят от N-конца на раздвоенном конце конфигурации Y до C-конца внизу каждой цепи. Специалистам в

10 данной области понятно, что тяжелые цепи классифицируют как гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон, ($\gamma, \mu, \alpha, \delta, \epsilon$) с некоторыми подклассами среди них (например, γ_1 - γ_4). Природа этой цепи является тем, что определяет «класс» антитела как IgG, IgM, IgA IgG или IgE, соответственно. Подклассы изотипов иммуноглобулинов (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и т.д.) хорошо охарактеризованы и, как известно, придают 15 функциональную специализацию. Модифицированные варианты каждого из этих классов и изотипов легко может распознать специалист в данной области в свете настоящего описания и, соответственно, они входят в объем настоящего описания.

Как легкие, так и тяжелые цепи разделены на области структурной и функциональной гомологии. Термин «область» относится к части или порции цепи иммуноглобулина 20 или антитела и включает константную область или вариабельные области, так же как более дискретные части или порции указанных областей. Например, вариабельные области легкой цепи включают «определяющие комплементарность области» или «CDR», вкрапленные в «каркасные области» или «FR», как определено в настоящем документе.

25 Области тяжелой или легкой цепи иммуноглобулина можно определять как «константную» (C) область или «вариабельные» (V) области, на основании относительного отсутствия разнообразия последовательности внутри областей различных членов класса в случае «константной области», или значительного разнообразия внутри областей различных членов класса в случае «вариабельных 30 областей». Термины «константная область» и «вариабельная область» также можно использовать функционально. В этом отношении, следует понимать, что вариабельные области иммуноглобулина или антитела определяют узнавание антигена и специфичность. И наоборот, константные области иммуноглобулина или антитела придают важные эффекторные функции, такие как секреция, трансплacentарная 35 подвижность, связывание Fc-рецептора, связывание комплемента и т.п. Субъединичные структуры и трехмерные конфигурации константных областей различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

40 Константные и вариабельные области тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов свернуты в домены. Термин «домен» относится к глобулярной области тяжелой или легкой цепи, содержащей пептидные петли (например, содержащей 3-4 пептидные петли), стабилизированные, например, посредством β -складчатого листа и/или межцепьевой дисульфидной связи. Домены константной области легкой цепи иммуноглобулина обозначают взаимозаменяя как «домены константной области легкой цепи», «области CL» или «домены CL». Константные домены на тяжелой цепи (например, шарнирном, CH1, CH2 или CH3 доменах) обозначают взаимозаменяя как «домены константной области тяжелой цепи», домены области «CH» или «домены 45 CH». Вариабельные домены на легкой цепи обозначают взаимозаменяя как «домены вариабельной области легкой цепи», «домены области VL» или «домены VL».

Вариабельные домены на тяжелой цепи обозначают взаимозаменяющими «домены вариабельной области тяжелой цепи», «домены области VH» или «домены VH».

Обычно нумерация вариабельных доменов константной области увеличивается, когда они становятся более удаленными от антигенсвязывающего участка или амино-
5 конца иммуноглобулина или антитела. N-конец каждой тяжелой и легкой цепи иммуноглобулина представляет собой вариабельную область, и на C-конце находится константная область; домены CH3 и CL действительно содержат карбокси-конец тяжелой и легкой цепи, соответственно. Соответственно, домены легкой цепи иммуноглобулина аранжированы в ориентации VL-CL, в то время как домены тяжелой 10 цепи аранжированы в ориентации VH-CH1-шарнир-CH2-CH3.

Положения аминокислот в константной области тяжелой цепи, включая положения аминокислот в CH1, шарнирном, CH2, CH3 и CL доменах, можно нумеровать в соответствии с системой нумерации индексов Kabat (см. Kabat et al, в «Sequences of Proteins of Immunological Interest», U.S. Dept. Health and Human Services, 5th edition, 1991).

15 Альтернативно, положения аминокислот антитела можно нумеровать в соответствии с системой нумерации индексов EU (см. Kabat et al, там же).

Как применяют в настоящем документе, термин «домен VH» включает аминоконцевой вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, и термин «домен VL» включает аминоконцевой вариабельный домен легкой цепи иммуноглобулина.

20 Как применяют в настоящем документе, термин «домен CH1» включает первый (наиболее близкий к амино-концу) домен константной области тяжелой цепи иммуноглобулина, который продолжается, например, от приблизительно положений 114-223 в системе нумерации Kabat (положения EU 118-215). Домен CH1 является соседним к домену VH и находится на амино-конце от шарнирной области молекулы 25 тяжелой цепи иммуноглобулина, и не формирует часть Fc-области тяжелой цепи иммуноглобулина.

Как применяют в настоящем документе, термин «шарнирная область» включает часть молекулы тяжелой цепи, соединяющую домен CH1 с доменом CH2. Эта шарнирная область содержит приблизительно 25 остатков и является гибкой, таким образом, 30 позволяя двум N-концевым антигенсвязывающим областям двигаться независимо. Шарнирные области можно подразделять на три отдельных домена: верхний, средний и нижний шарнирный домены (Roux et al. J. Immunol. 1998, 161:4083).

Как применяют в настоящем документе, термин «домен CH2» включает часть тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина, продолжающуюся, например, приблизительно от 35 положений 244-360 в системе нумерации Kabat (положения EU 231-340). Домен CH2 является уникальным в том, что он не является близко спаренным с другим доменом. Вместо этого, две N-связанных разветвленных углеводных цепи вкрашены между двумя доменами CH2 интактной природной молекулы IgG. В одном варианте осуществления связывающий полипептид из настоящего описания содержит домен 40 CH2, происходящий из молекулы IgG1 (например, молекулы IgG1 человека).

Как применяют в настоящем документе, термин «домен CH3» включает часть тяжелой цепи молекулы иммуноглобулина, продолжающуюся приблизительно 110 остатков от N-конца домена CH2, например, от приблизительно положений 361-476 системы нумерации Kabat (положения EU 341-445). Домен CH3, как правило, формирует C-45 концевую часть антитела. В некоторых иммуноглобулинах, однако, дополнительные домены могут продолжаться от домена CH3 для формирования C-концевой части молекулы (например, домен CH4 в цепи μ IgM и цепи ϵ IgE). В одном варианте осуществления связывающий полипептид по настоящему описанию содержит домен

CH3, происходящий из молекулы IgG1 (например, молекулы IgG1 человека).

Как применяют в настоящем документе, термин «домен CL» включает домен константной области легкой цепи иммуноглобулина, продолжающийся, например, приблизительно от положения Kabat 107A-216. Домен CL является соседним с доменом 5 VL. В одном варианте осуществления связывающий полипептид из настоящего описания содержит домен CL, происходящий из легкой цепи каппа (например, легкой цепи каппа человека).

Как применяют в настоящем документе, термин «область Fc» определяют как часть константной области тяжелой цепи, начинающуюся в шарнирной области

10 непосредственно перед участком расщепления папаином (т.е. остатком 216 в IgG, принимая первый остаток константной области тяжелой цепи являющимся 114) и заканчивающуюся на C-конце антитела. Соответственно, полная область Fc содержит по меньшей мере шарнирный домен, домен CH2 и домен CH3.

Термин «природный Fc», как применяют в настоящем документе, относится к

15 молекуле, содержащей последовательность не связывающего антиген фрагмента, полученную в результате расщепления антитела или полученную другими способами, либо в мономерной, либо в мультимерной форме, и могущую содержать шарнирную область. Исходный иммуноглобулиновый источник природного Fc предпочтительно имеет человеческое происхождение и может представлять собой любой из

20 иммуноглобулинов, хотя IgG1 и IgG2 являются предпочтительными. Природные молекулы Fc состоят из мономерных полипептидов, которые могут быть связаны в димерные или мультимерные формы посредством ковалентной (т.е., дисульфидных связей) и нековалентной ассоциации. Количество межмолекулярных дисульфидных связей между мономерными субъединицами природных молекул Fc лежит в диапазоне 25 от 1 до 4 в зависимости от класса (например, IgG, IgA и IgE) или подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1 и IgA2). Одним примером природного Fc является связанный дисульфидными связями димер, возникающий в результате расщепления папаином IgG. Термин «природный Fc», как применяют в настоящем документе, является общим для мономерных, димерных и мультимерных форм.

30 Термин «вариант Fc», как применяют в настоящем документе, относится к молекуле или последовательности, которая является модифицированной из природного Fc, но еще содержит участок связывания для рецептора спасения, FcRn (неонатального рецептора Fc). Иллюстративные варианты Fc и их взаимодействие с рецептором спасения известны в данной области. Таким образом, термин «вариант Fc» может включать

35 молекулу или последовательность, являющуюся гуманизированной из не относящегося к человеку природного Fc. Более того, природный Fc содержит области, которые можно удалять, поскольку они обеспечивают структурные свойства или биологическую активность, которые не являются необходимыми для антителоподобных связывающих полипептидов по изобретению. Таким образом, термин «вариант Fc» включает молекулу

40 или последовательность, в которой отсутствуют один или несколько природных участков или остатков Fc, или в которых модифицированы один или несколько участков или остатков Fc, которые влияют на: (1) формирование дисульфидной связи, (2) несовместимость с избранной клеткой-хозяином, (3) N-концевую гетерогенность при экспрессии в избранной клетке-хозяине, (4) гликозилирование, (5) взаимодействие с 45 комплементом, (6) связывание рецептора Fc, отличного от рецептора спасения, или (7) антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC), или вовлечены в них.

Термин «домен Fc», как применяют в настоящем документе, включает природный Fc и варианты и последовательности Fc, как определено выше. Как для вариантов Fc,

так и для природных молекул Fc, термин «домен Fc» включает молекулы в мономерной или мультимерной форме, либо выщепленные из полноразмерного антитела, либо полученные другими способами.

Как указано выше, вариабельные области антитела позволяют ему избирательно

- 5 узнавать и специфически связывать эпитопы на антигенах. То есть, домен VL и домен VH антитела объединяются для формирования вариабельной области (Fv), определяющей трехмерный антигенсвязывающий участок. Эта четверичная структура антитела формирует антигенсвязывающий участок, присутствующий на конце каждого плеча Y. Более конкретно, антигенсвязывающий участок определен тремя
- 10 определяющими комплементарность областями (CDR) на каждой из вариабельных областей тяжелой и легкой цепи. Как применяют в настоящем документе, термин «антigenсвязывающий участок» включает участок, который специфически связывает антиген (является иммунореактивным для антигена) (например, антигена поверхности клеток или растворимого антигена). Антигенсвязывающий участок включает
- 15 вариабельную область тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулина, и участок связывания, сформированный этими вариабельными областями, определяет специфичность антитела. Антигенсвязывающий участок формируется вариабельными областями, которые меняются от одного антитела к другому. Измененные антитела по настоящему описанию содержат по меньшей мере один антигенсвязывающий участок.

- 20 В конкретных вариантах осуществления связывающие полипептиды по настоящему описанию содержат по меньшей мере два антигенсвязывающих домена, обеспечивающих ассоциацию связывающего полипептида с избранным антигеном. Антигенсвязывающие домены не обязательно должны происходить из одной и той же молекулы иммуноглобулина. В этом отношении, вариабельная область может происходить или
- 25 происходит из любого типа животного, у которого можно индуцировать установление гуморального ответа и образование иммуноглобулинов против желательного антигена. В этой связи, вариабельная область связывающего полипептида может происходить, например, из относящегося к млекопитающим источника, например, может являться человеческой, мышью, крысины, козьей, овчье, может происходить из
- 30 нечеловекообразного примата (такого как яванские макаки, макаки и т.д.), волчьих или верблюдов (например, из верблюдов, лам и родственных видов).

- 35 В природных антителах шесть CDR, присутствующих на каждом мономерном антителе, представляют собой короткие, не непрерывные последовательности аминокислот, которые специфически расположены для формирования антигенсвязывающего участка, когда антитело принимает его трехмерную конфигурацию в водном окружении. Для остальной части тяжелых и легких вариабельных доменов показана меньшая межмолекулярная изменчивость аминокислотной последовательности, и они названы каркасными областями. Каркасные области большей частью принимают конформацию β -листа, и CDR формируют петли, которые соединяют структуру β -листа, и в некоторых случаях формируют ее часть. Таким образом, эти каркасные области действуют для формирования каркаса, который обеспечивает расположение шести CDR в правильной ориентации посредством межцепьевых нековалентных взаимодействий. Антигенсвязывающий домен, сформированный расположенными CDR, определяет поверхность, комплементарную
- 40 45 эпитопу на иммунореактивном антигене. Эта комплементарная поверхность стимулирует нековалентное связывание антитела с эпитопом иммунореактивного антигена.

Иллюстративные связывающие полипептиды по изобретению включают варианты антител. Как применяют в настоящем документе, термин «вариант антитела» включает

синтетические и сконструированные формы антител, измененные таким образом, что они не встречаются в природе, например, антитела, которые содержат по меньшей мере две части тяжелой цепи, но не две полные тяжелые цепи (например, антитела с делетированным доменом или миниантитела); мультиспецифические формы антител (например, биспецифические, триспецифические и т.д.), измененные для связывания с двумя или более различными антигенами или с различными эпитопами на одном антигене); молекулы тяжелой цепи, соединенные с молекулами scFv, и т.п.. Кроме того, термин «вариант антитела» включает мультивалентные формы антител (например, трехвалентные, тетравалентные и т.д., антитела, которые связываются с тремя, четырьмя 10 или более копиями одного и того же антигена).

Как применяют в настоящем документе, термин «валентность» относится к количеству потенциальных участков связывания мишени в полипептиде. Каждый участок связывания мишени специфически связывает одну молекулу-мишень или специфический участок на молекуле-мишени. Когда полипептид содержит более одного 15 участка связывания мишени, каждый участок связывания мишени может специфически связывать одинаковые или различные молекулы (например, может связываться с различными лигандами или различными антигенами, или различными эпитопами на одном и том же антигене). Рассматриваемые связывающие полипептиды предпочтительно обладают по меньшей мере одним участком связывания, 20 специфическим для молекулы антигена человека.

Термин «специфичность» относится к способности специфически связываться с (например, вступать в иммунологическую реакцию с) данным антигеном-мишенью (например, с антигеном-мишенью человека). Связывающий полипептид может являться 25 моноспецифическим и содержать один или несколько участков связывания, которые специфически связывают мишень, или полипептид может являться мультиспецифическим и содержать два или более участков связывания, которые специфически связывают одинаковые или различные мишени. В конкретных вариантах осуществления связывающий полипептид по изобретению является специфическим для двух различных (например, неперекрывающихся) частей одной и той же мишени. В конкретных 30 вариантах осуществления, связывающий полипептид по изобретению является специфическим для более, чем одной мишени. Иллюстративные связывающие полипептиды (например, антитела), содержащие антигенсвязывающие участки, которые связываются с антигенами, экспрессированными на клетках опухолей, известны в данной области, и одну или несколько CDR из таких антител можно включать в антитело 35 по изобретению.

Термин «связывающая группа» включает группы, способные связывать эффекторную группу со связывающими полипептидами, описанными в настоящем документе. Связывающую группу можно выбирать таким образом, что она является отщепляемой (например, ферментативно отщепляемой или pH-чувствительной) или неотщепляемой. 40 Иллюстративные связывающие группы указаны в таблице 2 в настоящем документе.

Как применяют в настоящем документе, термин «эффекторная группа» включает средства (например, белки, нуклеиновые кислоты, липиды, углеводы, гликопептиды, группы лекарственного средства и их фрагменты) с биологической или другой функциональной активностью. Например, модифицированный связывающий 45 полипептид, содержащий эффекторную группу, конъюгированную со связывающим полипептидом, обладает по меньшей мере одной дополнительной функцией или свойством по сравнению с неконъюгированным антителом. Например, конъюгация цитотоксического лекарственного средства (например, эффекторной группы) со

связывающим полипептидом приводит к формированию связывающего полипептида с цитотоксичностью лекарственного средства в качестве второй функции (т.е. в дополнение к связыванию антигена). В другом примере, конъюгация второго связывающего полипептида со связывающим полипептидом может обеспечивать

- 5 дополнительные связывающие свойства. В конкретных вариантах осуществления, где эффекторная группа представляет собой генетически кодированный терапевтический или диагностический белок или нуклеиновую кислоту, эффекторную группу можно синтезировать или экспрессировать посредством либо синтеза пептидов, либо способов рекомбинантной ДНК, которые хорошо известны в данной области. В другом аспекте, 10 где эффекторная группа представляет собой негенетически кодированный пептид или группу лекарственного средства, эффекторную группу можно синтезировать искусственно или очищать из природного источника. Как применяют в настоящем документе, термин «группа лекарственного средства» включает противовоспалительные, противораковые, противоинфекционные (например, антигрибковые, антибактериальные, 15 антипаразитические, антивирусные и т.д.), и анестетические лекарственные средства. В следующем варианте осуществления группа лекарственного средства представляет собой противораковое или цитотоксическое средство. Совместимые группы лекарственного средства могут также содержать пролекарства. Иллюстративные эффекторные группы указаны в таблице 1 в настоящем документе.

- 20 В конкретных вариантах осуществления, «эффекторная группа» включает «нацеливающую группу». Как применяют в настоящем документе, термин «нацеливающая группа» относится к эффекторной группе, которая связывается с молекулой-мишенью. Нацеливающие группы могут включать, без ограничения, белки, нуклеиновые кислоты, липиды, углеводы (например, гликаны) и их комбинации 25 (например, гликопротеины, гликопептиды и гликолипиды).

Как применяют в настоящем документе, термин «пролекарство» относится к форме предшественника или производного фармацевтически активного средства, которая является менее активной, реакционноспособной или устойчивой к побочным эффектам по сравнению с исходным лекарственным средством и является способной подвергаться 30 ферментативной активации или конвертации иным образом в более активную форму *in vivo*. Пролекарства, совместимые с композициями по настоящему описанию, включают, но без ограничения, содержащие фосфат пролекарства, содержащие аминокислоту пролекарства, содержащие тиофосфат пролекарства, содержащие сульфат пролекарства, содержащие пептид пролекарства, содержащие β -лактам пролекарства, 35 содержащие необязательно замещенный феноксиацетамид пролекарства или содержащие необязательно замещенный фенилацетамид пролекарства, 5-фторцитозин и другие 5-фторуридиновые пролекарства, которые можно конвертировать в более активное цитотоксическое свободное лекарственное средство. Специалист в данной области может выполнять химические модификации желательной группы лекарственного 40 средства или его пролекарства, чтобы сделать реакции этого соединения более пригодными для целей получения модифицированных связывающих полипептидов по настоящему описанию. Группы лекарственного средства включают также производные, фармацевтически приемлемые соли, сложные эфиры, амиды и простые эфиры групп лекарственного средства, описанных в настоящем документе. Производные включают 45 модификации лекарственных средств, идентифицированных в настоящем документе, которые могут улучшать или не снижать значительно конкретную желательную терапевтическую активность лекарственного средства.

Как применяют в настоящем документе, термин «противораковое средство» включает

средства, которые являются вредными для роста и/или пролиферации неопластических клеток или клеток опухолей и могут действовать для снижения, ингибирования или разрушения злокачественного новообразования. Примеры таких средств включают, но без ограничения, цитостатические средства, алкилирующие средства, антибиотики,

- 5 цитотоксические нуклеозиды, связывающие тубулин вещества, гормоны, антагонисты гормонов, цитотоксические средства и т.п. Цитотоксические средства включают производные томаймицина, производные майтанзина, производные криптофицина, производные антрациклина, производные бисфосфоната, производные лептомицина, производные стрептонигрина, производные ауристатина и производные дуокармицина.
- 10 Любое средство, действующее для задержки или замедления роста иммунореактивных клеток или злокачественных клеток, входит в объем настоящего описания.

15 Термин «антиген» или «антиген-мишень», как применяют в настоящем документе, относится к молекуле или части молекулы, способной быть связанный участком связывания связывающего полипептида. Антиген-мишень может обладать одним или

II. Связывающие полипептиды

20 В одном аспекте настоящее описание относится к связывающим полипептидам (например, антителам, фрагментам антител, вариантам антител и слитым белкам), содержащим по меньшей мере один домен СН1, обладающий участком N-связанного гликозилирования в положении 114, в соответствии с нумерацией Kabat.

25 Домены СН1 из любого класса (например, IgM, IgG, IgD, IgA и IgE) и видов иммуноглобулинов можно использовать в связывающих полипептидах, описанных в настоящем документе. Химерные домены СН1, содержащие части доменов СН1 из различных видов или классов Ig, также можно использовать. В конкретных вариантах 30 осуществления домен СН1 представляет собой домен СН1 IgG1 человека. В случае домена IgG1 человека, мутация аминокислоты дикого типа в положении 114 до аспарагина приводит к формированию консенсусного участка N-связанного гликозилирования (т.е., сиквона N-X-T/S, где X представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина). Однако, в случае других доменов СН1 из других видов, и/или классов 35 или изотипов Ig, специалисту в данной области понятно, что может быть необходимо вносить мутации в положения 115 и/или 116 домена СН1 для получения сиквона N-X-T/S.

Связывающие полипептиды, описанные в настоящем документе, включают любой связывающий полипептид, содержащий домен СН1, обладающий участком N-связанного 40 гликозилирования в положении 114, в соответствии с нумерацией Kabat.

В конкретных вариантах осуществления связывающий полипептид представляет собой антитело, или его фрагмент или производное. Любое антитело из любого источника или видов можно использовать в связывающих полипептидах, описанных в настоящем документе. Пригодные антитела включают, без ограничения, антитела человека, гуманизированные антитела или химерные антитела.

В конкретных вариантах осуществления связывающий полипептид по настоящему описанию может содержать антигенсвязывающий фрагмент антитела. Термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к полипептидному фрагменту иммуноглобулина или антитела, который связывает антиген или конкурирует с 45 интактным антителом (т.е., с интактным антителом, из которого они происходят) за связывание антигена (т.е., специфическое связывание). Антигенсвязывающие фрагменты можно получать рекомбинантными или биохимическими способами, которые хорошо известны в данной области. Иллюстративные антигенсвязывающие фрагменты

включают Fv, Fab, Fab' и (Fab')2. В предпочтительных вариантах осуществления, антигенсвязывающий фрагмент по настоящему описанию представляет собой измененный антигенсвязывающий фрагмент, содержащий по меньшей мере один сконструированный участок гликозилирования. В одном иллюстративном варианте 5 осуществления измененный антигенсвязывающий фрагмент по настоящему описанию содержит измененный домен VH, описанный выше. В другом иллюстративном варианте осуществления измененный антигенсвязывающий фрагмент по настоящему описанию содержит измененный домен CH1, описанный выше.

В иллюстративных вариантах осуществления связывающий полипептид содержит

10 последовательность одноцепочечной вариабельной области (ScFv). Последовательности одноцепочечной вариабельной области содержат отдельный полипептид, обладающий одним или несколькими антигенсвязывающими участками, например, доменом VL, связанным с гибким линкером с доменом VH. Молекулы ScFv можно конструировать в ориентации VH-линкер-VL или в ориентации VL-линкер-VH. Гибкий шарнир, 15 связывающий домены VL и VH, которые составляют антигенсвязывающий участок, предпочтительно содержит от приблизительно 10 до приблизительно 50 аминокислотных остатков. Соединяющие пептиды известны в данной области. Связывающий полипептид по изобретению может содержать по меньшей мере один scFv и/или по меньшей мере одну константную область. В одном варианте осуществления связывающий полипептид 20 по настоящему описанию может содержать по меньшей мере один scFv, связанный или слитый с антителом или фрагментом, содержащим домен CH1 (например, домен CH1, содержащий остаток аспарагина в положении Kabat 114) и/или домен CH2 (например, домен CH2, содержащий остаток аспарагина в положении EU 298, и остаток серина или треонина в положении EU 300).

25 В конкретных иллюстративных вариантах осуществления связывающий полипептид по настоящему описанию представляет собой мультивалентное (например, тетравалентное) антитело, которое получено слиянием последовательности ДНК, кодирующей антитело, с молекулой ScFv (например, измененной молекулой ScFv). Например, в одном варианте осуществления, эти последовательности скомбинированы 30 так, что молекула ScFv (например, измененная молекула ScFv) связана на ее N-конце или C-конце с фрагментом Fc антитела через гибкий линкер (например, линкер gly/ser). В другом варианте осуществления тетравалентное антитело по настоящему описанию можно получать слиянием молекулы ScFv с соединительным пептидом, слитым с доменом CH1 (например, доменом CH1, содержащим остаток аспарагина в положении Kabat 114), для конструирования тетравалентной молекулы ScFv-Fab.

35 В другом варианте осуществления связывающий полипептид по настоящему описанию представляет собой измененное миниантитело. Измененные миниантитела по настоящему описанию представляют собой димерные молекулы, состоящие из двух полипептидных цепей, где каждая содержит молекулу ScFv (например, измененную 40 молекулу ScFv, содержащую домен VH, описанный выше), слитую с доменом CH3 или его частью через соединительный пептид. Миниантитела можно получать посредством конструирования компонента ScFv и соединения компонентов пептид-CH3 с использованием способов, описанных в данной области (см., например, Патент США 5837821 или WO 94/09817 A1). В другом варианте осуществления, можно конструировать 45 тетравалентное миниантитело. Тетравалентные миниантитела можно конструировать таким же способом, как миниантитела, за исключением того, что две молекулы ScFv связывают с использованием гибкого линкера. Связанную конструкцию scFv-scFv затем соединяют с доменом CH3.

В другом варианте осуществления связывающий полипептид по настоящему описанию содержит диатело. Диатела представляют собой димерные, тетравалентные молекуламолекулы, где каждая обладает полипептидом, сходным с молекулами scFv, но обычно обладает коротким линкером из аминокислотных остатков (менее 10 и 5 предпочтительно 1-5), соединяющим оба вариабельных домена, так что домены VL и VH на одной и той же полипептидной цепи не могут взаимодействовать. Вместо этого, домен VL и VH одной полипептидной цепи взаимодействуют с доменом VH и VL (соответственно) на второй полипептидной цепи (см., например, WO 02/02781). Диатела по настоящему описанию содержат молекулу scFv, слитую с доменом CH3.

10 В других вариантах осуществления связывающие полипептиды по изобретению содержат мультиспецифические или мультивалентные антитела, содержащие один или несколько вариабельных доменов в сериях на одной и той же полипептидной цепи, например, полипептиды тандемных вариабельных доменов (TVD). Иллюстративные полипептиды TVD включают конфигурацию «двойной головки» или «двойного Fv», 15 описанные в Патенте США No. 5989830. В конфигурации двойного Fv, вариабельные домены двух различных антител экспрессированы в тандемной ориентации на двух отдельных цепях (одной тяжелой цепи и одной легкой цепи), где одна полипептидная цепь обладает двумя доменами VH в сериях, разделенных пептидным линкером (VH1-линкер-VH2), и другая полипептидная цепь состоит из комплементарных доменов VL, 20 соединенных в сериях пептидным линкером (VL1-линкер-VL2). В конфигурации перекрестной двойной головки, вариабельные домены двух различных антител экспрессированы в тандемной ориентации на двух отдельных полипептидных цепях (одной тяжелой цепи и одной легкой цепи), где одна полипептидная цепь обладает двумя доменами VH в сериях, разделенных пептидным линкером (VH1-линкер-VH2), и другая 25 полипептидная цепь состоит из комплементарных доменов VL, соединенных в сериях пептидным линкером в обратной ориентации (VL2-линкер-VL1). Дополнительные варианты антител на основе формата «двойного-Fv» включает биспецифическое антитело IgG с двойным-вариабельным-доменом (DVD-IgG) (см. Патент США No. 7612181, и формат TBTI (см. US 2010/0226923 A1). Добавление константных доменов 30 к соответствующим цепям двойного Fv (CH1-Fc к тяжелой цепи и константного доменаkapпа или лямбда - к легкой цепи) приводит к функциональным биспецифическим антителам без какой-либо необходимости дополнительных модификаций (т.е., очевидного добавления константных доменов для усиления стабильности).

В другом иллюстративном варианте осуществления связывающий полипептид 35 содержит биспецифическое антитело IgG с перекрестным двойным вариабельным доменом (CODV-IgG) на основе конфигурации «двойной головки» (см. US 20120251541 A1, приведенной в настоящем документе путем ссылки в полном объеме). Варианты антитела CODV-IgG обладают одной полипептидной цепью с доменами VL, соединенных в сериях с доменом CL (VL1-L1-VL2-L2-CL), и второй полипептидной цепью с 40 комплементарными доменами VH, соединенными в сериях в обратной ориентации к домену CH1 (VH2-L3-VH1-L4-CH1), где полипептидные цепи формируют перекрестную пару легкая цепь-тяжелая цепь. В конкретном варианте осуществления, второй полипептид можно дополнительно соединять с доменом Fc (VH2-L3-VH1-L4-CH1-Fc). В конкретных вариантах осуществления линкер L3 по меньшей мере в два раза 45 превышает длину линкера L1, и/или линкер L4 по меньшей мере в два раза превышает длину линкера L2. Например, L1 и L2 могут составлять в длину 1-3 аминокислотных остатка, L3 может составлять в длину 2-6 аминокислотных остатков, и L4 может составлять в длину 4-7 аминокислотных остатков. Примеры пригодных линкеров

включают отдельный остаток глицина (Gly); пептид диглицина (Gly-Gly); трипептид (Gly-Gly-Gly); пептид с четырьмя остатками глицина (Gly-Gly-Gly-Gly); пептид с пятью остатками глицина (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly); пептид с шестью остатками глицина (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly); пептид с семью остатками глицина (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly);

- 5 пептид с восемью остатками глицина (Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly). Можно использовать другие комбинации аминокислотных остатков, такие как пептид Gly-Gly-Gly-Gly-Ser и пептид Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Ser.

В конкретных вариантах осуществления связывающий полипептид содержит молекулу иммуноадгезина, содержащую не относящуюся к антителу связывающую область

- 10 (например, рецептор, лиганд или молекулу клеточной адгезии), слитую с константной областью антитела (см. например, Ashkenazi et al., Methods, 1995 8(2), 104-115, полное содержание которого приведено в настоящем документе путем ссылки).

В конкретных вариантах осуществления связывающий полипептид содержит иммуноглобулиноподобные домены. Пригодные иммуноглобулиноподобные домены

- 15 включают, без ограничения, домены фибронектина (см., например, Koide et al. (2007), Methods Mol. Biol. 352: 95-109, полное содержание которого приведено в настоящем документе путем ссылки), DARPin (см., например, Stumpf et al. (2008) Drug Discov. Today 13 (15-16): 695-701, полное содержание которого приведено в настоящем документе путем ссылки), Z домены белка A (см., Nygren et al. (2008) FEBS J. 275 (11): 2668-76,

- 20 полное содержание которого приведено в настоящем документе путем ссылки), Lipocalins (см., например, Skerra et al. (2008) FEBS J. 275 (11): 2677-83, полное содержание которого приведено в настоящем документе путем ссылки), аффилины (см., например, Ebersbach et al. (2007) J. Mol. Biol. 372 (1): 172-85, полное содержание которого приведено в настоящем документе путем ссылки), аффитины (см., например, Krehenbrink et al. (2008).

- 25 J. Mol. Biol. 383 (5): 1058-68, полное содержание которого приведено в настоящем документе путем ссылки), авимеры (см., например, Silverman et al. (2005) Nat. Biotechnol. 23 (12): 1556-61, полное содержание которого приведено в настоящем документе путем ссылки), финомеры, (см., например, Grabulovski et al. (2007) J Biol Chem 282 (5): 3196-3204, полное содержание которого приведено в настоящем документе путем ссылки),

- 30 и пептиды с доменом Куница (см., например, Nixon et al. (2006) Curr Opin Drug Discov Devel 9 (2): 261-8, полное содержание которого приведено в настоящем документе путем ссылки).

III. N-связанные гликаны

В конкретных вариантах осуществления, домен CH1 связывающих полипептидов,

- 35 описанных в настоящем документе, является гликозилированным на сконструированном аргинине в положении 114 (N114), в соответствии с нумерацией Kabat. N-связанный гликан, как правило, связан через β -гликозиламидную связь с группой азота боковой цепи N114. Однако можно также использовать другие известные в данной области связи.

- 40 Любой тип природного или синтетического (т.е., неприродного) N-связанного гликана может быть связан с N114. Например, гликан может представлять собой природный гликан или сконструированный гликан, содержащий неприродные связи. В конкретных вариантах осуществления, гликан содержит сахарид, который можно окислять (например, посредством обработки периодатом) для получения группы, пригодной

- 45 для конъюгации с эффекторной группой (например, реакционноспособной альдегидной группы). Пригодные поддающиеся окислению сахариды включают, без ограничения, галактозу и сиаловую кислоту (например, N-ацетилнейраминовую кислоту). В конкретных вариантах осуществления гликан представляет собой двухантенный гликан.

В конкретных вариантах осуществления гликан представляет собой природную гликоформу млекопитающих.

Гликозилирования можно достигать любыми способами, известными в данной области. В конкретных вариантах осуществления гликозилирования достигают посредством экспрессии связывающих полипептидов в клетках, способных к N-связанному гликозилированию. Можно использовать любую природную или сконструированную клетку (например, прокариотическую или эукариотическую). Как правило, клетки млекопитающих используют для эффекта гликозилирования. N-гликаны, продуцированные в клетках млекопитающих обычно обозначают как комплексные N-гликаны (см. например, Drickamer K, Taylor ME (2006). *Introduction to Glycobiology*, 2nd ed., полное содержание которого приведено в настоящем документе путем ссылки). Эти комплексные N-гликаны обладают структурой, которая, как правило, имеет от двух до шести внешних ветвей с последовательностью сиалиллактозамина, связанными с внутренней коровой структурой $\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$. Комплексный N-гликан обладает по меньшей мере одной ветвью, и предпочтительно, по меньшей мере двумя, из перемежающихся остатков GlcNAc и галактозы (Gal), заканчивающихся олигосахаридами, например, такими как: NeuAc-; NeuAc α 2,6 GalNAc α 1-; NeuAc α 2,3 Gal.бета.1 3 GalNAc α 1-; и NeuAc α .2,3/6 Gal β 1,4 GlcNAc β 1.; Кроме того, сульфатные сложные эфиры могут возникать на остатках галактозы, GalNAc и GlcNAc, и фосфатные сложные эфиры могут возникать на остатках маннозы. NeuAc может являться O-ацетилированным или замененным NeuG1 (N-гликогилнейраминовая кислота). Комплексные N-гликаны могут также обладать внутрицепьевыми заменами GlcNAc в точках ветвления и коровой фукозы (Fuc).

Дополнительно или альтернативно, гликозилирование можно осуществлять или модифицировать посредством ферментативных способов, *in vitro*. Например, одну или несколько гликозилтрансфераз можно использовать для добавления специфических сахаридных остатков к N114, и одну или несколько гликозидаз можно использовать для удаления нежелательных сахаридов из N-связанного гликана. Такие ферментативные способы хорошо известны в данной области (см.. например, WO/2007/005786, полное содержание которого приведено в настоящем документе путем ссылки).

IV. Иммунологические эффекторные функции и модификации Fc

В конкретных вариантах осуществления связывающие полипептиды по изобретению могут содержать константную область антитела (например, константную область IgG, например, константную область IgG человека, например, константную область IgG1 или IgG4 человека), опосредующие одну или несколько эффекторных функций.

Например, связывание С1-комплекса с константной областью антитела может активировать систему комплемента. Активация системы комплемента является важной в опсонизации и лизисе клеточных патогенов. Активация системы комплемента также стимулирует воспалительный ответ и может также быть вовлечена в аутоиммунную гиперчувствительность. Кроме того, антитела связываются с рецепторами на различных клетках через область Fc (участки связывания Fc-рецептора на области Fc антитела связываются с Fc-рецепторами (FcR) на клетке). Существует ряд Fc-рецепторов, которые являются специфическими для различных классов антител, включая IgG (рецепторы гамма), IgE (рецепторы эпсилон), IgA (рецепторы альфа) и IgM (рецепторы мю).

Связывание антитела с Fc-рецепторами на поверхности клетки запускает ряд важных и разнообразных биологических ответов, включая поглощение и разрушение покрытых антителами частиц, вывод иммунных комплексов, лизис покрытых антителами клеток-мишеней посредством клеток-киллеров (называемый антителозависимой

опосредованной клеткам цитотоксичностью, или ADCC), высвобождение медиаторов воспаления, перенос через плаценту и контроль продукции иммуноглобулинов. В предпочтительных вариантах осуществления, связывающие полипептиды (например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты) по изобретению связываются с

5 рецептором Fc-гамма. В альтернативных вариантах осуществления, связывающие полипептиды по изобретению могут содержать константную область, которая лишена одной или нескольких эффекторных функций (например, активности ADCC) и/или неспособна связывать рецептор Fc γ .

Конкретные варианты осуществления изобретения включают антитела, в которых

10 по меньшей мере одна аминокислота в одном или нескольких доменах константной области делетирована или иным образом изменена так, чтобы обеспечивать желательные биохимические характеристики, такие как сниженные или усиленные эффекторные функции, способность к нековалентной димеризации, увеличенная способность к локализации в участке опухоли, сниженное время полужизни в сыворотке или

15 увеличенное время полужизни в сыворотке по сравнению с полноразмерным, неизмененным антителом приблизительно такой же иммуногенности. Например, конкретные антитела для использования в способах диагностики и лечения, описанных в настоящем документе, представляют собой антитела с делетированным доменом, содержащие полипептидную цепь, сходную с тяжелой цепью иммуноглобулина, но 20 лишенной по меньшей мере части одного или нескольких доменов тяжелой цепи. Например, в конкретных антителах, один целый домен константной области модифицированного антитела может быть делетирован, например, весь или часть домена CH2 может быть делетирован.

В других конкретных вариантах осуществления связывающие полипептиды содержат 25 константные области, происходящие из различных изотипов антител (например, константные области из двух или более IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека). В других вариантах осуществления связывающие полипептиды содержат химерный шарнир (т.е., шарнир, содержащий части шарнира, происходящие из шарнирных доменов различных изотипов антитела, например, верхнего шарнирного домена из молекулы IgG4 и среднего 30 шарнирного домена IgG1). В одном варианте осуществления связывающие полипептиды содержат область Fc или ее часть из молекулы IgG4 человека, и мутацию Ser228Pro (нумерация EU) в коровой шарнирной области молекулы.

В конкретных вариантах осуществления часть Fc можно подвергать мутации для 35 увеличения или уменьшения эффекторной функции с использованием способов, известных в данной области. Например, делеция или инактивация (посредством точечных мутаций или других способов) домена константной области может уменьшать связывание Fc-рецептора циркулирующего модифицированного антитела, таким образом, расширяя локализацию опухоли. В других случаях может быть, что 40 модификации константной области, в соответствии с настоящим изобретением, смягчают связывание комплемента и таким образом, уменьшают время полужизни в сыворотке и неспецифическую ассоциацию конъюгированного цитотоксина. Другие модификации константной области можно использовать для модификации дисульфидных связей или олигосахаридных групп, позволяющих расширенную локализацию из-за увеличенной антигенной специфичности или гибкости. Полученный физиологический профиль, 45 биодоступность и другие биохимические эффекты модификаций, такие как локализация в опухоли, биораспределение и время полужизни в сыворотке, легко можно измерять и оценивать количественно с использованием хорошо известных иммунологических способов без излишнего экспериментирования.

В конкретных вариантах осуществления домен Fc, используемый в антителе по изобретению представляет собой вариант Fc. Как применяют в настоящем документе, термин «вариант Fc» относится к домену Fc, обладающему по меньшей мере одной аминокислотной заменой относительно домена Fc дикого типа, из которого происходит 5 указанный домен Fc. Например, когда домен Fc происходит из антитела IgG1 человека, вариант Fc домена Fc указанного IgG1 человека содержит по меньшей мере одну аминокислотную замену относительно указанного домена Fc.

Аминокислотная замена (замены) варианта Fc может являться локализованной в любом положении (т.е., любом положении аминокислоты по конвенции EU) внутри 10 домена Fc. В одном варианте осуществления варианта Fc содержит замену в положении аминокислоты, локализованном в шарнирном домене или его части. В другом варианте осуществления варианта Fc содержит замену в положении аминокислоты, локализованном в домене CH2 или его части. В другом варианте осуществления варианта Fc содержит замену в положении аминокислоты, локализованном в домене CH3 или его части. В 15 другом варианте осуществления варианта Fc содержит замену в положении аминокислоты, локализованном в домене CH4 или его части.

В связывающих полипептидах по изобретению можно использовать любой известный в данной области вариант Fc, как известно, вносящий вклад в улучшении (например, снижении или усилении) эффекторной функции и/или связывания FcR. Указанные 20 варианты Fc могут включать, например, любую из аминокислотных замен, описанных в Международных Публикациях PCT WO 88/07089 A1, WO 96/14339 A1, WO 98/05787 A1, WO 98/23289 A1, WO 99/51642 A1, WO 99/58572 A1, WO 00/09560 A2, WO 00/32767 A1, WO 00/42072 A2, WO 02/44215 A2, WO 02/060919 A2, WO 03/074569 A2, WO 04/016750 A2, WO 04/029207 A2, WO 04/035752 A2, WO 04/063351 A2, WO 04/074455 A2, WO 04/ 25 099249 A2, WO 05/040217 A2, WO 05/070963 A1, WO 05/077981 A2, WO 05/092925 A2, WO 05/123780 A2, WO 06/019447 A1, WO 06/047350 A2 и WO 06/085967 A2 или в Патентах США No. 5648260; 5739277; 5834250; 5869046; 6096871; 6121022; 6194551; 6242195; 6277375; 6528624; 6538124; 6737056; 6821505; 6998253; и 7083784, полное содержание каждого из которых приведено в настоящем документе путем ссылки. В одном 30 иллюстративном варианте осуществления связывающий полипептид по изобретению может содержать вариант Fc, содержащий аминокислотную замену в положении EU 268 (например, H268D или H268E). В другом иллюстративном варианте осуществления связывающий полипептид по изобретению может содержать аминокислотную замену в положении EU 239 (например, S239D или S239E) и/или положении EU 332 (например, 35 I332D или I332Q).

В конкретных вариантах осуществления связывающий полипептид по изобретению может содержать вариант Fc, содержащий аминокислотную замену, изменяющую антигеннезависимые эффекторные функции антитела, в частности, время полужизни циркулирующего связывающего полипептида. Такие связывающие полипептиды 40 обладают либо увеличенным, либо уменьшенным связыванием с FcRn по сравнению со связывающими полипептидами с отсутствием этих замен, таким образом, обладают увеличенным или уменьшенным временем полужизни в сыворотке, соответственно. Предполагают, что варианты Fc с улучшенной аффинностью для FcRn обладают более длительными периодами полужизни в сыворотке, и такие молекулы обладают 45 пригодными применениями в способах лечения млекопитающих, где является желательным длительное время полужизни введенного антитела, например, для лечения хронического заболевания или нарушения. В отличие от этого, ожидают, что варианты Fc с уменьшенной аффинностью связывания FcRn обладают более короткими периодами

времени полужизни, и такие молекулы также можно использовать, например, для введения млекопитающему, когда более короткое время циркуляции может предоставить преимущества, например, для получения диагностических изображений *in vivo*, или в ситуациях, когда исходное антитело обладает токсическими побочными

5 эффектами при присутствии в кровотоке в течение более длительных периодов.

Варианты Fc с уменьшенной аффинностью связывания FcRn также менее вероятно пересекают плаценту и, таким образом, их можно также использовать для лечения заболеваний или нарушений у беременных женщин. Кроме того, другие применения,

10 включают применения, локализованные в мозге, почке и/или печени. В одном иллюстративном варианте осуществления для измененных связывающих полипептидов (например, антител или их антигенсвязывающих фрагментов) по изобретению показан снижennyй транспорт через эпителий гломерул почек из сосудистой сети. В другом варианте осуществления для измененных связывающих полипептидов (например,

15 антител или их антигенсвязывающих фрагментов) по изобретению показан снижennyй транспорт через гематоэнцефалический барьер (BBB) из головного мозга в просвет сосуда. В одном варианте осуществления антитело с измененным связыванием FcRn содержит домен Fc, обладающий одной или несколькими аминокислотными заменами внутри «связывающей FcRn петли» домена Fc. Связывающая FcRn петля состоит из

20 аминокислотных остатков 280-299 (в соответствии с нумерацией EU). Иллюстративные аминокислотные замены, которые изменяют активность связывания FcRn, описаны в Международной публикации PCT No. WO 05/047327, полное содержание которой приведено в настоящем документе путем ссылки. В конкретных иллюстративных вариантах осуществления связывающие полипептиды (например, антитела или их

25 антигенсвязывающие фрагменты) по изобретению содержат домен Fc, обладающий одной или несколькими из следующих замен: V284E, H285E, N286D, K290E и S304D (нумерация EU). В других иллюстративных вариантах осуществления связывающие молекулы по изобретению содержат домен Fc человека с двойной мутацией H433K/N434F (см., например, Патент США No. 8163881).

30 В других вариантах осуществления связывающие полипептиды для использования в способах диагностики и лечения, описанных в настоящем документе, обладают константной областью, например, константной областью тяжелой цепи IgG1 или IgG4, которая является измененной для уменьшения или прекращения гликозилирования.

Например, связывающие полипептиды (например, антитела или их антигенсвязывающие 35 фрагменты) по изобретению могут также содержать вариант Fc, содержащий аминокислотную замену, изменяющую гликозилирование Fc антитела. Например, указанный вариант Fc может обладать уменьшенным гликозилированием (например, N- или O-связанным гликозилированием). В иллюстративных вариантах осуществления варианта Fc может обладать уменьшенным гликозилированием N-связанного гликана,

40 в норме обнаруживаемого в положении аминокислоты 297 (нумерация EU). В другом варианте осуществления антитело обладает аминокислотной заменой вблизи или внутри мотива гликозилирования, например, мотива N-связанного гликозилирования, содержащего аминокислотную последовательность NXT или NXS. В конкретном

45 варианте осуществления антитело содержит вариант Fc с аминокислотной заменой в положении аминокислоты 228 или 299 (нумерация EU). В конкретных вариантах осуществления связывающий полипептид содержит константную область IgG1 или IgG4, содержащую мутацию S228P и T299A (нумерация EU).

В конкретных вариантах осуществления домен Fc связывающего полипептида

содержит вариант Fc со сконструированным аргинином в положении 298, в соответствии с нумерацией EU, и со сконструированным остатком аргинина, серина или треонина в положении аминокислоты 300 (нумерация EU). Этот вариант Fc является гликозилированным в положении 298 и ингибитирует связывание с рецепторами Fc γ .

- 5 Иллюстративные аминокислотные замены, обеспечивающие уменьшенное или измененное гликозилирование, описаны в Международной публикации РСТ №. WO 05/018572, полное содержание которой приведено в настоящем документе путем ссылки. В предпочтительных вариантах осуществления связывающие полипептиды по изобретению модифицированы для исключения гликозилирования. Такие связывающие 10 полипептиды можно обозначать как «agly» связывающие полипептиды (например, «agly» антитела). Без связи с теорией, считают, что «agly» связывающие полипептиды могут обладать улучшенной безопасностью и профилем стабильности *in vivo*. Agly связывающие полипептиды могут принадлежать к любому изотипу или его подклассу, например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В конкретных вариантах осуществления agly 15 связывающие полипептиды содержат агликозилированную область Fc антитела IgG4, лишенную Fc-эффекторной функции. В других вариантах осуществления связывающие полипептиды по изобретению содержат измененный гликан. Например, антитело может обладать уменьшенным количеством остатков фукозы на N-гликане на Asn297 области Fc, т.е., является афукозилированным. Афукозилирование увеличивает связывание 20 FcRgII на клетках NK и сильно увеличивает ADCC. В другом варианте осуществления связывающий полипептид может обладать измененным количеством остатков сиаловой кислоты на N-гликане на Asn297 области Fc. Многочисленные известные в данной области способы доступны для получения «agly» антител или антител с измененными 25 гликанами. Например, генетически модифицированные клетки-хозяева (например, модифицированные дрожжи, например, *Pichia*, или клетки CHO) с модифицированными путями гликозилирования (например, делециями гликозил-трансферазы) можно использовать для продукции таких антител.

V. Эффекторные группы

- В конкретных вариантах осуществления связывающие полипептиды по настоящему описанию содержат эффекторные группы. Как правило, эти эффекторные группы конъюгированы (либо напрямую, либо через линкерную группу) с N-связанным гликаном на связывающем полипептиде, (например, N-связанным гликаном, связанным с N114 домена CH1). В конкретных вариантах осуществления связывающий полипептид представляет собой полноразмерное антитело, содержащее два домена CH1 с гликаном 30 в положении Kabat 114, где оба гликана являются конъюгированными с одной или несколькими эффекторными группами.

Любые эффекторные группы можно добавлять к связывающим полипептидам, описанным в настоящем документе. Эффекторные группы предпочтительно добавляют неприродную функцию к измененному антителу или его фрагментам, без значительного 40 изменения присущей связывающему полипептиду активности. Эффекторная группа может представлять собой, например, но без ограничения, терапевтическое или диагностическое средство. Модифицированный связывающий полипептид (например, антитело) по настоящему описанию может содержать одну или несколько эффекторных групп, которые могут являться одинаковыми или различными.

- 45 В одном варианте осуществления эффекторная группа может иметь формулу (I):

$$\text{H}_2\text{N}-\text{Q}-\text{CON}-\text{X}$$

Формула (I),

где:

А) Q представляет собой NH или O; и

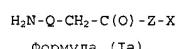
В) CON представляет собой соединительную группу; и

С) X представляет собой эффекторную группу (например, терапевтическое или диагностическое средство, как определено в настоящем документе).

Соединительная группа соединяет лекарственное средство с $\text{H}_2\text{N-Q-}$. Соединительная

5 группа может включать по меньшей мере один из любых пригодных компонентов, известных специалистам в данной области, включая, например, алкиленильный компонент, полиэтиленгликолевый компонент, поли(глициновый) компонент, поли(оксазолиновый) компонент, карбонильный компонент, компонент, происходящий из цистеинамида, компонент, происходящий из валина, связанного с цитрулином, и компонент, происходящий из 4-аминобензилкарбамата, или любую их комбинацию.

10 В другом варианте осуществления эффекторная группа формулы (I) может иметь формулу (Ia):



15 где:

А) Q представляет собой NH или O; и

Б) Z представляет собой Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C₁₆H₃₂O₈C₂H₄)_f,

где

i. Cys представляет собой компонент, происходящий из цистеинамида;

20 ii. MC представляет собой компонент, происходящий из малеимида;

iii. VC is a компонент, происходящий из валина, связанного с цитрулином;

iv. PABC представляет собой компонент, происходящий из 4-аминобензилкарбамата;

v. X представляет собой эффекторную группу (например, терапевтическое или

диагностическое средство, как определено в настоящем документе);

25 vi. a представляет собой 0 или 1;

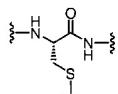
vii. b представляет собой 0 или 1;

viii. c представляет собой 0 или 1; и

ix. f представляет собой 0 или 1

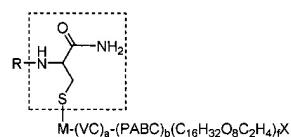
«Компонент, происходящий из цистеинамида», является точкой присоединения к

30 $\text{H}_2\text{N-Q-CH}_2-\text{C}(\text{O})-$. В одном варианте осуществления «компонент, происходящий из цистеинамида» может относиться к одной или нескольким частям эффекторной группы, обладающей структурой:



35

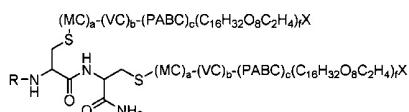
В одном варианте осуществления компонент «Cys» эффекторной группы может содержать одну такую часть. Например, следующая структура показывает эффекторную группу с одной такой частью (где компонент «Cys» обозначен рамкой из пунктирной линии):



40

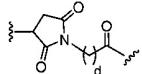
В другом варианте осуществления компонент «Cys» эффекторной группы может

45 содержать две или более такие части. Например, следующая группа содержит две такие части:



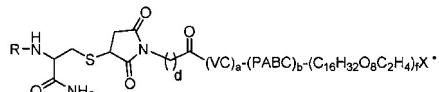
Как можно видеть из структуры, каждый компонент «Cys» несет группу $-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C_{16}H_{32}O_8C_2H_4)_f-X$.

В одном варианте осуществления фраза «компонент, происходящий из малеимида», может относиться к любой части эффекторной группы, обладающей структурой:

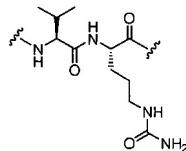


где d представляет собой целое число от 2 до 5. Количество компонентов MC , включенных в любую группу $Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C_{16}H_{32}O_8C_2H_4)_f-X$ в эффекторной группе, указано нижним индексом « a » и может составлять 0 или 1. В одном варианте осуществления a представляет собой 1. В другом варианте осуществления b представляет собой 0.

В одном варианте осуществления компонент «Cys» может быть соединен с компонентом « MC » через атом серы в компоненте «Cys», как обозначено рамкой из пунктирной линии в структуре ниже:

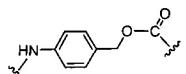


В одном варианте осуществления фраза «компонент, происходящий из валина, соединенного с цитрулином», может относиться к любой части эффекторной группы со следующей структурой:



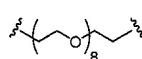
Количество компонентов VC , включенных в любую группу $Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C_{16}H_{32}O_8C_2H_4)_f-X$ в эффекторной группе, указано нижним индексом « b » и может составлять 0 или 1. В одном варианте осуществления b представляет собой 1. В другом варианте осуществления b представляет собой 0.

В одном варианте осуществления фраза «компонент, происходящий из 4-аминобензилкарбамата», может относиться к любой части эффекторной группы со следующей структурой:



Количество компонентов $PABC$, включенных в любую группу $Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C_{16}H_{32}O_8C_2H_4)_f-X$ в эффекторной группе, указано нижним индексом « c » и может составлять 0 или 1. В одном варианте осуществления c представляет собой 1. В другом варианте осуществления c представляет собой 0.

В одном варианте осуществления, « $C_{16}H_{32}O_8C_2H_4$ » относится к следующей структуре:



Количество единиц $C_{16}H_{32}O_8$, включенных в любую группу $Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C_{16}H_{32}O_8C_2H_4)_f-X$ в эффекторной группе, указано нижним индексом « f ». В

одном варианте осуществления *f* представляет собой 1. В другом варианте осуществления *f* представляет собой 0.

В одном варианте осуществления *a* представляет собой 1, *b* представляет собой 1, *c* представляет собой 1, и *f* представляет собой 0.

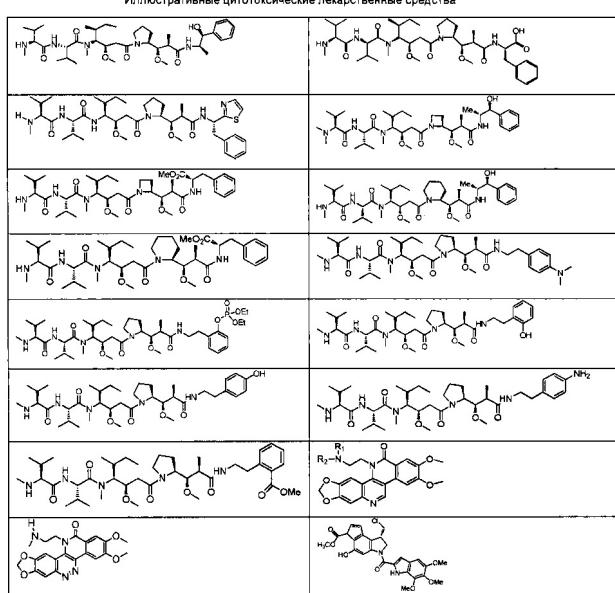
5 а) Терапевтические эффекторные группы

В конкретных вариантах осуществления связывающие полипептиды по настоящему описанию конъюгированы с эффекторной группой, содержащей лекарственное средство, например, группой лекарственного средства (или его пролекарства) или радиоактивно меченного соединения. В одном варианте осуществления лекарственное средство

10 представляет собой цитотоксин. Иллюстративные цитотоксические лекарственные средства указаны в таблице 1 в настоящем документе.

Таблица 1.

Иллюстративные цитотоксические лекарственные средства



15

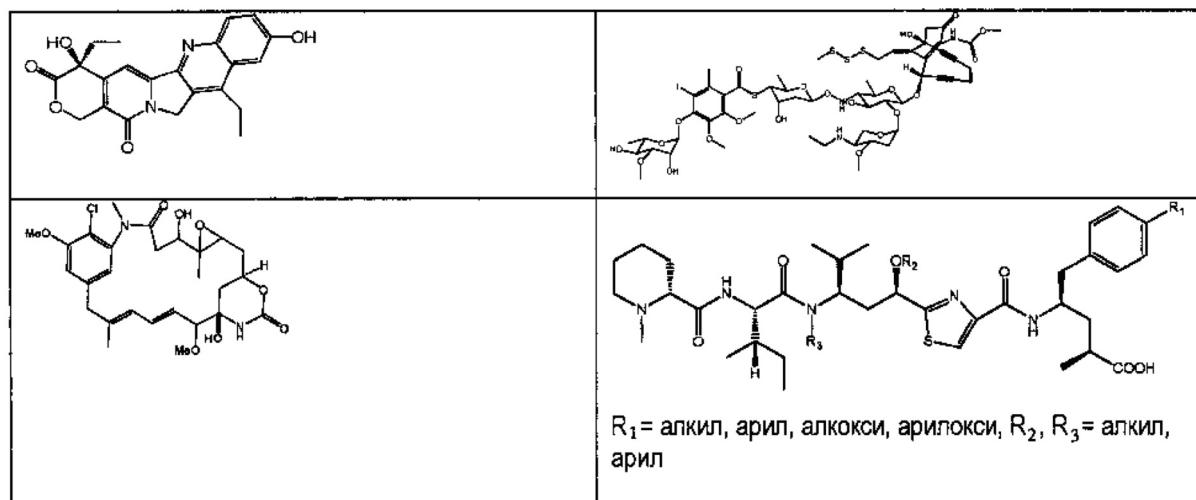
20

25

30

35

40



Дополнительные иллюстративные группы лекарственного средства включают

противовоспалительные, противораковые, противоинфекционные (например,

антигрибковые, антибактериальные, антипаразитические, антивирусные и т.д.), и

45 анестетические лекарственные средства. В следующем варианте осуществления группа лекарственного средства представляет собой противораковое средство. Иллюстративные противораковые средства включают, но без ограничения, цитотоксические средства, ингибиторы ферментов, регуляторы генов, цитотоксические нуклеозиды, связывающие

тубулин вещества или ингибиторы тубулина, ингибиторы протеасом, гормоны и антагонисты гормонов, средства против ангиогенеза и т.п. Иллюстративные цитотоксические противораковые средства включают алкилирующие средства, такие как антрациклиновое семейство лекарственных средств (например, адриамицин, 5 карминомицин, циклоспорин-А, хлороквин, метоптерин, митрамицин, порфиромицин, стрептонигрин, порфиромицин, антрацендионы и азиридины). Другие цитотоксические противораковые средства включают ингибиторы синтеза ДНК (например, метотрексат и дихлорметотрексат, 1,4-диоксид 3-амино-1,2,4-бензотриазина, аминоптерин, цитозин- β -D-арабинофуранозид, 5-фтор-5'-дезоксиуридин, 5-фторурацил, ганцикловир, 10 гидроксимочевину, актиномицин-Д и митомицин С), интеркалирующие в ДНК или сшивающие ДНК средства (например, блеомицин, карбоплатин, кармустин, хлорамбуцил, циклофосфамид, дихлорид цис-диаминоплатины (II) (цисплатин), мелфалан, митоксантрон и оксалиплатин), и регуляторы транскрипции ДНК-РНК (например, актиномицин D, даунорубицин, доксорубицин, гомогаррингтонин и идарубицин). Другие 15 иллюстративные цитотоксические средства, совместимые с настоящим описанием включают бензохинонансамицины, хиноидные производные (например, хинолонхинолоны, генистейн, бактациклин), бусульфан, ифосфамид, мехлорэтамин, триазиквон, диазиквон, карбазилхинон, индолохинон ЕО9, диазиридинил-бензохинонметил DZQ, триэтиленфосфорамид и соединения нитрозомочевины 20 (например, кармустин, ломустин, семустин).

Иллюстративные цитотоксические нуклеозидные противораковые средства включают, но без ограничения: арабинозид аденоцина, цитарабин, арабинозид цитозина, 5-фторурацил, флударабин, флоксуридин, фторафур и 6-меркаптопурин. Иллюстративный противораковые связывающие тубулин вещества включают, но без ограничения:

25 таксоиды (например, паклитаксел, доцетаксел, таксан), нокодазол, ризоксин, доластатины (например, доластатин-10, -11 или -15), колхицин и колхициноиды (например, ZD6126), комбretастатины (например, комбretастатин А-4, AVE-6032), и алкалоиды барвинка (например, винбластин, винкристин, виндезин и винорелбин (навелбин)). Иллюстративные противораковые гормоны и антагонисты гормонов, 30 включают, но без ограничения: кортикоиды (например, преднизон), прогестины (например, гидроксипрогестерон или медропрогестерон), эстрогены, (например, диэтилстилбестрол), антиэстрогены (например, тамоксилен), андрогены (например, тестостерон), ингибиторы ароматазы (например, аминоглутетимид), 17-(аллиламино)-17-дээтоксиметоксигелданамицин, 4-амино-1,8-нафталимид, апигенин, брефелдин А, 35 циметидин, дихлорэтиленметилен-дифосфоновую кислоту, леупролид (лейпрорелин), гормон, высвобождающий лютеинизирующий гормон, пифитрин-а, рапамицин, глобулин, связывающий половые гормоны, и тапсигаргин. Иллюстративные противораковые средства против ангиогенеза, включают, но без ограничения: соединения, включающие ангиостатин K1-3, DL- α -дифторэтилметил-орнитин, эндостатин, 40 фумагиллин, генистейн, миноциклин, стауроспорин и (\pm)-талидомид.

Иллюстративные противораковые ингибиторы ферментов включают, но без ограничения, S(+)-камптотецин, куркумин, (-)-дегуелин, 5,6-дихлоробензимидаол-1- β -D-рибофуранозид, этопозид, форместан, фостриецин, гиспидин, 2-имино-1-имидазолидинуксусную кислоту (цилокреатин), мевинолин, трихостатин А, тирфостин 45 AG 34 и тирфостин AG 879.

Иллюстративные противораковые регуляторы генов включают, но без ограничения, 5-аза-2'-дезоксицитидин, 5-азацитидин, хлоркальциферол (витамин D3), 4-гидрокситамоксилен, мелатонин, мифепристон, ралоксилен, транс-ретинол (альдегиды

витамина А), ретиноевую кислоту, кислый витамин А, 9-цис-ретиноевую кислоту, 13-цис-ретиноевую кислоту, ретинол (витамин А), тамоксилен и троглитазон.

Другие предпочтительные классы противораковых средств включают, но без ограничения: птеридиновое семейство лекарственных средств, диненены и

5 подофильтоксины. Особенно пригодные члены этих классов включают, например, метоптерин, подофильтоксин или производные подофильтоксина, такие как этопозид или фосфат этопозида, лейрозидин, виндезин, леурозин и т.п.

Другие противораковые средства, совместимые со способами в настоящем документе, включают ауристатины (например, ауристатин Е и монометилауристан Е),

10 гелданамицин, калихеамицин, грамицидин D, майтанзиноиды (например, майтанзин), неокарциностатин, топотекан, таксаны, цитохалазин В, бромид этидия, эметин, тенопозид, колхицин, дигидроксиантракиндион, митоксантрон, прокайнпрокайн, татракайн, лидокаин, пропранолол, пуромицин и их аналоги или гомологи.

Другие противораковые средства, совместимые с объяснениями в настоящем

15 документе, включают производные томамицина, производные майтанзина, производные криптофицина, производные антрациклина, производные бисфосфоната, производные лептомицина, производные стрептонигрина, производные ауристатина и производные дуокармицина.

Другим классом совместимых противораковых средств, которые можно использовать

20 в качестве групп лекарственного средства, являются радиосенсибилизирующие лекарственные средства, которые можно эффективно направлять на опухоль или иммунореактивные клетки. Такие группы лекарственного средства усиливают чувствительность к ионизирующему излучению, таким образом, увеличивая эффективность радиотерапии. Без намерения быть ограниченными теорией, антитело,

25 модифицированное с помощью группы радиосенсибилизирующего лекарственного средства и интернализированное клеткой опухоли, может доставлять радиосенсибилизирующее средство ближе к ядру, где радиосенсибилизация максимальна. Антитела, утратившие группу радиосенсибилизирующего средства, могут быстро выводиться из крови, локализуя оставшееся радиосенсибилизирующее средство в

30 опухоли-мишени и обеспечивая минимальное поглощение в нормальных тканях. После выведения из крови, вспомогательную радиотерапию можно проводить посредством наружной дистанционной лучевой терапии, направленной специфически на опухоль, источника радиоактивности, имплантированного непосредственно в опухоль, или системной радиоиммунотерапии с помощью такого же модифицированного антитела.

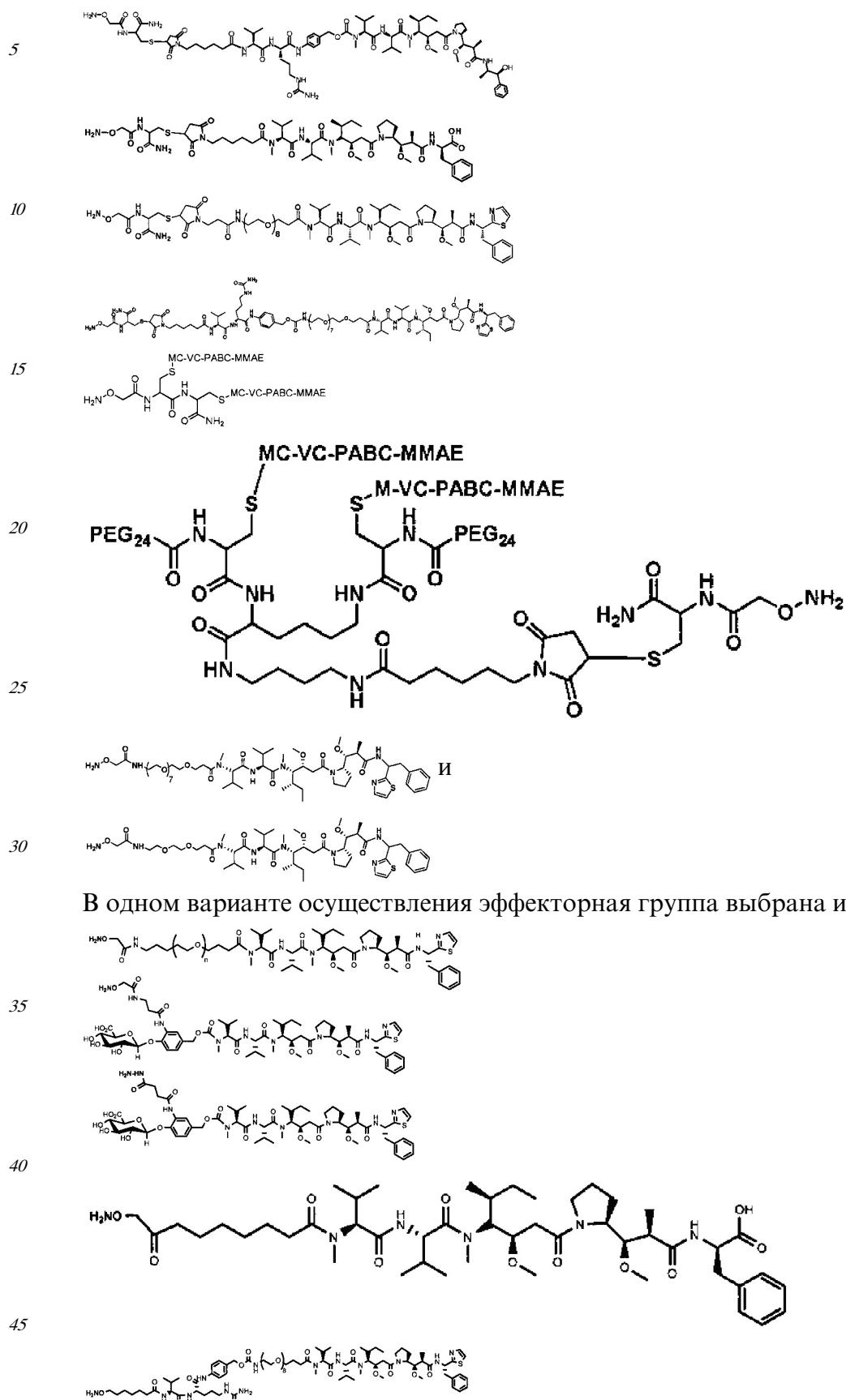
35 В одном варианте осуществления лекарственное средство содержит радиоактивные изотопы или радиоактивные метки с высокоэнергетическим ионизирующим излучением, способным вызывать множественные разрывы цепей ядерной ДНК, приводя к гибели клетки. Иллюстративные высокоэнергетические радиоактивные изотопы включают: 90Y, 125I, 131I, 123I, 111In, 105Rh, 153Sm, 67Cu, 67Ga, 166Ho, 177Lu, 186Re и 188Re. Эти

40 изотопы, как правило, образуют высокоэнергетические α - или β -частицы, обладающие короткой длиной пути. Такие радиоактивные изотопы уничтожают клетки, с которыми они находятся в непосредственной близости, например, неопластические клетки, к которым присоединен коньюгат или в которые вошел коньюгат. Они оказывают небольшой эффект или не оказывают эффекта на нелокализованные клетки и являются

45 в основном неиммуногенными. Альтернативно, высокоэнергетические изотопы можно получать посредством теплового облучения в ином случае стабильного изотопа, например, в форме бор-нейтрон-захватной терапии (Guan et al., PNAS, 95: 13206-10, 1998).

В одном варианте осуществления лекарственное средство выбрано из MMAE, MMAF и PEG8-Do110.

Иллюстративные терапевтические эффекторные группы включают структуры:



В конкретных вариантах осуществления эффекторная группа содержит более одного

лекарственного средства. Эти множественные лекарственные средства могут являться одинаковыми или различными.

b) Диагностические эффекторные группы

В конкретных вариантах осуществления связывающие полипептиды по настоящему

5 описанию конъюгированы с эффекторной группой, содержащей диагностическое средство. В одном варианте осуществления диагностическое средство представляет собой поддающуюся детекции низкомолекулярную метку, например, биотин, флуорофоры, хромофоры, спиновые резонансные зонды или радиоактивные метки. Иллюстративные флуорофоры включают флуоресцентные красители (например, 10 флуоресцеин, родамин и т.п.) и другие люминесцентные молекулы (например, люминал). Флуорофор может являться чувствительным к окружению, так что его флуоресценция изменяется, если он локализован близко к одному или нескольким остаткам в 15 модифицированном связывающем полипептиде, подвергающимся структурным изменениям при связывании субстрата (например, дансиловых зондов).

15 Иллюстративные радиоактивные метки включают малые молекулы, содержащие атомы с одним или несколькими низко чувствительными ядрами (^{13}C , ^{15}N , ^{2}H , ^{125}I , ^{124}I , ^{123}I , ^{99}Tc , ^{43}K , ^{52}Fe , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{111}In и т.п.). Предпочтительно, радиоактивный изотоп представляет собой испускающий гамма, фотоны или позитроны радиоактивный изотоп с временем полужизни, пригодным, чтобы позволять активность или детекцию 20 после прошедшего времени между введением и локализацией в участке получения изображений.

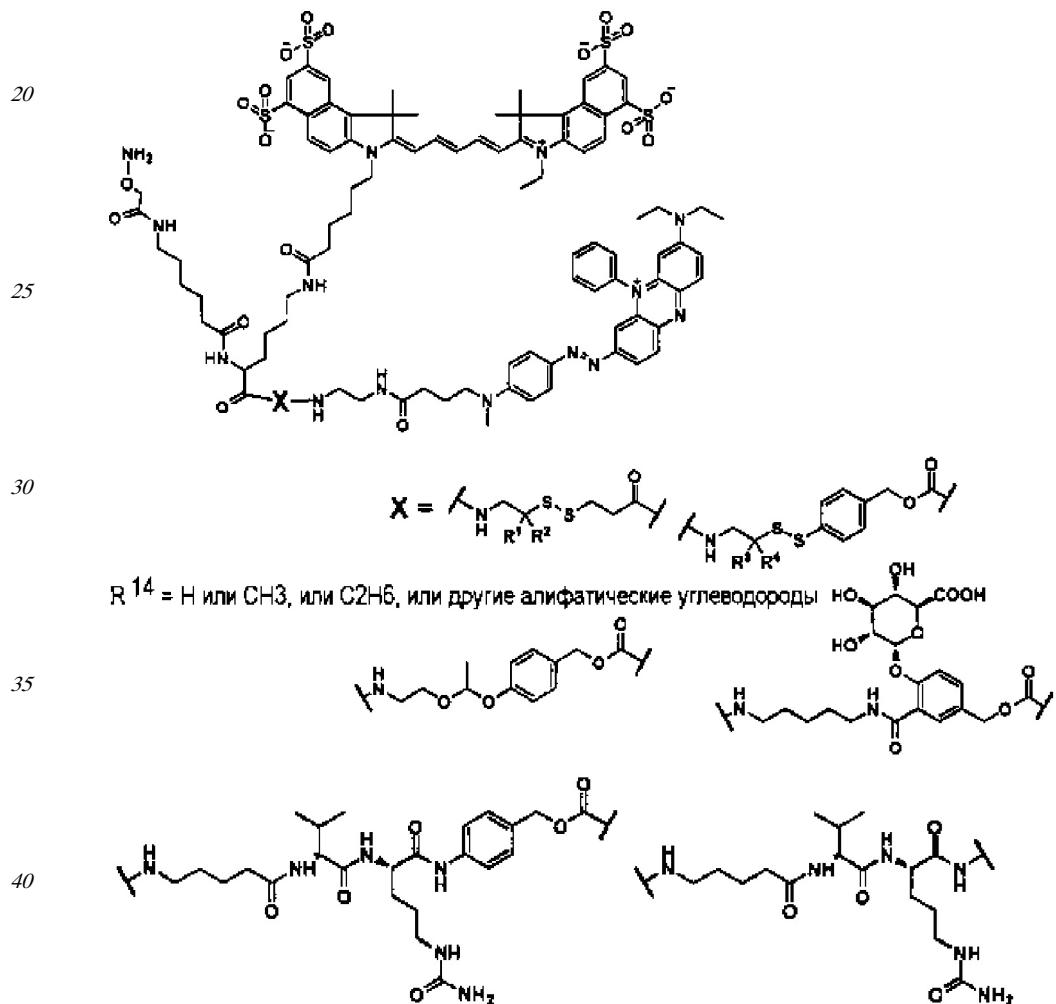
25 В одном варианте осуществления диагностическое средство представляет собой полипептид. Иллюстративные диагностические полипептиды включают ферменты с флуорогенной или хромогенной активностью, например, способностью расщеплять субстрат, формирующий флуорофор или хромофор в качестве продукта (т.е. 30 репортерные белки, такие как люцифераза). Другие диагностические белки могут обладать присущим им флуорогенной или хромогенной активностью (например, зеленый, красный и желтый флуоресцентные биолюминесцентные эквориновые белки из биолюминесцентных морских организмов) или они могут содержать белок, содержащий один или несколько низкоэнергетических радиоактивных ядер (^{13}C , ^{15}N , ^{2}H , ^{125}I , ^{124}I , ^{123}I , ^{99}Tc , ^{43}K , ^{52}Fe , ^{64}Cu , ^{68}Ga , ^{111}In и т.п.).

35 Что касается использования радиоактивно меченых конъюгатов в соответствии с настоящим описанием, связывающие полипептиды по настоящему описанию можно метить напрямую (например, посредством иодирования) или можно метить опосредованно посредством использования хелатирующего агента. Как применяют в настоящем документе, фразы «опосредованное мечение» и «способ опосредованного мечения» обе означают, что хелатирующий агент ковалентно присоединен к связывающему полипептиду, и по меньшей мере один радиоактивный изотоп ассоциирован с хелатирующим агентом. Такие хелатирующие агенты, как правило, 40 обозначают как бифункциональные хелатирующие агенты, поскольку они связывают как полипептид, так и радиоактивный изотоп. Иллюстративные хелатирующие агенты содержат производные 1-изотиоциклатобензил-3-метилдиотелентриаминпентауксусной кислоты («MX-DTPA») и циклогексилдиэтилентриаминпентауксусной кислоты («CHX-DTPA»). Другие хелатирующие агенты содержат производные P-DOTA и EDTA. 45 Особенno предпочтительные радиоактивные изотопы для непрямого мечения включают ^{111}In и ^{90}Y . В большинстве исследований с получением изображений используют 5 мКи ^{111}In -меченого антитела, поскольку эта доза как является безопасной, так и обладает увеличенной эффективностью по сравнению с более низкими дозами, где

оптимальное получение изображения происходит от трех до шести суток после введения антитела. См., например, Murray, (1985), J. Nuc. Med. 26: 3328 и Carraguillo et al, (1985), J. Nuc. Med. 26: 67. Особенно предпочтительный радиоактивный изотоп для прямого мечения представляет собой ^{131}I . Специалистам в данной области понятно, что 5 нерадиоактивные конъюгаты также можно собирать в зависимости от избранного средства, подлежащего конъюгации.

В конкретных вариантах осуществления диагностическая эффекторная группа представляет собой зонд с FRET (резонансным переносом энергии флуоресценции). FRET использовали для множества применений, включая диагностику злокачественных 10 опухолей. Зонд с FRET может включать расщепляемый линкер (чувствительный к ферменту или pH линкер), соединяющий донорную и акцепторную группы зонда с FRET, где расщепление приводит в результате к усиленной флуоресценции (включая ближнюю инфракрасную) (см., например, A. Cobos-Correa et. al. Membrane-bound FRET probe visualizes MMP12 activity in pulmonary inflammation, Nature Chemical Biology (2009), 15 5(9), 628-63; S. Gehrig et.al. Spatially Resolved Monitoring of Neutrophil Elastase Activity with Ratiometric Fluorescent Reporters (2012) Angew. Chem. Int. Ed., 51, 6258-6261).

В одном варианте осуществления эффекторная группа выбрана из:

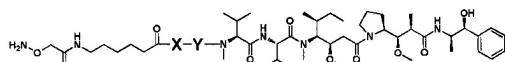


с) Функционализированные эффекторные группы

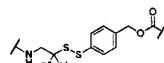
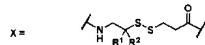
45 В конкретных вариантах осуществления эффекторные группы по изобретению могут являться функционализированными для содержания дополнительных групп в дополнение к собственно эффекторной группе. Например, эффекторная группа может содержать отщепляемые линкеры, которые высвобождают эффекторную группу из

связывающего полипептида в конкретных условиях. В иллюстративных вариантах осуществления, эффекторная группа может содержать линкер, который поддается отщеплению клеточными ферментами и/или является чувствительным к рН.

Дополнительно или альтернативно, эффекторная группа может содержать 5 дисульфидную связь, отщепляемую внутриклеточным глутатионом при поглощении клеткой. Иллюстративные чувствительные к дисульфиду и рН линкеры представлены ниже:

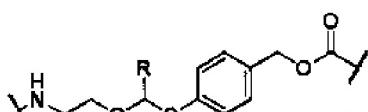


10



R^{14} = H или CH_3 , или C_2H_5 , или другие алифатические углеводороды

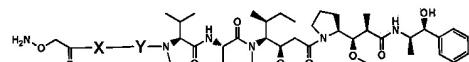
15



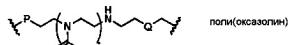
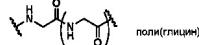
$R \neq H$ или замещенные или незамещенные алкильные, алкиларильные группы

20

В других вариантах осуществления эффекторная группа может содержать гидрофильные и биосовместимые группы, такие как группы полиглицина, поли(оксазолина) или PEG. Иллюстративные структуры («Y») представлены ниже:



25



$R = H$ или незамещенная или функциональная группа, содержащая алкильные группы
 P и Q = одинаковые или различные функциональные группы для присоединения лекарственных средств, репротерапевтических молекул и белка

30

В конкретных вариантах осуществления эффекторная группа содержит аминооксигруппу, которая облегчает конъюгацию со связывающим полипептидом через стабильную оксимную связь. Иллюстративные эффекторные группы, содержащие аминооксигруппы, указаны в таблице 2 в настоящем документе.

35

40

45

Таблица 2.

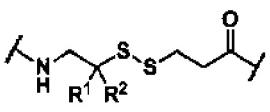
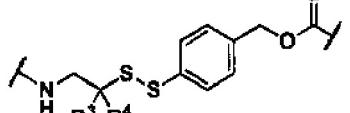
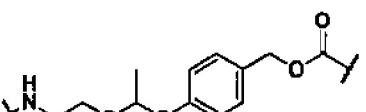
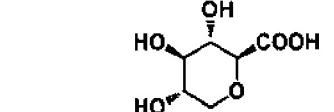
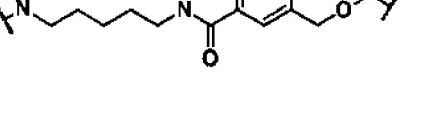
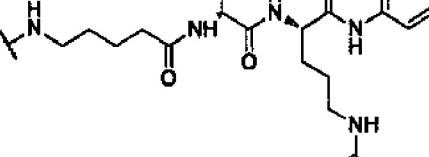
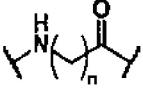
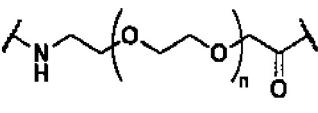
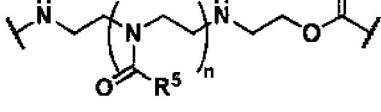
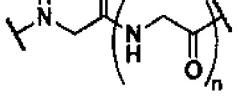
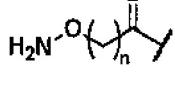
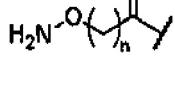
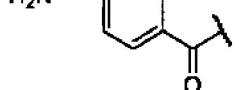
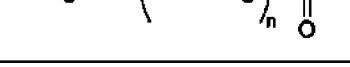
Иллюстративные эффекторные аминооксигруппы (где X может представлять собой любой линкер, Y представляет собой любой спейсер, и где X и/или Y являются необязательными)

<p>5</p> <p>Z-Y-X — Лекарственное средство</p>	<p>Лекарственное средство</p> <p><chem>Z-Y-X-N(C)CCN(C(=O)c1ccc(O)cc1)C(=O)O</chem></p>
<p>10</p> <p><chem>W-NH-C(=O)-CH2-CH2-C(=O)-NH-C(=O)-CH2-O-NH2</chem></p> <p>X — Лекарственное средство</p>	<p>Z-Y-N(H)-CH2-CH2-C(=O)-X — Лекарственное средство</p> <p>Z-Y-N(H)-CH2-CH2-C(=O)-X — Лекарственное средство</p>
<p>15</p> <p>Лекарственное средство 1</p> <p><chem>W1-NH-C(=O)-CH2-C1CCCC1-C(=O)NHC(=O)-CH2-CH2-CH2-CH2-NH-C(=O)-CH2-O-NH2</chem></p> <p>Лекарственное средство 2</p> <p><chem>W2-NH-C(=O)-CH2-C1CCCC1-C(=O)NHC(=O)-CH2-CH2-CH2-CH2-NH-C(=O)-CH2-O-NH2</chem></p>	<p>W, W1 и W2 =</p> <p><chem>{OCCO}n-C(=O)-X</chem></p> <p><chem>{NCC(=O)R5}n-NH-CH2-CH2-C(=O)O</chem></p> <p><chem>H2N-CH2-C(=O)-{NHC(=O)O}n-X</chem></p>

35

40

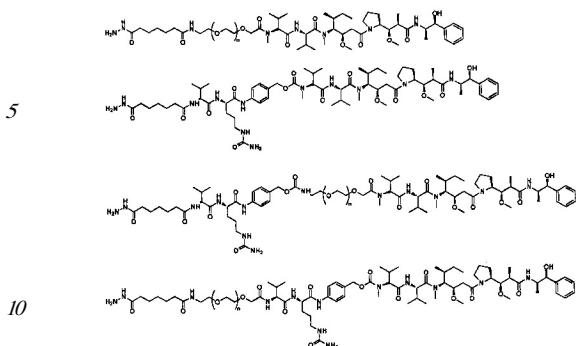
45

$X =$       <p>$R^{1-5} = H, \text{алкил или арил}$</p>	$Y =$     $Z =$    
---	---

В других вариантах осуществления эффекторная группа содержит группу гидразида и/или N-алкилированного гидразина для облегчения конъюгации со связывающим 40 полипептидом через стабильную гидразоновую связь. Иллюстративные эффекторные группы, содержащие аминооксигруппы, указаны в таблице 14 в настоящем документе.

Таблица 14.

Иллюстративные эффекторные группы гидразина и/или гидразида



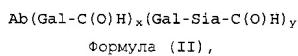
d) Нацеливающие группы

В конкретных вариантах осуществления эффекторные группы содержат нацеливающие группы, которые специфически связываются с одной или несколькими молекулами-мишениями. Можно использовать любой тип нацеливающей группы, включая, без ограничения, белки, нуклеиновые кислоты, липиды, углеводы (например, гликаны) и их комбинации (например, гликопротеины, гликопептиды и гликолипиды). В конкретных вариантах осуществления нацеливающая группа представляет собой углевод или гликопептид. В конкретных вариантах осуществления нацеливающая группа представляет собой гликан. Нацеливающие группы могут представлять собой природные или неприродные молекулы.

VI. Конъюгация эффекторных групп со связывающими полипептидами

В конкретных вариантах осуществления эффекторные группы конъюгированы (либо напрямую, либо через линкерную группу) с окисленным гликаном (например, окисленным N-связанным гликаном) измененного связывающего полипептида, (например, сконструированным гликаном на N114 домена CH1 антитела). Термин «окисленный гликан» означает, что спиртовой заместитель на гликане был окислен, предоставляя карбонильный заместитель. Карбонильный заместитель может вступать в реакцию с пригодным азотным нуклеофилом для формирования двойной связи углерод-азот. Например, реакция карбонильной группы с аминооксигруппой или гидразиновой группой образует оксим или гидразин, соответственно. В одном варианте осуществления карбонильный заместитель представляет собой альдегид. Пригодные окисленные гликаны включают окисленную галактозу и окисленную сиаловую кислоту.

В одном варианте осуществления модифицированный полипептид формулы (II) может иметь формулу (II):



где

А) Ab представляет собой антитело или другой связывающий полипептид, как определено в настоящем документе;

Б) Gal представляет собой компонент, происходящий из галактозы;

С) Sia представляет собой компонент, происходящий из сиаловой кислоты;

Д) x составляет 0-5; и

Е) y составляет 0-5,

где по меньшей мере один из x и y не составляет 0.

Любые известные в данной области химические реакции можно использовать для конъюгации эффекторной группы (например, эффекторной группы, содержащей линкерную группу) с гликаном (см. например, Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*. Academic Press (1996), полное содержание которого приведено в настоящем документе

путем ссылки). В конкретных вариантах осуществления сахаридный остаток (например, остаток сиаловой кислоты или галактозы) гликана сначала окисляют (например, с использованием обработки периодатом натрия) для получения реакционноспособной альдегидной группы. Эта альдегидная группа вступает в реакцию с аминооксигруппой 5 или гидразиновой группой эфекторной группы для формирования оксимного или гидразонового линкера, соответственно. Иллюстративные способы с использованием этой общей схемы реакции указаны в примерах 10-15.

В конкретных вариантах осуществления природные или сконструированные гликаны связывающего полипептида сначала предварительно обрабатывают ферментом 10 гликозилтрансферазой *in vitro* для обеспечения концевого сахаридного остатка, обладающего пригодной реакционной способностью. Например, сначала можно осуществлять сиалирование с использованием комбинации галактозилтрансферазы (Gal T) и сиалилтрансферазы (Sial T). В конкретных вариантах осуществления 15 двуххантенные гликаны, которые лишены галактозы (G0F или G0) или которые содержат только одну галактозу (G1F или G1), можно переводить в галактозилированные или сиалированные структуры более высокого порядка, пригодные для конъюгации (G1F, G1, G2F, G2, G1S1F, G1S1, G2S1F, G2S1, G2S2F или G2S2).

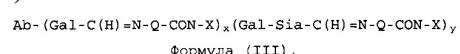
Иллюстративная схема конъюгации для получения сиалированных гликоконъюгатов показана на фигуре 25С. Фигура 25А демонстрирует структуру нативного углевода 20 N297. Фигура 25В демонстрирует типичные эфекторные группы изобретения: аминоокси-Cys-MC-VC-PABC-MMAE и аминоокси-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10. Остатки сиаловой кислоты вводят ферментативно и сайт-специфически в гликан антитела 25 (например, сконструированный гликан на N114 домена CH1) с использованием комбинации галактозилтрансферазы (Gal T) и сиалилтрансферазы (Sial T). Введенные остатки сиаловой кислоты затем окисляют с помощью низкой концентрации периодата 30 натрия для получения реакционноспособных альдегидов сиаловой кислоты, пригодным образом реакционноспособных с лекарственными средствами-линкерами (например, аминоокси-линкерами лекарственными средствами) для получения конъюгатов антитела с лекарственным средством (ADC) (например, оксим-связанных ADC). Посредством контроля количества гликана и количества остатков сиаловой кислоты с помощью 35 ремоделирования *in vitro*, специалист в данной области может иметь точный контроль над соотношением лекарственное средство-антитело (DAR) ADC. Например, если ~1 сиаловую кислоту добавляют на отдельный двуххантенный гликан (A1F) на каждой тяжелой цепи, можно получать гомогенные антитело или связывающий полипептид с DAR 2.

VII. Модифицированные связывающие полипептиды

В конкретных вариантах осуществления изобретение относится к модифицированным полипептидам, которые являются продуктом конъюгации эфекторных групп, 40 конъюгированных (либо напрямую, либо через линкерную группу) с окисленным гликаном (например, окисленным N-связанным гликаном) измененного связывающего полипептида (например, сконструированным гликаном на N114 домена CH1 антитела).

В конкретных вариантах осуществления,

В одном варианте осуществления связывающий полипептид может иметь формулу (III):



где:

- А) Ab представляет собой антитело, как определено в настоящем документе;
- Б) Q представляет собой NH или O;

С) CON представляет собой соединительную группу, как определено в настоящем документе; и

Д) X представляет собой терапевтическое или диагностическое средство, как определено в настоящем документе;

5 Е) Gal представляет собой компонент, происходящий из галактозы;

Ф) Sia представляет собой компонент, происходящий из сиаловой кислоты;

Г) x составляет 0-5; и

Н) у составляет 0-5,

где по меньшей мере один из x и у не составляет 0.

10 В одном варианте осуществления связывающий полипептид может иметь формулу (III), может иметь формулу (IIIa):

$$\text{Ab}(\text{Gal}-\text{C}(\text{H})=\text{N}-\text{Q}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{Z}-\text{X})_x(\text{Gal-Sia-C}(\text{H})=\text{N}-\text{Q}-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-\text{Z}-\text{X})_y$$

Формула (IIIa),

где:

15 А) Ab представляет собой антитело;

Б) Q представляет собой NH или O;

С) Z представляет собой Cys-(MC)_a-(VC)_b-(PABC)_c-(C₁₆H₃₂O₈C₂H₄)_f-, где

i. Cys представляет собой компонент, происходящий из цистеинамида;

ii. MC представляет собой компонент, происходящий из малеимида;

20 iii. VC представляет собой компонент, происходящий из валина, соединенного с цитрулином;

iv. PABC представляет собой компонент, происходящий из 4-аминобензилкарбамата;

v. X представляет собой эффекторную группу (например, терапевтическое или диагностическое средство, как определено в настоящем документе);

25 vi. a составляет 0 или 1;

vii. b составляет 0 или 1;

viii. c составляет 0 или 1; и

ix. f составляет 0 или 1;

Д) X представляет собой лекарственное средство, как определено в настоящем

30 документе;

Е) Gal представляет собой компонент, происходящий из галактозы;

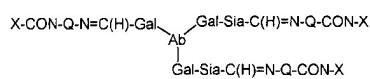
Ф) Sia представляет собой компонент, происходящий из сиаловой кислоты;

Г) x составляет 0-5; и

Н) у составляет 0-5,

35 где по меньшей мере один из x и у не составляет 0.

Следует понимать, что формула (III) не предназначена, чтобы подразумевать, что антитело, заместитель Gal, и заместитель Gal-Sia соединены подобным цепи образом. Вместо этого, когда такие заместители присутствуют, антитело соединено напрямую с каждым заместителем. Например, связывающий полипептид формулы (III), в которой x составляет 1, и у составляет 2, может иметь аранжировку, показанную ниже:



Формула (III)

Заместитель CON в формуле (III) и его компоненты являются такими, как описано по отношению к формуле (I) для эффекторных групп.

45 В одном варианте осуществления, Q представляет собой NH. В другом варианте осуществления Q представляет собой O.

В одном варианте осуществления x представляет собой 0.

Антитело Ab формулы (III) может представлять собой любое пригодное антитело, как описано в настоящем документе.

В одном варианте осуществления представлен способ получения связывающего полипептида формулы (III), где способ включает реакцию эффекторной группы формулы (I);

5 $\text{NH}_2\text{-Q-CON-X}$
Формула (I),

где:

- 10 А) Q представляет собой NH или O;
- Б) CON представляет собой соединительную группу; и
- 15 С) X представляет собой эффекторную группу (например, терапевтическое или диагностическое средство, как определено в настоящем документе), с модифицированным антителом формулы (II)

Ab(OXG)_r

15 Формула (II),

где

- А) OXG представляет собой окисленный гликан; и
- Б) r выбран из 0-4;

20 В одном варианте осуществления представлен способ получения связывающего полипептида формулы (III), где способ включает реакцию эффекторной группы формулы (I):

$\text{NH}_2\text{-Q-CON-X}$
Формула (I),

где:

- 25 А) Q представляет собой NH или O;
- Б) CON представляет собой соединительную группу; и
- С) X представляет собой эффекторную группу (например, терапевтическое или диагностическое средство, как определено в настоящем документе), с модифицированным антителом формулы (IIa)

30 $\text{Ab}(\text{Gal-C(O)H})_x(\text{Gal-Sia-C(O)H})_y$,
Формула (IIa),

где

- А) Ab представляет собой антитело, как описано в настоящем документе;
- Б) Gal представляет собой компонент, происходящий из галактозы;
- 35 С) Sia представляет собой компонент, происходящий из сиаловой кислоты;
- Д) x составляет 0-5; и
- Е) y составляет 0-5,

где по меньшей мере один из x и y не составляет 0.

В конкретных вариантах осуществления, эффекторные группы конъюгированы (либо напрямую, либо через линкерную группу) с окисленным гликаном (например, окисленным N-связанным гликаном) измененного связывающего полипептида, (например, сконструированным гликаном на N114 домена CH1 антитела). Термин «окисленный гликан» означает, что спиртовой заместитель на гликане был окислен, предоставляя карбонильный заместитель. Карбонильный заместитель может вступать в реакцию с пригодным азотным нуклеофилом для формирования углерод-азотной двойной связи. Например, реакция карбонильной группы с аминооксигруппой или гидразиновой группой образует оксим или гидразин, соответственно. В одном варианте осуществления карбонильный заместитель представляет собой альдегид. Пригодные окисленные гликаны включают окисленную галактозу и окисленную сиальную кислоту.

В одном варианте осуществления модифицированный полипептид формулы (II) может иметь формулу (II):

$Ab-(Gal-C(O)H)_x-(Gal-Sia-C(O)H)_y$

Формула (II),

5 где

А) Ab представляет собой антитело или другой связывающий полипептид, как определено в настоящем документе;

Б) Gal представляет собой компонент, происходящий из галактозы;

С) Sia представляет собой компонент, происходящий из сиаловой кислоты;

10 Д) x составляет 0-5; и

Е) y составляет 0-5,

где по меньшей мере один из x и y не составляет 0.

Любые известные в данной области химические реакции можно использовать для конъюгации эффекторной группы (например, эффекторной группы, содержащей

15 линкерную группу) с гликаном (см. например, Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*. Academic Press (1996), полное содержание которого приведено в настоящем документе путем ссылки). В конкретных вариантах осуществления сахаридный остаток (например, остаток сиаловой кислоты или галактозы) гликана сначала окисляют (например, с использованием обработки периодатом натрия) для получения реакционноспособной

20 альдегидной группы. Эта альдегидная группа вступает в реакцию с аминооксигруппой или гидразиновой группой эффекторной группы для формирования оксимного или гидразонового линкера, соответственно. Иллюстративные способы с использованием этой общей схемы реакции указаны в примерах 10-15.

В конкретных вариантах осуществления природные или сконструированные гликаны

25 связывающего полипептида сначала предварительно обрабатывают ферментом гликозилтрансферазой *in vitro* для обеспечения концевого сахаридного остатка, обладающего пригодной реакционной способностью. Например, сначала можно осуществлять сиалирование с использованием комбинации галактозилтрансферазы (Gal T) и сиалилтрансферазы (Sial T). В конкретных вариантах осуществления

30 двухантенные гликаны, которые лишены галактозы (G0F или G0) или которые содержат только одну галактозу (G1F или G1), можно переводить в галактозилированные или сиалированные структуры более высокого порядка, пригодные для конъюгации (G1F, G1, G2F, G2, G1S1F, G1S1, G2S1F, G2S1, G2S2F или G2S2).

Иллюстративная схема конъюгации для получения сиалированных гликоконъюгатов

35 показана на фигуре 25С. Остатки сиаловой кислоты вводят ферментативно и сайт-специфически в гликан антитела (например, сконструированный гликан на N114 домена CH1) с использованием комбинации галактозилтрансферазы (Gal T) и сиалилтрансферазы (Sial T). Введенные остатки сиаловой кислоты затем окисляют с помощью низкой концентрации периодата натрия для получения реакционноспособных

40 альдегидов сиаловой кислоты, пригодным образом реакционноспособных с лекарственными средствами-линкерами (например, аминоокси-линкерами лекарственных средств) для получения конъюгатов антитела с лекарственным средством (ADC) (например, оксим-связанных ADC). Посредством контроля количества гликана и количества остатков сиаловой кислоты с помощью ремоделирования *in vitro*, специалист

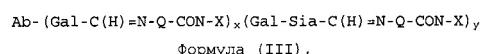
45 в данной области может иметь точный контроль над соотношением лекарственное средство-антитело (DAR) ADC. Например, если ~1 сиаловую кислоту добавляют на отдельный двухантенный гликан (A1F) на каждой тяжелой цепи, можно получать гомогенные антитело или связывающий полипептид с DAR 2.

VII. Модифицированные связывающие полипептиды

В конкретных вариантах осуществления изобретение относится к модифицированным полипептидам, которые являются продуктом конъюгированных эффекторных групп, конъюгированных (либо напрямую, либо через линкерную группу) с окисленным гликаном (например, окисленным N-связанным гликаном) измененного связывающего полипептида (например, сконструированным гликаном на N114 домена CH1 антитела).

В конкретных вариантах осуществления,

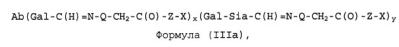
В одном варианте осуществления связывающий полипептид может иметь формулу (III):



где:

- A) Ab представляет собой антитело, как определено в настоящем документе;
- B) Q представляет собой NH или O;
- C) CON представляет собой соединительную группу, как определено в настоящем документе; и
- D) X представляет собой эффекторную группу (например, терапевтическое или диагностическое средство, как определено в настоящем документе);
- E) Gal представляет собой компонент, происходящий из галактозы;
- F) Sia представляет собой компонент, происходящий из сиаловой кислоты;
- G) x составляет 0-5; и
- H) y составляет 0-5,

где по меньшей мере один из x и y не составляет 0. В одном варианте осуществления, связывающий полипептид может иметь формулу (III), может иметь формулу (IIIa):

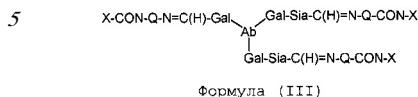


где:

- A) Ab представляет собой антитело;
 - B) Q представляет собой NH или O;
 - C) Z представляет собой $\text{Cys-(MC)}_a\text{-(VC)}_b\text{-(PABC)}_c\text{-(C}_1\text{H}_3\text{O}_8\text{C}_2\text{H}_4\text{)}_f$, где
 - i. Cys представляет собой компонент, происходящий из цистеинамида;
 - ii. MC представляет собой компонент, происходящий из малеимида;
 - iii. VC представляет собой компонент, происходящий из валина, соединенного с цитрулином;
 - iv. PABC представляет собой компонент, происходящий из 4-аминобензилкарбамата;
 - v. X представляет собой терапевтическое или диагностическое средство, как определено в настоящем документе;
 - vi. a составляет 0 или 1;
 - vii. b составляет 0 или 1;
 - viii. c составляет 0 или 1; и
 - ix. f составляет 0 или 1;
 - D) X представляет собой лекарственное средство, как определено в настоящем документе;
 - E) Gal представляет собой компонент, происходящий из галактозы;
 - F) Sia представляет собой компонент, происходящий из сиаловой кислоты;
 - G) x составляет 0-5; и
 - H) y составляет 0-5,
- где по меньшей мере один из x и y не составляет 0.

Следует понимать, что формула (III) не предназначена, чтобы подразумевать, что

антитело, заместитель Gal и заместитель Gal-Sia соединены подобным цепи образом. Вместо этого, когда такие заместители присутствуют, антитело соединено напрямую с каждым заместителем. Например, связывающий полипептид формулы (III) в которой x составляет 1, и у составляет 2, может иметь аранжировку, показанную ниже:



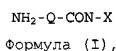
Заместитель CON в формуле (III) и его компоненты являются такими, как описано по отношению к формуле (I) для эфекторных групп.

10 В одном варианте осуществления Q представляет собой NH. В другом варианте осуществления Q представляет собой O.

В одном варианте осуществления x представляет собой 0.

Антитело Ab формулы (III) может представлять собой любое пригодное антитело, как описано в настоящем документе.

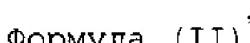
15 В одном варианте осуществления представлен способ получения связывающего полипептида формулы (III), где способ включает реакцию эфекторной группы формулы (I):



где:

- 20 А) Q представляет собой NH или O;
 Б) CON представляет собой соединительную группу; и
 С) X представляет собой терапевтическое или диагностическое средство, как определено в настоящем документе,
 с модифицированным антителом формулы (II)

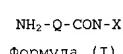
25 Ab(OXG)_r



где

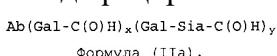
- 30 А) OXG представляет собой окисленный гликан; и
 Б) r выбран из 0-4;

В одном варианте осуществления представлен способ получения связывающего полипептида формулы (III), где способ включает реакцию эфекторной группы формулы (I):



где:

- 35 А) Q представляет собой NH или O;
 Б) CON представляет собой соединительную группу; и
 С) X представляет собой эфекторную группу (например, терапевтическое или диагностическое средство, как определено в настоящем документе),
 с модифицированным антителом формулы (IIa)



где

- 40 А) Ab представляет собой антитело, как описано в настоящем документе;
 Б) Gal представляет собой компонент, происходящий из галактозы;
 С) Sia представляет собой компонент, происходящий из сиаловой кислоты;
 Д) x составляет 0-5; и
 Е) y составляет 0-5,

где по меньшей мере один из х и у не составляет 0.

VIII. Способы лечения с помощью модифицированных антител

В одном аспекте изобретение относится к способам лечения или диагностики нуждающегося в этом пациента, включающим введение эффективного количества связывающего полипептида, описанного в настоящем документе. Предпочтительные варианты осуществления по настоящему описанию относятся к наборам и способам для диагностики и/или лечения нарушений, например, неопластических нарушений, у субъекта-млекопитающего, нуждающегося в таком лечении. Предпочтительно, субъект представляет собой человека.

- Связывающие полипептиды по настоящему описанию являются пригодными в ряде различных применений. Например, в одном варианте осуществления, рассматриваемые связывающие полипептиды являются пригодными для уменьшения количества или уничтожения клеток, несущих эпитоп, узнаваемый связывающим доменом связывающего полипептида. В другом варианте осуществления рассматриваемые связывающие полипептиды являются эффективными для уменьшения концентрации или уничтожения растворимого антигена в кровотоке. В одном варианте осуществления связывающие полипептиды могут уменьшать размер опухоли, ингибировать рост опухоли и/или продлевать время выживаемости несущих опухоли животных. Соответственно, это описание также относится к способу лечения опухолей у человека или другого животного посредством введения такому человеку или животному эффективного, нетоксичного количества модифицированного антитела. Специалист в данной области способен, посредством общепринятых экспериментов, определить то, что составляет эффективное, нетоксичное количество модифицированного связывающего полипептида для цели лечения злокачественных новообразований. Например, терапевтически активное количество модифицированного антитела или его фрагментов можно менять в зависимости от таких факторов, как стадия заболевания (например, стадия I по сравнению со стадией IV), возраст, пол, медицинские осложнения (например, иммуносупрессивные состояния или заболевания) и масса субъекта, и способность модифицированного антитела вызывать желательный ответ у субъекта. Режим дозирования можно регулировать для обеспечения оптимального терапевтического ответа. Например, несколько дробных доз можно вводить ежесуточно, или дозу можно пропорционально уменьшать, как показано по требованию терапевтической ситуации.

Как правило, композиции, представленные в настоящем описании, можно использовать для профилактического или терапевтического лечения любой неоплазии, содержащей антигенный маркер, позволяющий нацеливание на злокачественные клетки посредством модифицированного антитела.

IX. Способы введения модифицированных антител или их фрагментов

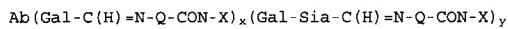
Способы получения и введения связывающих полипептидов по настоящему описанию субъекту хорошо известны специалистам в данной области, или специалисты в данной области могут легко их определять. Способ введения связывающих полипептидов по настоящему описанию может являться пероральным, парентеральным, посредством ингаляции или местным. Термин парентеральное, как применяют в настоящем документе, включает внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное, внутримышечное, подкожное, ректальное или вагинальное введение. Внутривенная, внутриартериальная, подкожная и внутримышечная формы парентерального введения являются в основном предпочтительными. В то время как все эти формы введения предусматривают как входящие в объем настоящего описания, форма для введения может представлять собой раствор для инъекции, в частности для внутривенной или

внутриартериальной инъекции или капельницы. Обычно пригодная фармацевтическая композиция для инъекции может содержать буфер (например, ацетатный, фосфатный или цитратный буфер), поверхностно-активное вещество (например, полисорбат), необязательно, стабилизирующее средство (например, альбумин человека) и т.д. Однако,

5 в других способах, совместимых с объяснениями в настоящем документе, модифицированные антитела можно доставлять напрямую в участок нежелательной клеточной популяции, таким образом увеличивая воздействие лекарственного средства на пораженную заболеванием ткань.

В одном варианте осуществляется связывающий полипептид, который вводят,

10 представляет собой связывающий полипептид формулы (III):



Формула (III),

где:

A) Ab представляет собой антитело, как определено в настоящем документе;

15 B) Q представляет собой NH или O;

C) CON представляет собой соединительную группу, как определено в настоящем документе; и

D) X представляет собой эффекторную группу (например, терапевтическое или диагностическое средство, как определено в настоящем документе);

20 E) Gal представляет собой компонент, происходящий из галактозы;

F) Sia представляет собой компонент, происходящий из сиаловой кислоты;

G) x составляет 0-5; и

H) y составляет 0-5,

где по меньшей мере один из x и y не составляют 0.

25 Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примеры неводных растворителей представляют собой пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и пригодные для инъекции органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии

30 или суспензии, включая солевой раствор и забуференные среды. В композициях и способах по настоящему описанию, фармацевтически приемлемые носители включают, но без ограничения, 0,01-0,1 M и предпочтительно, 0,05 M фосфатный буфер или 0,8% солевой раствор. Другие общепринятые парентеральные носители включают растворы фосфата натрия, декстрозу Рингера, декстрозу и хлорид натрия, лактат Рингера или

35 жирные масла. Внутривенные носители включают пополняющие жидкость и питательные вещества средства, пополняющие электролиты средства, такие как средства на основе декстрозы Рингера, и т.п. Могут также присутствовать консерванты и другие добавки, например, такие как противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие агенты и инертные газы, и т.п. Более конкретно, фармацевтические

40 композиции, пригодные для применения для инъекций, включают стерильные водные растворы (когда они водорастворимы) или дисперсии и стерильные порошки для приготовления для немедленного введения стерильных пригодных для инъекций растворов или дисперсий. В таких случаях, композиция должна являться стерильной и должна являться жидкостью до такой степени, что существует возможность легкого

45 введения через шприц. Она должна являться стабильной в условиях изготовления и хранения и предпочтительно является защищенной от контаминирующего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или диспергирующую среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол

(например, глицероглицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль, и т.п.), и их пригодные смеси. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, посредством использования покрытия, такого как лецитин, посредством поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и посредством использования 5 поверхностно-активных веществ.

Предотвращения действия микроорганизмов можно достигать посредством различных антибактериальных и противогрибковых средств, например, парабенов, хлорбутанола, фенола, аскорбиновой кислоты, тимеросала и т.п. Во многих случаях, является предпочтительным включать изотонические средства, например, сахара, 10 полиспирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия, в композицию. Продленная абсорбция пригодных для инъекции композиций может быть обусловлена включением в композицию средства, замедляющего абсорбцию, например, моностеарата алюминия и желатина.

В любом случае, стерильные пригодные для инъекции растворы можно получать

15 посредством включения активного соединения (например, модифицированного связывающего полипептида, отдельно или в комбинации с другими активными средствами) в требуемое количество пригодного растворителя с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных в настоящем документе, по необходимости, с последующей стерилизацией фильтрацией. Как правило, дисперсии получают посредством включения

20 активного соединения в стерильный носитель, содержащий базовую диспергирующую среду и другие требуемые ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для получения стерильных пригодных для инъекции растворов, предпочтительными способами получения являются вакуумная сушка и лиофилизация, которыми получают порошок активного ингредиента плюс любого дополнительного

25 желательного ингредиента из его предварительно стерилизованного фильтрацией раствора. Препараты для инъекций перерабатывают, заполняют в контейнеры, такие как ампулы, мешки, бутыли, шприцы или флаконы, и герметично закрывают в асептических условиях в соответствии со способами, известными в данной области.

Далее препараты можно упаковывать и продавать в форме набора, такого как набор, 30 описанный в находящихся одновременно на рассмотрении U.S.S.N. 09/259337 и U.S.S.N. 09/259338, содержание каждого из которых приведено в настоящем документе путем ссылки. Такие изделия предпочтительно имеют ярлыки или вкладыши в упаковку, указывающие на то, что прилагаемые композиции являются пригодными для лечения субъекта, страдающего от аутоиммунных или неопластических нарушений или

35 предрасположенного к ним.

Эффективные дозы композиций по настоящему описанию для лечения вышеописанных состояний варьируют в зависимости от множества различных факторов, включая способы введения, участок-мишень, физиологическое состояние пациента, где пациент представляет собой человека или животного, другие введенные лекарственные

40 средства, и то, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Как правило, пациент представляет собой человека, но не относящихся к человеку млекопитающих, включая трансгенных млекопитающих, также можно лечить. Дозы для лечения можно титровать с использованием общепринятых способов, известных специалистам в данной области, для оптимизации безопасности и эффективности.

45 Для пассивной иммунизации с помощью связывающего полипептида, доза может лежать в диапазоне, например, от приблизительно 0,00001 до 100 мг/кг, и более обычно, от 0,001 до 5 мг/кг (например, 0,002 мг/кг, 0,25 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,75 мг/кг, 1 мг/кг, 2 мг/кг и т.д.), массы тела хозяина. Например, дозы могут составлять 1 мг/кг массы тела

или 10 мг/кг массы тела, или лежать в диапазоне 1-10 мг/кг, предпочтительно, по меньшей мере 1 мг/кг. Промежуточные дозы в вышеуказанных диапазонах также предназначены для включения в объем настоящего описания. Субъектам можно вводить такие дозы ежесуточно, в чередующиеся сутки, еженедельно или в соответствии с любым 5 другим расписанием, определенным эмпирическим анализом. Иллюстративное лечение предусматривает введение в множественных дозах в течение продолжительного периода, например, по меньшей мере шесть месяцев. Дополнительные иллюстративные режимы лечения предусматривают введение раз в каждые две недели или раз в месяц, или раз в каждые 3-6 месяцев. Иллюстративные расписания дозирования включают 1-10 мг/кг 10 или 15 мг/кг в последовательные сутки, 30 мг/кг в чередующиеся сутки или 60 мг/кг еженедельно. В некоторых способах два или более моноклональных антитела с различной специфичностью связывания вводят одновременно, в этом случае доза каждого введенного антитела попадает в указанные диапазоны.

Связывающие полипептиды по настоящему описанию можно вводить неоднократно.

15 Интервалы между однократными дозами могут представлять собой еженедельные, ежемесячные или ежегодные. Интервалы могут также являться нерегулярными, как показано по измерению уровней в крови модифицированного связывающего полипептида или антигена у пациента. В некоторых способах, дозу регулируют для достижения концентрации в плазме модифицированного связывающего полипептида 20 1-1000 мкг/мл и в некоторых способах 25-300 мкг/мл. Альтернативно, связывающие полипептиды можно вводить в форме состава с замедленным высвобождением, в этом случае необходимо менее частое введение. Для антител, доза и частота меняется в зависимости от времени полужизни антитела у пациента. Как правило, для гуманизированных антител показано наиболее длительное время полужизни, со 25 следующими за ними химерными антителами и не относящимися к человеку антителами.

Дозу и частоту введения можно менять в зависимости от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. В профилактических применениях композиции, содержащие настоящие антитела или их смесь, вводят пациенту, еще не находящемуся в состоянии заболевания, для увеличения устойчивости пациента. Такое количество 30 определяют как являющееся «профилактически эффективной дозой». В этом применении, точные количества снова зависят от состояния здоровья пациента и общего иммунитета, но в общем лежат в диапазоне от 0,1 до 25 мг на дозу, особенно от 0,5 до 2,5 мг на дозу. Относительно низкую дозу вводят в относительно нечастые интервалы в течение 35 длительного периода времени. Некоторым пациентам продолжают проводить лечение в течение их оставшейся жизни. В терапевтических применениях, относительно высокая доза (например, приблизительно от 1 до 400 мг/кг антитела на дозу, где дозы от 5 до 25 мг являются наиболее часто используемыми для радиоиммуноконъюгатов, и более высокие дозы - для модифицированных цитотоксином-лекарственным средством 40 антител) в относительно короткие интервалы иногда необходимы до тех пор, пока прогрессирование заболевания не уменьшится или не прекратится, и предпочтительно, пока для пациента не будет показано частичное или полное облегчение симптомов заболевания. После этого пациенту можно осуществлять введение в профилактическом режиме.

Связывающие полипептиды по настоящему описанию можно, необязательно, вводить 45 в комбинации с другими средствами, которые являются эффективными в лечении нарушения или состояния, нуждающееся в лечении (например, профилактическом или терапевтическом). Эффективные однократные дозы для лечения (т.е., терапевтически эффективные количества) 90Y-меченых модифицированных антител по настоящему

описанию лежат в диапазоне между приблизительно 5 и приблизительно 75 мКи, более предпочтительно, между приблизительно 10 и приблизительно 40 мКи. Эффективные однократные не разрушающие костный мозг дозы для лечения 131I-модифицированных антител лежат в диапазоне между приблизительно 5 и приблизительно 70 мКи, более предпочтительно, между приблизительно 5 и приблизительно 40 мКи. Эффективные однократные разрушающие дозы для лечения (т.е., могущие требовать аутологичной трансплантации костного мозга) 131I-меченых антител лежат в диапазоне между приблизительно 30 и приблизительно 600 мКи, более предпочтительно, между приблизительно 50 и менее чем приблизительно 500 мКи. В сочетании с химерным антителом, благодаря более длительному времени полужизни в кровотоке по сравнению с мышиными антителами, эффективные однократные не разрушающие костный мозг дозы для лечения меченых иодом-131 химерных антител лежат в диапазоне между приблизительно 5 и приблизительно 40 мКи, более предпочтительно, менее чем приблизительно 30 мКи. Критерии получения изображений, например, для метки 111In, составляют, как правило, менее чем приблизительно 5 мКи.

В то время как связывающие полипептиды можно вводить, как описано непосредственно выше, необходимо подчеркнуть, что в других вариантах осуществления связывающие полипептиды можно вводить в остальном здоровым пациентам в качестве терапии первой линии. В таких вариантах осуществления связывающие полипептиды можно вводить пациентам, обладающим нормальными или средними ресурсами красного костного мозга, и/или пациентам, которых не подвергали и не подвергают. Как применяют в настоящем документе, введение модифицированных антител или их фрагментов в сочетании или в комбинации с вспомогательной терапией обозначает последовательное, одновременное, одинаковое по протяженности, параллельное, сопутствующее или совпадающее по времени введение или применение терапии и описанных антител. Специалистам в данной области понятно, что введение или применение различных компонентов режима комбинированной терапии можно регулировать по времени для увеличения общей эффективности лечения. Например, химиотерапевтические средства можно вводить в стандартных, хорошо известных курсах лечения с последующимиическими неделями с радиоиммуноконъюгатами по настоящему описанию. И наоборот, ассоциированные с цитотоксином связывающие полипептиды можно вводить внутривенно с последующей локализованной в опухоли наружной дистанционной лучевой терапией. В других вариантах осуществления модифицированный связывающий полипептид можно вводить параллельно с одним или несколькими избранными химиотерапевтическими средствами за одно посещение клиники. Специалист в данной области (например, опытный онколог) легко может определять эффективные режимы комбинированной терапии без излишнего экспериментирования на основании избранной вспомогательной терапии и объяснений в настоящем описании.

В этой связи следует понимать, что комбинацию связывающих полипептидов и химиотерапевтического средства можно вводить в любом порядке и внутри любых временных рамок, обеспечивающих терапевтическое преимущество для пациента. То есть, химиотерапевтическое средство и связывающие полипептиды можно вводить в любом порядке или параллельно. В избранных вариантах осуществления связывающие полипептиды по настоящему описанию вводят пациентам, которых ранее подвергали химиотерапии. В других вариантах осуществления лечение связывающими полипептидами и химиотерапевтическим средством можно проводить по существу одновременно или параллельно. Например, пациенту можно вводить связывающие

полипептиды при подвергании курсу химиотерапии. В предпочтительных вариантах осуществления модифицированное антитело вводят в пределах одного года от любого химиотерапевтического средства или лечения. В других предпочтительных вариантах осуществления связывающие полипептиды вводят в пределах 10, 8, 6, 4 или 2 месяцев от любого химиотерапевтического средства или лечения. В других предпочтительных вариантах осуществления связывающий полипептид вводят в пределах 4, 3, 2 или 1 недели (недель) от любого химиотерапевтического средства или лечения. В других вариантах осуществления связывающие полипептиды вводят в пределах 5, 4, 3, 2 или 1 суток от избранного химиотерапевтического средства или лечения. Кроме того, следует понимать, что два средства или способа терапии можно применять для пациента в пределах часов или минут (т.е. по существу одновременно).

Кроме того, следует понимать, что связывающие полипептиды по настоящему описанию можно использовать в сочетании или в комбинации с любыми химиотерапевтическими средствами или агентами (например, для обеспечения режима комбинированной терапии), которые прекращают, уменьшают, ингибируют или контролируют рост неопластических клеток *in vivo*. Иллюстративные химиотерапевтические средства, совместимые с настоящим описанием, включают алкилирующие средства, алкалоиды барвинка (например, винкристин и винбластин), прокарбазин, метотрексат и преднизон. Комбинация из четырех лекарственных средств MOPP (мехлетамин (азотистый иприт), винкристин (онковин), прокарбазин и преднизон) является очень эффективной для лечения различных типов лимфомы и составляет предпочтительный вариант осуществления по настоящему описанию. У устойчивых к MOPP пациентов можно использовать комбинации ABVD (например, адриамицин, блеомицин, винбластин и декарбазин), ChIVPP (хлорамбуцил, винбластин, прокарбазин и преднизон), CABS (ломустин, доксорубицин, блеомицин и стрептозотоцин), MOPP плюс ABVD, MOPP плюс ABV (доксорубицин, блеомицин и винбластин) или BCVPP (кармустин, циклофосфамид, винбластин, прокарбазин и преднизон). См. в Arnold S. Freedman and Lee M. Nadler, *Malignant Lymphomas*, in *HARRISON'S PRINCIPLES OF INTERNAL MEDICINE* 1774-1788 (Kurt J. Isselbacher et al, eds., 13th ed. 1994) и V.T. DeVita et al, (1997) и процитированных в них ссылках на стандартные дозы и расписание. Эти способы терапии можно использовать без изменений или изменять, как необходимо для конкретного пациента, в комбинации с одним или несколькими связывающими полипептидами по настоящему описанию, как описано в настоящем документе.

Дополнительные режимы, которые можно использовать в контексте настоящего описания, включают отдельные алкилирующие средства, такие как циклофосфамид или хлорамбуцил, или комбинации, такие как CVP (циклофосфамид, винкристин и преднизон), CHOP (CVP и доксорубицин), C-MOPP (циклофосфамид, винкристин, преднизон и прокарбазин), CAP-BOP (CHOP плюс прокарбазин и блеомицин), m-BACOD (CHOP плюс метотрексат, блеомицин и лейковорин), ProMACE-MOPP (преднизон, метотрексат, доксорубицин, циклофосфамид, этопозид и лейковорин плюс стандартный MOPP), ProMACE-CytarBOM (преднизон, доксорубицин, циклофосфамид, этопозид, цитарабин, блеомицин, винкристин, метотрексат и лейковорин) и MACOP-B (метотрексат, доксорубицин, циклофосфамид, винкристин, фиксированная доза преднизона, блеомицин и лейковорин). Специалисты в данной области могут легко определять стандартные дозы и расписание для каждого из этих режимов. CHOP также комбинируют с блеомицином, метотрексатом, прокарбазином, азотистым ипритом, арабинозидом цитозина и этопозидом. Другие совместимые химиотерапевтические средства включают, но без ограничения, 2-хлордезоксиаденозин (2-CDA), 2'-

дезоксикоформицин и флударабин.

Для пациентов с NHL со средней и высокой степенью злокачественности, для которых не удалось достичь ремиссии, или с рецидивом, можно использовать терапию спасения. В способах терапии спасения используют такие лекарственные средства, как арабинозид

- цитозина, карбоплатин, цисплатин, этопозид и ифосфамид, введенные по отдельности или в комбинации. При рецидивирующих или агрессивных формах конкретных неопластических нарушений часто используют следующие протоколы: IMVP-16 (ифосфамид, метотрексат и этопозид), MIME (этилметил-gag, ифосфамид, метотрексат и этопозид), DHAP (дексаметазон, высокая доза цитарарабина и цисплатин), ESHAP (этопозид, метилпреднизолон, HD цитарарабин, цисплатин), СЕРР(В) (циклофосфамид, этопозид, прокарбазин, преднизон и блеомицин) и САМР (ломустин, митоксантрон, цитарарабин и преднизон), где для каждого хорошо известны частоты и расписания дозирования.

Количество химиотерапевтического средства для использования в комбинации с

- 15 модифицированными антителами по настоящему описанию можно изменять для субъекта или можно вводить в соответствии с тем, что известно в данной области. См. например, Bruce A Chabner et al, Antineoplastic Agents, in GOODMAN & GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS 1233-1287 ((Joel G. Hardman et al, eds., 9th ed. 1996).

- 20 Как обсуждали ранее, связывающие полипептиды по настоящему описанию, их иммунореактивные фрагменты или рекомбинантные варианты можно вводить в фармацевтически эффективном количестве для лечения *in vivo* нарушений у млекопитающих. В этой связи, следует понимать, что описанные связывающие полипептиды можно составлять для облегчения введения и повышения стабильности

25 активного средства.

Предпочтительно, фармацевтические композиции в соответствии с настоящим описанием содержат фармацевтически приемлемый, нетоксичный, стерильный носитель, такой как физиологический солевой раствор, нетоксичные буферы, консерванты и т.п.. Для целей по настоящей заявке, фармацевтически эффективное количество

- 30 модифицированного связывающего полипептида, его иммунореактивного фрагмента или рекомбинантного варианта, конъюгированного или неконъюгированного с лекарственным средством, следует поддерживать в среднем количестве, достаточном для достижения эффективного связывания с антигеном и для достижения преимущества, например, для облегчения симптомов заболевания или нарушения, или для детекции
- 35 вещества или клетки. В случае клеток опухолей, модифицированный связывающий полипептид предпочтительно способен взаимодействовать с выбранными иммунореактивными антигенами на неопластических или иммунореактивных клетках и обеспечивать увеличение гибели этих клеток. Разумеется, фармацевтические композиции по настоящему описанию можно вводить в однократной или множественных
- 40 дозах для предоставления фармацевтически эффективного количества модифицированного связывающего полипептида.

- 45 В соответствии с объемом настоящего описания, связывающие полипептиды из описания можно вводить человеку или другому животному в соответствии с вышеупомянутыми способами лечения в количестве, достаточном для оказания терапевтического или профилактического эффекта. Связывающие полипептиды из описания можно вводить такому человеку или другому животному в общепринятой лекарственной форме, полученной комбинацией антитела из описания с общепринятым фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем в соответствии с известными

способами. Специалисту в данной области известно, что форма и характер фармацевтически приемлемого носителя или разбавителя продиктованы количеством активного ингредиента, с которым его следует комбинировать, способом введения и другими хорошо известными переменными. Специалистам в данной области, кроме 5 того, известно, что можно доказать, что смесь, содержащая один или несколько видов связывающих полипептидов, описанных в настоящем описании, является особенно эффективной.

Х. Экспрессия связывающих полипептидов

В одном аспекте изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующими

10 связывающие полипептиды, описанные в настоящем документе. Представлен также способ получения связывающего полипептида, включающий экспрессию этих полинуклеотидов.

Полинуклеотиды, кодирующие связывающие полипептиды, описанные в настоящем 15 документе, как правило, вставляют в экспрессирующую вектор для введения в клетки- хозяева, которые можно использовать для продукции желательного количества заявленных антител или их фрагментов. Соответственно, в конкретных аспектах, изобретение относится к экспрессирующим векторам, содержащим полинуклеотиды, описанные в настоящем документе, и к клеткам-хозяевам, содержащим эти векторы и полинуклеотиды.

20 Термин «вектор» или «экспрессирующий вектор» применяют в настоящем документе для целей описания и формулы изобретения, для обозначения векторов, используемых в соответствии с настоящим изобретением в качестве носителя для введения желаемого гена в клетку и экспрессии желаемого гена в клетке. Как известно специалистам в данной 25 области, такие векторы можно легко выбирать из группы, состоящей из плазмид, фагов, вирусов и ретровирусов. Как правило, векторы, совместимые с настоящим изобретением, обладают селективным маркером, подходящими участками рестрикции для облегчения клонирования желательного гена и способностью входить в эукариотические или 30 прокариотические клетки, и/или реплицироваться в них.

35 Многочисленные системы экспрессирующих векторов можно использовать для целей по этому изобретению. Например, в одном классе векторов используют элементы ДНК, происходящие из вирусов животных, таких как вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус полиомы, адено-вирус, вирус осповакцины, бакуловирус, ретровирусы (RSV, MMTV или MOMLV) или вирус SV40. Другие включают использование 40 полицистронных систем с внутренними участками связывания рибосом. Кроме того,

45 клетки, обладающие ДНК, интегрированной в их хромосомы, можно отбирать посредством введения одного или нескольких маркеров, позволяющих отбор трансфицированных клеток-хозяев. Маркер может придавать прототрофность ауксотрофному хозяину, устойчивость к биоцидам (например, антибиотикам) или устойчивость к тяжелым металлам, таким как медь. Ген селективного маркера можно либо напрямую связывать с последовательностями ДНК, подлежащими экспрессии, либо вводить в одну и ту же клетку посредством совместной трансформации.

50 Дополнительные элементы также могут потребоваться для оптимального синтеза мРНК. Эти элементы могут включать сигнальные последовательности, сигналы сплайсинга, так же как транскрипционные промоторы, энхансеры и сигналы терминации. 55 В особенно предпочтительных вариантах осуществления клонированные гены вариабельной области вставляют в экспрессирующую вектор вместе с генами константной области тяжелой и легкой цепи (предпочтительно, человеческими), синтезированными, как обсуждали выше.

В других предпочтительных вариантах осуществления связывающие полипептиды по изобретению можно экспрессировать с использованием полицистронных конструкций. В таких системах экспрессии множество представляющих интерес продуктов генов, таких как тяжелые и легкие цепи антител, можно получать с одной полицистронной 5 конструкции. В этих системах преимущественно используют внутренний участок связывания рибосомы (IRES) для обеспечения относительно высоких уровней полипептидов по изобретению в эукариотических клетках-хозяевах. Совместимые последовательности IRES описаны в Патенте США №. 6193980, содержание которого приведено в настоящем документе путем ссылки. Специалистам в данной области 10 понятно, что такие системы экспрессии можно использовать для эффективного получения полного диапазона полипептидов, описанных в настоящем описании.

В более общем смысле, после получения вектора или последовательности ДНК, кодирующей антитело или его фрагмент, экспрессирующий вектор можно вводить в подходящую клетку-хозяина. То есть, клетки-хозяева можно трансформировать.

15 Введение плазмида в клетку-хозяина можно осуществлять различными способами, хорошо известными специалистам в данной области. Они включают, но без ограничения, трансфекцию (включая электрофорез и электропорацию), слияние протопластов, преципитацию фосфатом кальция, слияние клеток с покрытой оболочкой ДНК, микроинъекцию и инфекцию интактным вирусом. См., Ridgway, A.A.G. «Mammalian 20 Expression Vectors» Chapter 2422,, pp. 470-472 Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988). Наиболее предпочтительно, введение плазмида в хозяина происходит посредством электропорации. Трансформированные клетки выращиваются в условиях, подходящих для продукции легких цепей и тяжелых цепей, и анализируют синтез белка для тяжелой и/или легкой цепи. Иллюстративные способы 25 анализа включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммунный анализ (RIA) или анализ сортировки клеток с активацией флуоресценции (FACS), иммуногистохимию и т.п.

Как применяют в настоящем документе, термин «трансформация» следует использовать в широком смысле для обозначения введения ДНК в клетку-хозяина - 30 реципиента, которое изменяет генотип и впоследствии приводит к изменению в клетке-реципиенте.

Среди одних и тех же линий, «клетки-хозяева» относятся к клеткам, трансформированным векторами, конструированными с использованием способов рекомбинантной ДНК и кодирующими по меньшей мере один гетерологичный ген. В 35 описаниях способов выделения полипептидов из рекомбинантных хозяев, термины «клетка» и «культура клеток» используют взаимозаменяемо для обозначения источника антитела, если явно не указано иначе. Иными словами, выделение полипептида из «клеток» может означать выделение либо из осажденных центрифугированием цельных клеток, либо из культуры клеток, содержащих как среду, так и супензированные 40 клетки.

В одном варианте осуществления линия клеток-хозяев, использованная для экспрессии антитела, происходит из млекопитающих; специалисты в данной области могут определять конкретные линии клеток-хозяев, лучше всего подходящие для желательного продукта гена, подлежащего экспрессии в настоящем документе. Иллюстративные 45 линии клеток-хозяев включают, но без ограничения, DG44 и DUXB11 (линии яичников китайского хомяка, DHFR минус), HEla (карцинома шейки матки человека), CVI (линия почек человека), COS (производное CVI с T-антителом SV40), R1610 (фибробласты китайского хомяка) BALBC/3T3 (фибробласты мыши), НАК (линия почек хомяка),

SP2/O (миелома мыши), BFA-1c1BPT (бычьи эндотелиальные клетки), RAJ (лимфоциты человека), 293 (почка человека). В одном варианте осуществления линия клеток обеспечивает измененное гликозилирование, например, афукозилирование, экспрессированного из нее антитела (например, PER.C6.RTM. (Crucell) или линии клеток

5 CHO с нокаутом FUT8 (клетки Potelligent.RTM.) (Biowa, Princeton, N.J.)). В одном варианте осуществления можно использовать клетки NS0. Клетки CHO являются особенно предпочтительными. Линии клеток-хозяев, как правило, доступны из коммерческих организаций, из Американской коллекции типовых культур или из опубликованной литературы.

10 Продукция *in vitro* позволяет масштабирование для получения более крупных количеств желательных полипептидов. Способы культивирования клеток млекопитающих в условиях культивирования тканей известны в данной области и включают культивирование в гомогенной супензии, например, в аэролифтном реакторе или в реакторе с непрерывным перемешиванием, или в иммобилизованной или связанной

15 культуре клеток, например, в полых волокнах, микрокапсулах, на агарозных микробусинах или в керамических картриджах. Если необходимо и/или желательно, растворы полипептидов можно очищать общепринятыми способами хроматографии, например, гель-фильтрацией, ионообменной хроматографией, хроматографией на DEAE-целлюлозе и/или (иммuno-)аффинной хроматографией.

20 Гены, кодирующие связывающие полипептиды по изобретению, можно также экспрессировать в не относящихся к млекопитающим клеткам, таких как бактерии или дрожжи, или в клетках растений. В этой связи следует понимать, что различные одноклеточные не относящиеся к млекопитающим микроорганизмы, такие как бактерии, также можно трансформировать; т.е. микроорганизмы, способные к росту в культурах

25 или к ферментации. Бактерии, чувствительные к трансформации, включают члены enterobacteriaceae, такие как штаммы *Escherichia coli* или *Salmonella*; *Bacillaceae*, такие как *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus* и *Haemophilus influenzae*. Кроме того, следует понимать, что при экспрессии в бактериях, полипептиды могут становиться частью телец включения. Полипептиды можно выделять, очищать и затем собирать в

30 функциональные молекулы.

В дополнение к прокариотам, можно использовать также эукариотические микроорганизмы. *Saccharomyces cerevisiae*, или общепринятые пекарские дрожжи, наиболее часто используют среди эукариотических микроорганизмов, хотя ряд других штаммов является общедоступным. Для экспрессии в *Saccharomyces* обычно используют

35 например, плазмиду YRp7 (Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979); Kingsman et al., *Gene*, 7:141 (1979); Tschemper et al., *Gene*, 10:157 (1980)). Эта плазмода уже содержит ген TRP1, обеспечивающий селективный маркер для мутантного штамма дрожжей с отсутствием способности расти на триптофане, например, ATCC No. 44076 или PEP4-1 (Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)). Присутствие локуса *trp1* в качестве характеристики генома клетки-хозяина

40 дрожжей обеспечивает эффективное окружение для детекции трансформации по росту в отсутствие триптофана.

ПРИМЕРЫ

Настоящее изобретение далее проиллюстрировано следующими примерами, которые не следует рассматривать как дополнительно ограничивающие. Содержание списка

45 последовательностей, фигур и всех ссылок, патентов и опубликованных патентных заявок, упомянутых в этой заявке, явным образом включено в настоящий документ путем ссылки.

Пример 1. Разработка, получение и характеристизация мутантов антитела 2C3 анти-

CD-52 с гипергликозилированием

Множество мутаций с гипергликозилированием разработаны в тяжелой цепи антитела анти-CD-52, 2C3, для цели добавления объемной группы на поверхности взаимодействия (например, участка связывания FcRn для модуляции фармакокинетики антитела), для 5 модуляции эффекторной функции антитела посредством изменения его взаимодействия с FcγR или для введения нового участка сшивки для последующей химической модификации для конъюгации эффекторной группы, включая, но без ограничения, лекарственные средства, токсины, цитотоксические средства и радионуклеотиды.

Гипергликозилированные мутанты 2C3 указаны в таблице 3.

10

15

20

25

30

35

40

45

Таблица 3.

Гипергликозилированные мутанты 2С3 анти-CD-52

Мутация	Желательное преимущество	Применения
A114N	Гликозилирование на Asn-Ser-Thr	1) Контроль 2) Конъюгация эфекторной группы
Y436T	Гликозилирование на Asn434 Ингибирование связывания FcRn	1) Трансплантат и другие показания, требующие короткого времени полужизни
Y436S	Гликозилирование на Asn434 Ингибирование связывания FcRn	1) Трансплантат и другие показания, требующие короткого времени полужизни
S440N	Гликозилирование at Asn-Leu-Ser	1) Контроль 2) Конъюгация эфекторной группы
S442N	Гликозилирование на Asn-Leu-Ser	1) Контроль 2) Конъюгация эфекторной группы
Добавление NGT к С-концу	Гликозилирование	1) Контроль 2) Конъюгация эфекторной группы
S298N/Y300S	Гликозилирование на Asn298 Снижение эфекторной функции	1) Снижение эфекторной функции 2) Конъюгация эфекторной группы

1А. Получение мутантов антитела 2С3 анти-CD-52 с гипергликозилированием
Мутацию A114N, обозначенную на основе системы нумерации Kabat, вводили в домен CH1 2С3 посредством мутагенной ПЦР. Для получения полноразмерного антитела домен VH плюс мутантный остаток A114N вставляли посредством независимого от лигирования клонирования (LIC) в вектор pENTR-LIC-IgG1, кодирующий домены CH 1-3 антитела. Все другие мутации вводили в pENTR-LIC-IgG1 посредством сайт-направленного мутагенеза с помощью набора для сайт-направленного мутагенеза QuikChange (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA). VH 2С3 WT клонировали в

мутантные векторы посредством LIC. Полноразмерные мутанты клонировали в экспрессирующий вектор pCEP4(-E+I)Dest посредством клонирования Gateway. Мутации Fc обозначены на основании системы нумерации EU. Мутации подтверждали посредством секвенирования ДНК. Аминокислотные последовательности тяжелых и легких цепей 2C3 WT и мутантных тяжелых цепей 2C3 указаны в таблице 4. Мутантные аминокислоты выделены серым, и консенсусные участки-мишени гликозилирования, полученные посредством мутации, подчеркнуты.

Таблица 4.

Аминокислотные последовательности антител 2C3 против CD-52

SEQ ID NO	Наименование	Аминокислотная последовательность
10	1 Анти-CD-52 WT, легкая цепь	DIVMTQTPLCSVTPGQFASISCKSSQSLLYSNG KTYLNWLQKPGQSPQRILYLVSKLDSGVPDFR FSGSGSGTDFLKISRVEAEDVGVYCYVQGTHL HTFGQGTRLEKRTVAAPSFHPPSDEQLKSGT ASVVCLLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFRGEC
	2 Анти-CD-52 WT, тяжелая цепь	VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYW MNWVRQAPGKLEWVGQIRLKSNNYATHY AESVKGRFTISRDSDSKNSLYLQMNLSKTEDTA VYVCTPVDFWGQGTIVTSSASTKGPSVFLAPS SSSKSTSGTAALGCLVKDYPFPEPVTVWSNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT YICNVNHPKSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PAPELLGGPSVFLPPPKPKDTLMISRTPEVTC VDSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVSVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPEN NYKTTTPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15	3 Анти-CD-52 A114N, тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTY WMNWRQAPGKLEWVGQIRLKSNNYATHY AESVKGRFTISRDSDSKNSLYLQMNLSKTEDTA VYVCTPVDFWGQGTIVTSSASTKGPSVFLAPS SSSKSTSGTAALGCLVKDYPFPEPVTVWSNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHPKSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLPPPKPKDTLMISRTPEVTC VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP EEQYNSTYRVSVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPEN NYKTTTPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	4 Анти-CD-52 Y436S, тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTY WMNWRQAPGKLEWVGQIRLKSNNYATHY AESVKGRFTISRDSDSKNSLYLQMNLSKTEDTA VYVCTPVDFWGQGTIVTSSASTKGPSVFLAPS SSSKSTSGTAALGCLVKDYPFPEPVTVWSNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHPKSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLPPPKPKDTLMISRTPEVTC VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP EEQYNSTYRVSVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPEN NYKTTTPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
20	5 Анти-CD-52 S440N, тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTY WMNWRQAPGKLEWVGQIRLKSNNYATHY AESVKGRFTISRDSDSKNSLYLQMNLSKTEDTA VYVCTPVDFWGQGTIVTSSASTKGPSVFLAPS SSSKSTSGTAALGCLVKDYPFPEPVTVWSNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHPKSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLPPPKPKDTLMISRTPEVTC VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP EEQYNSTYRVSVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPEN NYKTTTPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
25		
30		
35		

40

45

5	6	Анти-CD-52 S442N, тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTY WMNWVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHY AESVKGRFTISRDSDKNSLYLQMNSLKTDETA VYYCTPVDFWGQGTTVSSASTKGPVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDVFPEPVTVWSNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGI QTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLPPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVINAFTKPR EEQYNSTYRVSSTVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIKAKGOPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLNLSPGK
10	7	Анти-CD-52 NGT, тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTY WMNWVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHY AESVKGRFTISRDSDKNSLYLQMNSLKTDETA VYYCTPVDFWGQGTTVSSASTKGPVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDVFPEPVTVWSNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGI QTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLPPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVINAFTKPR EEQYNSTYRVSSTVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIKAKGOPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLNLSPGK
15	8	Анти-CD-52 S298N/Y300S, тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTY WMNWVRQAPGKGLEWVGQIRLKSNNYATHY AESVKGRFTISRDSDKNSLYLQMNSLKTDETA VYYCTPVDFWGQGTTVSSASTKGPVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDVFPEPVTVWSNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGI QTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLPPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVINAFTKPR EEQYNSTYRVSSTVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTIKAKGOPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPEN NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLNLSPGK

20 Мутанты и контроль WT трансфицировали в клетки HEK293-EBNA в формате 6-луночного планшета. Как показано на фигуре 9, обнаружено, что уровень экспрессии составляет ~0,1 мкг/мл, как анализировали посредством SDS-PAGE и Вестерн-блоттинга. Экспрессию мутантов в кондиционированных средах измеряли также по связыванию белка A на Biacore. Концентрацию определяли с использованием ответа диссоциации через 6 минут после инъекции на иммобилизованный белок A. Продуцированное в CHO 2C3 WT, серийно разведенное в среде от 90 мкг/мл до 1,5 нг/мл, использовали в качестве стандартной кривой. Концентрации рассчитывали ниже до ~0,2 мкг/мл посредством калибровочной кривой с использованием 4-параметрического соответствия. Как показано на фигуре 9, относительные уровни экспрессии являлись низкими и в основном соответствовали результатам Вестерн-блоттинга.

1B. Верификация гипергликозилирования

Для определения того, введены ли дополнительные участки гликозилирования посредством мутации, белки 2C3 мутантного и дикого типа обрабатывали универсальным дегликозилирующим ферментом PNGase F, и образцы белка анализировали посредством SDS-PAGE и Вестерн-блоттинга. Как показано на фигуре 10, только мутант A114N обладал увеличенной кажущейся молекулярной массой, что указывает на присутствие дополнительного N-связанного углевода.

40 Препараты антитела в малом масштабе получали для очистки мутантов 2C3 для дальнейшей верификации введения участка гликозилирования. Как показано на фигуре 11, посредством SDS-PAGE подтвердили, что только мутант A114N обладал дополнительными введенными участками гликозилирования.

1C. Свойства связывания мутантов анти-CD-52 2C3

Biacore использовали для сравнения свойств связывания очищенных белков.

Мышиный и очищенный SEC FcRn-HPC4 человека иммобилизовали на чипе CM5 45 посредством присоединения амина. Каждое антитело разводили до 200, 50 и 10 нМ, и инъектировали поверх Fc-рецепторов. Кампрат, продуцированное в CHO 2C3 WT и обработанный DEPC кампрат включали в качестве положительного и отрицательного контроля. Как показано на фигуре 13, для мутанта Y436S показано приблизительно 2-

кратное уменьшение связывания с FcRn человека. Интересно, что связывание этого мутанта с FcRn мыши не было затронуто. Ни одна из других мутаций 2C3 не оказывала какого-либо значительного влияния на связывание с FcRn человека или мыши.

Biacore использовали для сравнения антигенсвязывающих свойств очищенных белков

- 5 с использованием анализа связывания Biacore пептида 741 CD-52. Пептид 741 CD-52 и контрольный пептид 777 иммобилизовали на чипе CM5. Антитела серийно разводили в 2 раза от 60 до 0,2 нМ в HBS-EP и инъецировали в двух повторах в течение 3 мин с последующими 5 мин диссоциации в буфере при скорости потока 50 мкл/мин. Партию 17200-084 GLD52 включали в качестве контроля. Поверхность регенерировали с 10 помощью 1 импульса 40 мМ HCl. Модель связывания 1:1 использовали для подбора кривых от 7,5 до 0,2 нМ. Как показано на фигуре 16, мутант A114N обладал немного более низкой аффинностью связывания CD-52, в то время как мутант NGT обладал немного более высокой аффинностью, чем остальные мутанты в этом анализе. Анализ связывания Biacore пептида 741 CD-52 повторяли с белком, очищенным из препарата 15 более крупного масштаба. Как показано на фигуре 17, для мутанта A114N показано связывание пептида CD-52, сравнимое с WT 2C3.

1D. Характеризация заряда мутанта A114N

Изоэлектрическое фокусирование (IEF) проводили для характеристики заряда мутантов 2C3. Очищенный белок разделяли в акриламидных гелях с фиксированным

- 20 градиентом pH (pH3-10) (IPG). Как показано на фигуре 18A, обнаружено, что A114N обладает более отрицательным зарядом, вероятно, из-за остатков сиаловой кислоты. Данные интактной MS подтвердили комплексную структуру с сиаловыми кислотами на мутанте A114N. В отличие от этого, показано, что 2C3 WT обладает G0F и G1F в качестве домinantных видов гликозилирования (фигуры 18C и 18D, соответственно).

- 25 Пример 2. Получение мутантов с гипергликозилированием в оставах нескольких антител

В дополнение к антителу 2C3 против CD-52, мутацию A114N конструировали в оставах нескольких других антител для подтверждения того, что уникальный участок гипергликозилирования можно вводить в неродственные последовательности

- 30 вариабельного домена тяжелой цепи. Гипергликозилированные мутанты анти-TEM1, анти-FAP, и анти-Her2 указаны в таблице 5.

35

40

45

Таблица 5.

Мутанты A114N и/или S298N, сконструированные в остоях нескольких наследственных антител

Мутация	Антитело	Желательные преимущества	Применения	
5	A114N	анти-TEM1 анти-FAP анти-Her2	Дополнительный участок гликозилирования на шарнире изгиба тяжелой цепи для сайт-специфической опосредованной углеводом конъюгации	1) Контроль 2) Аминоокси-конъюгация токсина через экспонированную группу сиаловой кислоты или галактозы (SAM или GAM)
10	S298N/T299A/Y300S (NNAS)	анти-Her2	переключение гликозилирования с Asn297 на сконструированный Asn298. Ожидаемые экспонированные для растворителя и комплексные углеводы на S298N, предоставляющие участок конъюгации и средства для удаления эффекторной функции	1) Аминоокси-конъюгация токсина через экспонированную группу сиаловой кислоты или галактозы (SAM или GAM) 2) Снижение эффекторной функции
15	A114N/NNAS	анти-Her2	Потенциал для увеличенного выхода конъюгации с двумя участками конъюгации	1) Контроль 2) Аминоокси-конъюгация токсина через экспонированную группу сиаловой кислоты или галактозы (SAM или GAM)
20				
25	2A. Получение мутантов антител анти-TEM1 и анти-FAP с гипергликозилированием			
	Мутацию A114N, обозначенную на основе системы нумерации Kabat, вводили в домен СН1 анти-TEM1 и анти-FAP посредством мутагенной ПЦР. Для получения полноразмерного антитела мутантный VH плюс остаток 114 вставляли посредством независимого от лигирования клонирования (LIC) в вектор pENTR-LIC-IgG1,			
30	кодирующий домены СН 1-3 антитела. Затем полноразмерные мутанты клонировали в экспрессирующий вектор pCEP4(-E+I)Dest посредством клонирования Gateway. Мутации подтверждали посредством секвенирования ДНК. Аминокислотные			
	последовательности анти-TEM1 дикого типа и мутантных тяжелых и легких цепей			
35	указаны в таблице 6. Мутантные аминокислоты выделены серым, и консенсусные участки-мишени гликозилирования, полученные посредством мутации, подчеркнуты.			

Таблица 6.

Аминокислотные последовательности антител анти-TEM1 и анти-FAP

SEQ ID NO	Наименование	Аминокислотная последовательность
9	Анти-TEM1 WT, легкая цепь (клон #187)	EIVLTQSPGTLTLSPGERATLSCRASQSVSSSYL AWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSG SGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSFWTFG QGTVKEIKRTVAAPS VFTPPPSDEQQLKSGTASVV CLLNNFTPREAKVQWQKVDNALQSNGNSQESVT EQDSKDKDSTSLLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQQLSSPVTKSFNRGEC
40	10 Анти-TEM1 WT, тяжелая цепь (клон #187)	QVQLQESAPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSYY WSWIRQPPGKGLLEYIYGYYTTGSAINYNPLQLSR VTIISVDTSKNQFSLKLNSVTAADTAVYYCARE GVRGASGYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTK GPSVFLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYPFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSGSLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHPNSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPCCPAPELLGGPSVFLPPPKPDKTLMIS RTPEVTCVVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSKIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVPLSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
45		

11	Анти-TEM1 A114N	QVQLQESAPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSYY WSWIRQPPGKGLEYIYGIVYYTTGSAIYNPSLQSR VTISVDTSKNQFSLKLNSVTAADTAVYYCARE GVRGASGYYYYGMDVWGQGTTVTVSS <u>STK</u> GPSVFP LAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPV TVSWNNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHPSPNTKVDDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLPPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSPG K*
----	-----------------	---

5 Мутанты и контроль дикого типа трансфицировали в клетки HEK293-EBNA в формате трех повторов флаконов и очищали на колонках HiTrap с белком A (GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA, USA). Как анализировано по A280 на спектрофотометре NanoDrop, экспрессия анти-FAP A114N и анти-FAP A114C составляла приблизительно 3 мкг/мл и приблизительно 1 мкг/мл, соответственно. Экспрессия анти-TEM1 A114N составляла приблизительно 0,04 мкг/мл.

10 2В. Верификация гипергликозилирования

15 Для подтверждения того, что дополнительный участок гликозилирования введен в мутанты A114N, очищенный белок из мутантов A114N анализировали в восстанавливающем SDS-PAGE вместе с контрольным белком дикого типа. Один дополнительный участок гликозилирования может добавлять 2000-3000 Дальтон к молекулярной массе тяжелой цепи. Как показано на фигуре 20, SDS-PAGE показал, что 20 полосы мутантов A114N тяжелой цепи анти-FAP и анти-TEM1 обладали увеличенной кажущейся молекулярной массой, согласующейся с успешным введением дополнительного участка гликозилирования в оба антитела.

25 2С. Получение мутантов антитела анти-Her2 с гипергликозилированием

Антитела против Her-2 A114N, Her-2 A114N/NNAS и Her-2 WT получали посредством 30 независимого от лигирования клонирования. Синтезировали домен VH герцептина и амплифицировали ПЦР с двумя LIC-совместимыми наборами праймеров, либо WT, либо несущими мутацию A114N. Для получения полноразмерного антитела, амплифицированные вставки VH (WT или A114N) клонировали в два вектора pENTR, кодирующих домены CH 1-3, pENTR-LIC-IgG1 WT и pENTR-LIC-IgG1 NNAS, получая три полноразмерных мутанта (A114N, NNAS, A114N/NNAS) и контроль WT в качестве исходных клонов в pENTR. Эти мутанты клонировали в экспрессирующий вектор pCEP4(-E+I)Dest, посредством клонирования Gateway. Мутации подтверждали посредством секвенирования ДНК. Аминокислотные последовательности анти-Her-2 дикого типа и мутантных тяжелых и легких цепей указаны в таблице 7. Мутантные 35 аминокислоты выделены серым, и консенсусные участки-мишени гликозилирования, полученные посредством мутации, подчеркнуты.

Таблица 7.

Аминокислотные последовательности антител анти-Her-2

SEQ ID NO	Наименование	Аминокислотная последовательность
5	12 Анти-Her-2 WT, легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAV AWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSR SGTDFLTISLQPEDFATYYCQQHYTTPPPTFQQ CTKVEIKRTVAAAPSVHIFPPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSLTLTSKADYEKHKVYACEVT HQGLSPVTKSFRGEC
	13 Анти-Her-2 WT, тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFGNIKDTY IHWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSV KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS ST TKGPS VPLAPSSKSTS G GTAAALGCLVKDYP E PEPVTVS WNSGALTSGVHTFP A V L QSSGLYSLSSVVTVP S SSLGTQTYCICNVN H KPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFL F PPKPKD T LMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALP A PIEKTIS K AKGQPRE P QVYTL PPSDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPEENYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV D KSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
10	14 Анти-Her-2 A114N, тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFGNIKDTY IHWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSV KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS ST TKGPS VPLAPSSKSTS G GTAAALGCLVKDYP E PEPVTVS WNSGALTSGVHTFP A V L QSSGLYSLSSVVTVP S SSLGTQTYCICNVN H KPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFL F PPKPKD T LMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNA KTKPREEQYN N STYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALP A PIEKTIS K AKGQPRE P QVYTL PPSDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPEENYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV D KSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
	15 Анти-Her2 NNAS, тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFGNIKDTY IHWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSV KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS ST TKGPS VPLAPSSKSTS G GTAAALGCLVKDYP E PEPVTVS WNSGALTSGVHTFP A V L QSSGLYSLSSVVTVP S SSLGTQTYCICNVN H KPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFL F PPKPKD T LMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNA KTKPREEQYN N STYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALP A PIEKTIS K AKGQPRE P QVYTL PPSDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPEENYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV D KSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
15	16 Анти-Her2 A114N/NNAS, тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFGNIKDTY IHWRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSV KGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS ST TKGPS VPLAPSSKSTS G GTAAALGCLVKDYP E PEPVTVS WNSGALTSGVHTFP A V L QSSGLYSLSSVVTVP S SSLGTQTYCICNVN H KPSNTKVDKKVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFL F PPKPKD T LMISRT PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVGVEVHNA KTKPREEQYN N STYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALP A PIEKTIS K AKGQPRE P QVYTL PPSDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPEENYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV D KSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

2D. Экспрессия мутанта A114N антитела анти-Her2 с гипергликозилированием
Конструкции анти-Her2 A114N и дикого типа трансфицировали с помощью

- 35 липофектамина-2000 (соотношение реагента к ДНК 2,5:1) и XtremeGene HP (соотношение реагента к ДНК 3:1) в клетки HEK293-EBNA в 12 флаконах в трех повторах. Измерение в Octet аликвот кондиционированной среды (СМ) с суток 3 показало, что экспрессия белка являлась согласующейся среди 6 флаконов как для липофектамина-2000, так и для XtremeGene HP. Как показано в таблице 8, общая эффективность трансфекции была 40 приблизительно на 30% выше с XtremeGene HP. Кондиционированные среды, собранные на сутки 3, объединяли вместе для обоих условий трансфекции и очищали на колонке с белком А. Измерение Octet показало 1,8 мкг/мл антитела в содержащих сыворотку средах после ложной трансфекции по сравнении с 0 мкг/мл в не содержащих сыворотку средах после ложной трансфекции.

Таблица 8.

Экспрессия мутанта A114N анти-Her2 с гипергликозилированием

		Липофектамин-2000	XtremeGene HP
5	Очищенный белок с колонки с белком А	Концентрация (мг/мл)	1,72
		Объем (мл)	3,5
		Общий белок (мг)	6,02
10	Белок после замены буфера	Концентрация (мг/мл)	15,59
		Объем (мл)	0,2
		Общий белок (мг)	3,1
15		% выделения	51,8
			54,5

Кондиционированные среды с суток 6 собирали и очищали отдельно для каждого из 10 условий трансфекции. Оба элюата подвергали замене буфера в PBS, pH 7,2, и концентрировали в ~15 раз с использованием колонок Amicon-4 (отсечение 50 кДа). Для СМ на сутки 6 показан более высокий уровень экспрессии по сравнению с СМ на сутки 3. Как показано в таблице 8, всего 3 мг герцептина A114N 15,59 мг/мл (после трансфекции липофектамином) и 6 мг герцептина A114N 16,86 мг/мл (после трансфекции 15 XtremeGene HP) получено из кондиционированной среды на сутки 6 для дополнительных последующих применений, таких как конъюгация антитела-лекарственного средства.

2E. Анализ SDS-PAGE и HIC мутанта A114N анти-Her2

Перед конъюгацией, очищенный герцептин A114N характеризовали посредством SDS-PAGE и HIC (хроматографии гидрофобного взаимодействия). Как показано на 20 фигуре 21, определили, что количество очищенного герцептина A114N являлось пригодным для дальнейших последующих применений.

2F. Конъюгация со сконструированным гликозилированием

Показано, что: а) участок гликозилирования введен в участок положения Kabat 114 на анти-TEM1; б) мутант A114N обладал гипергликозилированием на тяжелой цепи по 25 восстанавливающему SDS-PAGE; и с) гипергликозилированный мутант A114N обладал комплексной углеводной структурой по интактной LC/MS, включая концевые сиаловые кислоты и галактозу, которые являются идеальными для конъюгации SAM и GAM.

Чтобы подтвердить, что сконструированный участок гликозилирования являлся 30 пригодным для конъюгации, анти-TEM1 A114N конъюгирували с 5 кДа PEG посредством химических реакций аминооксигруппы. Как показано на фигуре 22, PEG успешно 35 конъюгирували с анти-TEM1 A114N через аминоокси-связь. Этот мутант также успешно получали на оставах анти-FAP и анти-CD-52 2C3 (не показано). Эти данные показывают, что участок гликозилирования на N114 можно использовать для конъюгации эффекторных групп.

35 Пример 3: Получение мутантов S298N/Y300S Fc

Разрабатывали и получали сконструированные варианты Fc, в которых новый участок гликозилирования вводили в положении EU Ser 298, рядом с природным участком Asn297. Гликозилирование на Asn297 либо сохраняли, либо удаляли 40 посредством мутации. Мутации и желательные результаты гликозилирования указаны в таблице 9.

Таблица 9

Состояния гликозилирования различных вариантов антитела

#	Мутация	Желательное состояние гликозилирования	Применения
45	17 N297Q	Отсутствие гликозилирования (agly)	Контроль agly
	18 T299A	Отсутствие гликозилирования (agly)	Контроль agly, неизвестная эффекторная функция

5	19	N297Q/S298N/Y300S (NSY)	Отсутствие гликозилирования сконструированный участок гликозилирования 297, 298	Уменьшенная наэффекторная функция; но Конъюгация через экспонированные группы сиаловой кислоты или галактозы.
10	20	S298N/T299A/Y300S (STY)	Отсутствие гликозилирования сконструированный участок гликозилирования 297, 298	Уменьшенная наэффекторная функция; но Конъюгация через экспонированные группы сиаловой кислоты или галактозы.
15	21	S298N/Y300S (SY)	Два потенциальных участка гликозилирования 297 и 298; Изменения характера гликозилирования.	Уменьшенная наэффекторная функция; но Конъюгация через экспонированные группы сиаловой кислоты или галактозы.
20	22	Дикий тип	297	контроль

3A. Получение вариантов антитела H66 $\alpha\beta$ -TCR с измененным гликозилированием. Мутации вводили в тяжелую цепь антитела против $\alpha\beta$ Т-клеточного рецептора клона #66 посредством Quikchange с использованием матрицы pENTR_LIC_IgG1. Домен VH НЕВЕ1 Δ ab IgG1 #66 амплифицировали с помощью праймеров LIC перед клонированием в pENTR_LIC_IgG1 мутантного или дикого типа посредством LIC для получения полноразмерных антител мутантного или дикого типа. Субклонирование верифицировали с помощью двойного расщепления DraIII/XhoI, образующего вставку размером приблизительно 1250 п.о. в успешных клонах. Эти полноразмерные мутанты затем клонировали в экспрессирующий вектор, pCEP4(-E+I)Dest, посредством клонирования Gateway. Мутации подтверждали посредством секвенирования ДНК.

25 Аминокислотные последовательности тяжелых и легких цепей анти- $\alpha\beta$ TCR H66 WT и мутантных тяжелых цепей H66 указаны в таблице 10. Мутантные аминокислоты выделены серым, и консенсусные участки-мишени гликозилирования, полученные посредством мутации, подчеркнуты.

Таблица 10

30 Аминокислотные последовательности антител H66 анти- $\alpha\beta$ TCR

SEQ ID NO	Наименование	Аминокислотная последовательность	
23	Анти- $\alpha\beta$ TCR, клон H66, легкая цепь	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMIHW YQQKPGQAPRRLIVYDTSKLASGVPARFSGSGSCT SYTLTISLEPEDFAVYYCQOWSSNPLITPGGTK VEIKRTVAAPSVPFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKYQWKVVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSLTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFPNRGEC*	
35	24	Анти- $\alpha\beta$ TCR, клон H66, тяжелая цепь	EVQIJIQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKPTSYV MIVWVRQAPGKGLEW/GYINPYNDVTKYNEKFK GRFTLSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR GSYYDYDGFVYWGQGTIVTSSASTKGPSPVPL APSSKSISCGITAALGLCLVKDYLPEPVTVSWNSG ALTSGVHHTPPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQ TYICVNHHKPSNTVDKKVEPKSCDKTHTCPCP APELLGGPPSVFLPPKPKDITLMSRTPETCVVVD VSHEDEPVKENWVYDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVSVSLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTSIAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEVESNGQPENNYKTTTPVVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVNMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK*
40	25	Анти- $\alpha\beta$ TCR, клон H66 S298N/Y300S, тяжелая цепь	EVQIJIQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKPTSYV MIVWVRQAPGKGLEW/GYINPYNDVTKYNEKFK GRFTLSDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR GSYYDYDGFVYWGQGTIVTSSASTKGPSPVPL APSSKSISCGITAALGLCLVKDYLPEPVTVSWNSG ALTSGVHHTPPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGTQ TYICVNHHKPSNTVDKKVEPKSCDKTHTCPCP APELLGGPPSVFLPPKPKDITLMSRTPETCVVVD VSHEDEPVKENWVYDGVEVHNAKTKPREEQYN NTISRVSVSLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTSIAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEVESNGQPENNYKTTTPVVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVNMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK*

5	26	Анти- $\alpha\beta$ TCR, клон H66 S298N/T299A/Y300S, тяжелая цепь	EVQLLQSGGGLVQPGGSRLSLRCAASGYKFTSYV MHWVRQAPCKGLEWVGYINPYNDVTKYNEKFK GRFTLSRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTA VYCCAR GSYYDYDGFVYWGQGTLTVSSA STKGP SVFPL APSSKSTSGGTAA ALGCLVKD YFPEPVTVWSNG ALTSGVHTFFAVLQSSGLYLS S VVT VSSLG TQ TVICNVNHHKPSNTKVDKKV EPKSCD KHTCPCP AP ELLGGPSVFLFPPPKD TLMISRTPEVTCV VD VS HEDPEVKEFNVVYDGVVEVHNAKT K PREEQY N NSRVS VLT VHLQDWLNGKEYKCKVSNKALP ARIEKTISKA KGQPREPVY TLLPSRDELTKNQVS LCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTT PPYL DSDG SFFLYSKLTV DKS RWQQGVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK*
	27	Анти- $\alpha\beta$ TCR, клон H66 N297Q/S298N/Y300S, тяжелая цепь	EVQLLQSGGGLVQPGGSRLSLRCAASGYKFTSYV MHWVRQAPCKGLEWVGYINPYNDVTKYNEKFK GRFTLSRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTA VYCCAR GSYYDYDGFVYWGQGTLTVSSA STKGP SVFPL APSSKSTSGGTAA ALGCLVKD YFPEPVTVWSNG ALTSGVHTFFAVLQSSGLYLS S VVT VSSLG TQ TVICNVNHHKPSNTKVDKKV EPKSCD KHTCPCP AP ELLGGPSVFLFPPPKD TLMISRTPEVTCV VD VS HEDPEVKEFNVVYDGVVEVHNAKT K PREEQY N NSRVS VLT VHLQDWLNGKEYKCKVSNKALP ARIEKTISKA KGQPREPVY TLLPSRDELTKNQVS LCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTT PPYL DSDG SFFLYSKLTV DKS RWQQGVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK*

Мутантные конструкции, конструкции дикого типа и две агликозилированные контрольные конструкции (HEBE1 Agly IgG4 и HEBE1 Δab IgG1 в pCEP4)

- 15 трансфицировали в клетки HEK293-EBNA в трех повторах флаконов для экспрессии. Белки очищали из 160 мл кондиционированной среды (CM) с помощью колонок 1 мл HiTrap с белком A (GE) с использованием многоканального перистальтического насоса. Пять микрограмм каждого полученного супернатанта анализировали в 4-20% восстановливающих с Трис-глицином и невосстановливающих гелях для SDS-PAGE
- 20 (см. фигуру 2). Тяжелые цепи агликозилированных мутантов (N297Q, T299A и контроли Agly), мигрировали дальше (конец стрелки), в соответствии с потерей гликанов в этих антителах. Однако, тяжелые цепи сконструированных гликозилированных антител (NSY, STY, SY, Δab и контроля wt, стрелки), мигрировали сходным образом с контролем дикого типа. Этот результат согласуется с существованием сконструированного участка
- 25 гликозилирования в положении EU 298. Анализ SEC-HPLC показал, что все мутанты экспрессированы в форме мономеров.

3B. Анализ гликозилирования посредством LC-MS

- Сконструированные варианты Fc H66 IgG1 были частично восстановлены с помощью 20 mM DTT при 37°C в течение 30 мин. Затем образцы анализировали посредством 30 капиллярной LC/MS в системе для капиллярной HPLC Agilent 1100 с присоединенной гибридной системой QSTAR qq TOF (Applied Biosystems). Байесовскую реконструкцию белка с фоновой коррекцией и компьютерным моделированием на Analyst QS 1.1 (Applied Biosystem) использовали для анализа данных. В мутанте S298N/T299A/Y300S антитела H66, один участок гликозилирования наблюдали на аминокислоте 298, где двухантенные 35 и трехантенные гликаны комплексного типа детектированы как главные виды наряду с G0F, G1F и G2F (см. фигуру 34). Этот измененный профиль гликозилирования согласуется со сдвинутым гликозилированием на N298 вместо участка гликозилирования дикого типа на N297.

3C. Свойства связывания мутантов антитела $\alpha\beta$ TCR с Fc γ RIIIa и Fc γ RI человека с использованием Biacore

- Biacore использовали для оценки связывания рекомбинантного Fc γ RIIIa (V158 и F158) и Fc γ RI человека. Во всех четырех проточных ячейках на чипе CM5 иммобилизовали антитело анти-HPC4 посредством общепринятого способа связывания амина, предоставленного Biacore. Антитело анти-HPC4 разводили до 50 мкг/мл в 10 mM ацетате 45 натрия, pH 5,0, для реакции связывания и инъецировали в течение 25 мин при 5 мкл/мин. Приблизительно 12000 RU антитела иммобилизовали на поверхности чипа. Рекомбинантные Fc γ RIIIa-V158 и Fc γ RIIIa-F158 человека разводили до 0,6 мкг/мл в буфере для связывания (HBS-P с 1 mM CaCl₂) и инъецировали в проточные ячейки 2 и

4, соответственно, в течение 3 мин при 5 мкл/мин для связывания 300-400 RU рецептора на чипе анти-HPC4. Для установления различий между веществами с низким связыванием, в три раза больше rhFc γ RI α связывали на поверхности анти-HPC4, чем обычно использовали в этом анализе. Проточные ячейки 1 и 3 использовали в качестве 5 эталонных контролей. Каждое антитело разводили до 200 нМ в буфере для связывания и инъецировали поверх всех четырех проточных ячеек в течение 4 мин, с последующими 5 мин диссоциации в буфере. Поверхности регенерировали с помощью 10 мМ ЭДТА в буфере HBS-EP в течение 3 мин при 20 мкл/мин. Результаты этих экспериментов показаны на фигуре 3.

10 Biacore также использовали для сравнения связывания Fc γ RI. Антитело анти-тетра-His подвергали замене буфера в 10 мМ ацетате натрия pH 4,0, с использованием обессоливающей колонки Zeba и разводили до 25 мкг/мл в ацетатном буфере для связывания амина. В двух проточных ячейках чипа CM5 иммобилизовали ~9000 RU антитела анти-Тетра-His после 20 мин инъекции при 5 мкл/мин. Как в предыдущем 15 эксперименте, в десять раз больше Fc γ RI связывали на поверхности с анти-тетра-His для сравнения образцов со слабым связыванием. Рекомбинантный Fc γ RI человека разводили до 10 мкг/мл в буфере для связывания HBS-EP и инъецировали в проточную ячейку 2 в течение 1 мин при 5 мкл/мин для связывания ~1000 RU рецептора с чипом анти-тетра-His. Одну концентрацию антитела, 100 нМ, инъецировали в течение 3 мин 20 при 30 мкл/мин поверх связанного рецептора и контрольной поверхности. Затем диссоциацию мониторировали в течение трех минут. Затем поверхность регенерировали с помощью 30-секундных инъекций 10 мМ глицина pH 2,5 при 20 мкл/мин. Результаты этих экспериментов показаны на фигуре 4.

Эти результаты показывают явное увеличение связывания мутантов с 25 модифицированным гликозилированием с Fc γ RI α или Fc γ RI. H66 S298N/T299A/Y300S, в частности, обладает почти полностью уничтоженным связыванием с обоими рецепторами. Этот мутант выбрали для более подробного анализа.

3D. Характеризация стабильности с использованием кругового дихроизма (CD)

Стабильность мутантного антитела S298N/T299A/Y300S мониторировали посредством 30 эксперимента термоплавления Far-UV CD, в котором сигнал CD при 216 нм и 222 нм мониторировали при увеличенной температуре, приводящей к разворачиванию антитела (денатурации).

Температуру контролировали посредством термоэлектрического элемента Пельтье (Jasco модели AWC100) и увеличивали со скоростью 1°C/мин от 25-89°C. Спектры CD 35 собирали на спектрофотометре Jasco 815 при концентрации белка приблизительно 0,5 мг/мл в буфере PBS в кварцевой кюветы (Hellma, Inc) с длиной пути 10 мм. Скорость сканирования составляла 50 нм/мин, и шаг данных 0,5 нм. Использовали ширину полосы 2,5 нм с установкой чувствительности на среднюю. Сигнал CD и вольтаж НТ собирали при 210-260 нм с интервалами данных 0,5 нм и интервалами температуры 1°C, и четыре 40 повтора сканирований проводили для каждого образца. Результаты показывают, что как дельта АВ H66, так и мутант S298N/T299A/Y300S H66 обладают сходным термическим поведением и обладают приблизительно одинаковой начальной температурой для деградации (приблизительно 63°C) (фигура 35), что позволяет далее предполагать, что они обладают сравнимой стабильностью.

45 Пример 4: Функциональный анализ Fc-модифицированных мутантов

Fc-модифицированные мутанты оценивали посредством анализа пролиферации РВМС и анализа высвобождения цитокинов. В анализе пролиферации РВМС, РВМС человека культивировали с увеличивающимися концентрациями терапевтического

антитела в течение 72 часов, добавляли 3 H-тимидин, и клетки собирали через 18 часов. Для анализа истощения Т-клеток/высвобождения цитокинов, PBMC человека культивировали с увеличивающимися концентрациями терапевтического антитела и анализировали ежесуточно количества и жизнеспособность клеток (Vi-Cell, Beckman Coulter) до суток 7. Супернатанты клеток также собирали, хранили при -20°C и анализировали на 8-плексную панель цитокинов (Bio-Rad).

PBMC нормального донора размораживали и обрабатывали в следующих условиях (все в среде, содержащей комплемент): без обработки; BMA031, moIgG2b 10 мкг/мл; OKT3, moIgG2a 10 мкг/мл; H66, huIgG1 дельтаAB 10 мкг/мл, 1 мкг/мл и 0,1 мкг/мл; H66, huIgG1 S298N/T299A/Y300S 10 мкг/мл, 1 мкг/мл и 0,1 мкг/мл.

Цитокины собирали на сутки 2 (D2) и сутки 4 (D4) для анализа Bioplex (IL2, IL4, IL6, IL8, IL10, GM-CSF, IFNg, TNFa). Клетки окрашивали на D4 по экспрессии CD4, CD8, CD25 и abTCR.

Результаты, показанные на фигурах 5-8, показывают, что поведение H66 S298N/T299A/Y300S было сходным с поведением H66 дельтаAB во всех проведенных анализах на основе клеток, показывая минимальную активацию Т-клеток по экспрессии CD25, связывание с abTCR (с немного различной кинетикой для дельтаAB), и минимальное высвобождение цитокинов в обоих временных точках D2 и D4. У мутанта S298N/T299A/Y300S, таким образом, уничтожали эффекторную функцию так эффективно, как мутация дельтаAB.

Пример 5: Получение и характеристизация сконструированного варианта Fc в остеове антитела анти-CD52.

В дополнение к антителу H66 анти- $\alpha\beta$ TCR, мутацию S298N/Y300S также сконструировали в остеове антитела анти-CD52 (клон 2C3). Затем этот мутант исследовали, чтобы определить, являлась ли обнаруженная модуляция эффекторной функции, наблюдавшаяся в антителе S298N/Y300S H66 анти- α TCR, согласованной в остеове другого антитела.

5A. Получение вариантов антитела 2C3 анти-CD52 с измененным гликозилированием

Сначала вариант ДНК 2C3 S298N/Y300S получали посредством мутагенеза с быстрым изменением с использованием pENTR_LIC_IgG1, и VH 2C3 WT клонировали в мутантный вектор посредством LIC. Полноразмерные мутанты клонировали в экспрессирующий вектор pCEP4 (-E+I)Dest с использованием способа Gateway. Мутации затем подтверждали посредством секвенирования ДНК, и последовательности указаны в таблице 11. Затем мутанты трансфицировали в клетки HEK293-EBNA в формате 6-луночного планшета, и белок очищали из кондиционированной среды. Антитело анти-CD52 2C3 дикого типа получали параллельно в качестве контроля. Обнаружили, что уровень экспрессии составляет 0,1 мкг/мл с использованием анализов SD-PAGE и Вестерн-блоттинга (фигура 9A). Экспрессию мутантов в чистых кондиционированных средах также измеряли по связыванию с белком A на Biacore. Концентрацию определяли с использованием ответа диссоциации после шести минут инъекции на иммобилизованный белок A. Продуцированное в CHO 2C3 WT, серийно разведенное в среде от 90 мкг/мл до 1,5 нг/мл, использовали в качестве стандартной кривой. Концентрации рассчитывали около приблизительно 0,2 мкг/мл посредством калибровочной кривой с использованием 4-параметрического соответствия. Относительные уровни экспрессии являлись низкими и в основном соответствовали данным Вестерн-блоттинга (фигура 9B).

Таблица 11

Последовательности антитела анти-CD52 клона 2C3

5

10

15

SEQ ID NO	Наименование	Аминокислотная последовательность
28	Анти-CD-52 2C3 WT, легкая цепь	DIVMTQTPLNLSTPTGPQPAISICKSSQSLLYSNGKTYL NWLLQKPGQSPORLIVLVSKLDSGVPRDRSGSGCTD FTLKRISVVAEADVGVYVCVQGTHLHTFGQGTRLEIKR TVAAPSVHPPPSDEQLKSQGTASVCLNNNFYPREAK VQWQVVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYTSLSLSTL SKADYEKHKVYACEVTTIQGLSPVTKSPNPGEC*
29	Анти-CD-52 2C3 WT, тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTVWMN WVRRQAPGKGLEWVQGIRLKSNNYATHYAESVKGRF TISRDRDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCIPVDFWQGQ GTTVTVSSASTKGPSPVPLAPSKSTSGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTPAVLQSGLYLSLS SVVTPVSSSLGTQTYICNVNIIKPSNTKVDKVEPKSC DKTHTPPPCPAPELLGGPSVFLPPPKKDTLMSRTP VTCVVVDVSHEDPEVKENWVYDGVVEVHNATKPRE EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPEKTIKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNQCPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK*
30	Анти-CD-52 2C3 S298N/Y300S, тяжелая цепь	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTVWMN WVRRQAPGKGLEWVQGIRLKSNNYATHYAESVKGRF TISRDRDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCIPVDFWQGQ GTTVTVSSASTKGPSPVPLAPSKSTSGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTPAVLQSGLYLSLS SVVTPVSSSLGTQTYICNVNIIKPSNTKVDKVEPKSC DKTHTPPPCPAPELLGGPSVFLPPPKKDTLMSRTP VTCVVVDVSHEDPEVKENWVYDGVVEVHNATKPRE EQYNELISKRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPEKTIKAKGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNQCPENNYKTTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK*

5B. Анализ гликозилирования с использованием PNGaseF

Для оценки дополнительных участков гликозилирования, введенных посредством мутации, обогащенный мутант S298N/Y300S дегликозилировали с помощью PNGase F.

Не показано какого-либо кажущегося изменения молекулярной массы, что не присутствовало дополнительного углевода (фигура 10). Проводили выделения в малом масштабе для очистки этих мутантов для дальнейшей характеристизации, и результаты повторно подтвердили, что не существовало дополнительного углевода, присутствующего на мутанте S298N/Y300S (фигура 11).

5C. Свойства связывания мутантов антитела анти-CD52 2C3 с Fc γ RIIIa человека с использованием Biacore

Biacore использовали также характеристизации связывания антигена, Fc γ RIII и свойств связывания очищенных антител (см. фигуры 12, 13 и 14). Вариант S298N/Y300S 2C3 прочно связывался с пептидом CD52, и сенсограмма связывания являлась неотличимой от контроля дикого типа, показывая, что эта мутация не влияет на его связывание антигена (фигура 12A).

Для анализа эффекторной функции Fc, рецептор Fc γ RIII (Val158) использовали в исследованиях связывания. Мутантное антитело и контрольное антитело дикого типа разводили до 200 нМ и инъецировали на связанный с HPC4-tag Fc γ RIIIa. Связывание Fc γ RIII являлось почти не поддающимся детекции для мутанта S298N/Y300S, что указывает на потерю эффекторной функции этим вариантом (фигура 12B и фигура 14A). Для дальнейшего анализа эффекторной функции Fc, рецептор Fc γ RIII (Phe158) также использовали в исследованиях. Мутантное антитело и контрольное антитело дикого типа разводили до 200 нМ и инъецировали на связанный с HPC4-tag Fc γ RIIIa. Связывание Fc γ RIII являлось почти не поддающимся детекции для мутанта S298N/Y300S, что указывает на потерю эффекторной функции вариантом Phe158 (фигура 14B). Наконец, Biacore использовали для сравнения свойств связывания с FcRn очищенных белков. Мышиный и очищенный SEC FcRn-HPC4 человека иммобилизовали на чипе CM5 посредством присоединения амина. Каждое антитело разводили до 200, 50 и 10 нМ, и инъецировали поверх рецепторов. Кампрат, продуцированное в CHO 2C3 WT и обработанный DEPC кампрат включали в качестве положительного и отрицательного контроля. Эти данные показывают, что мутант связывается с рецептором FcRn как человека, так и мыши, с такой же аффинностью, как контрольное антитело дикого типа, и что вероятно не присутствует изменений времени полужизни в кровотоке или

других фармакокинетических свойств. (см. фигуру 12C, фигуру 13). Соответственно, мутация S298N/Y300S является применимой для антител в общем, для уменьшения или уничтожения нежелательной эффекторной функции Fc, например, посредством вовлечения рецепторов Fcγ человека.

5 Пример 6: Детекция циркулирующего иммунного комплекса для мутанта S298N/Y300S.

Детекцию циркулирующего иммунного комплекса также исследовали с использованием анализа связывания C1q для мутанта S298N/Y300S и контроля WT. 96-луночные планшеты Costar с высоким связыванием покрывали в течение ночи при 4°C 10 100 мкл 2C3 Ab в 2-кратном серийном разведении в концентрациях, лежащих в диапазоне 10-0,001 мкг/мл в буфере для покрытия (0,1M NaCHO₃ pH 9,2). Анализ ELISA показал, что связывание C1q уменьшено для мутанта S298N/Y300S по сравнению с WT (фигура 15A). Связывание анти-Fab Ab с покрытием 2C3 Ab подтвердило эквивалентное покрытие лунок (фигура 15B).

15 Пример 7: Разделение и анализ мутанта S298N/Y300S с использованием изоэлектрического фокусирования.

Изоэлектрическое фокусирование (IEF) в геле pH 3-10 проводили для характеристизации мутантов S298N/Y300S. Обнаружено, что S298/Y300S обладает более отрицательными зарядами, и таким образом, вероятно, большим количеством молекул сиаловой кислоты 20 (фигура 18A). По интактной MS показано, что как мутант S298N/Y300S, так и WT 2C3 обладают G0F и G1F в качестве доминантных видов гликозилирования (фигура 18B и D, соответственно).

Пример 8: Аффинность связывания антигена S298N/Y300S.

Biacore использовали для сравнения аффинности связывания антигена для анти-CD52 25 Ab 2C3 WT и мутанта S298N/Y300S, которые получали и очищали после экспрессии как в более малом (фигура 16), так и более крупном масштабе (фигура 17). Получали чипы CM5 с иммобилизованным пептидом 741 CD52 и контрольным пептидом 777. Получали серийные 2-кратные разведения антитела от 60 до 0,2 нМ в HBS-EP и затем инъецировали поверх поверхности чипа в течение 3 мин с последующей 5 мин 30 диссоциацией в буфере при скорости потока 50 мкл/мин. Затем поверхность регенерировали с помощью импульса 40 мМ HCl. Эти анализы проводили в двух повторах и показали, что мутант S298N/Y300S и WT антитела 2C3 обладают сравнимым связыванием пептида CD52.

35 Разработали платформу для скрининга среды для тестирования функциональных свойств связывания перед очисткой, чтобы проводить скрининг антител, полученных в ходе трансфекций в малом масштабе. Эти тесты проводили с использованием Octet (фигура 19A) для определения концентрации и использовали биосенсоры с белком A и стандартную кривую GLD52. Образцы разводили до 7,5 и 2 нМ в HBS-Ep для сравнения связывания CD52 с использованием Biacore (фигура 19B). Результаты анализы связывания 40 пептида показали, что как мутант S298N/Y300S, так и WT антитела 2C3 обладают сравнимым связыванием пептида CD52. Более того, эти анализы показали, что Octet и Biacore хорошо действуют для предсказания связывания антигена антителами из трансфекций малого масштаба.

45 Пример 9: Получение мутантов S298N/Y300S, S298N/T299A/Y300S и N297Q/S298N/Y300S с измененным гликозилированием в оставах дополнительных антител.

В дополнение к антителу анти-αβ-TCR и антителу анти-CD-52 2C3, мутации S298/Y300S, S298N/T299A/Y300S и N297Q/S298N/Y300S конструировали в оставах других антител для подтверждения того, что дополнительный tandemный участок

гликозилирования можно вводить в неродственные последовательности вариабельного домена тяжелой цепи. Мутанты анти-CD-52 12G6 и анти-Her2 с альтернативным гликозилированием указаны в таблицах 12 и 13.

Таблица 12

Последовательности антитела анти-CD52 клона 12G6

SEQ ID NO	Наименование	Аминокислотная последовательность
31	Анти-CD-52 12G6 WT, легкая цепь	DIWMTQPLSLSVPPQFASQKSNQSLIYNSOKTYL WVQAPKGKLEWVQQRKLSRNLNNYATHYAEVKGRFTIS RDDSKNSLYLQMSNLKTEIDTAVVYCTPDIWQCGGT VIVSSASTKGPSPVFLAPPSKSTSCTGAAALCLVKDVF PEPVTVSWNSGALTSGVHTTPAVLQSSGLYLSLSVV VPSSSLCTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPCCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMSRTPETVCVV DVSHIEDPEVKFNWYVYDGVEVINAKTKPREEQVNN DEEVSVLTFLIJDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKCQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAWEWSNGQPEENNYKTTPPVLDSDGSFLYSLKL TVDKSRWQQGNVFSCSVHMH41LNHYTQKSLSLSPG K*
32	Анти-CD-52 12G6 WT, тяжелая цепь	EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGPPFSNYWMNW VRQAPKGKLEWVQQRKLSRNLNNYATHYAEVKGRFTIS RDDSKNSLYLQMSNLKTEIDTAVVYCTPDIWQCGGT VIVSSASTKGPSPVFLAPPSKSTSCTGAAALCLVKDVF PEPVTVSWNSGALTSGVHTTPAVLQSSGLYLSLSVV VPSSSLCTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPCCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMSRTPETVCVV DVSHIEDPEVKFNWYVYDGVEVINAKTKPREEQVNN DEEVSVLTFLIJDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKCQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAWEWSNGQPEENNYKTTPPVLDSDGSFLYSLKL TVDKSRWQQGNVFSCSVHMH41LNHYTQKSLSLSPG K*
33	Анти-CD-52 12G6 S298N/Y300S, тяжелая цепь	EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGPPFSNYWMNW VRQAPKGKLEWVQQRKLSRNLNNYATHYAEVKGRFTIS RDDSKNSLYLQMSNLKTEIDTAVVYCTPDIWQCGGT VIVSSASTKGPSPVFLAPPSKSTSCTGAAALCLVKDVF PEPVTVSWNSGALTSGVHTTPAVLQSSGLYLSLSVV VPSSSLCTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPCCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMSRTPETVCVV DVSHIEDPEVKFNWYVYDGVEVINAKTKPREEQVNN DEEVSVLTFLIJDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKCQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAWEWSNGQPEENNYKTTPPVLDSDGSFLYSLKL TVDKSRWQQGNVFSCSVHMH41LNHYTQKSLSLSPG K*
34	Анти-CD-52 12G6 S298N/T299A/Y300S, тяжелая цепь	EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGPPFSNYWMNW VRQAPKGKLEWVQQRKLSRNLNNYATHYAEVKGRFTIS RDDSKNSLYLQMSNLKTEIDTAVVYCTPDIWQCGGT VIVSSASTKGPSPVFLAPPSKSTSCTGAAALCLVKDVF PEPVTVSWNSGALTSGVHTTPAVLQSSGLYLSLSVV VPSSSLCTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPCCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMSRTPETVCVV DVSHIEDPEVKFNWYVYDGVEVINAKTKPREEQVNN DEEVSVLTFLIJDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKCQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAWEWSNGQPEENNYKTTPPVLDSDGSFLYSLKL TVDKSRWQQGNVFSCSVHMH41LNHYTQKSLSLSPG K*
35	Анти-CD-52 12G6 N297Q/S298N/Y300S, тяжелая цепь	EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGPPFSNYWMNW VRQAPKGKLEWVQQRKLSRNLNNYATHYAEVKGRFTIS RDDSKNSLYLQMSNLKTEIDTAVVYCTPDIWQCGGT VIVSSASTKGPSPVFLAPPSKSTSCTGAAALCLVKDVF PEPVTVSWNSGALTSGVHTTPAVLQSSGLYLSLSVV VPSSSLCTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPCCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMSRTPETVCVV DVSHIEDPEVKFNWYVYDGVEVINAKTKPREEQVNN DEEVSVLTFLIJDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKCQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAWEWSNGQPEENNYKTTPPVLDSDGSFLYSLKL TVDKSRWQQGNVFSCSVHMH41LNHYTQKSLSLSPG K*

Таблица 13

Последовательности антитела анти-Her2

SEQ ID NO	Наименование	Аминокислотная последовательность
36	Анти-Her2 WT, легкая цепь	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQ QKPGKAPKLLIYSASFASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFLTIS SLQPEDHATYYCQQHYYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAP SVIIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKV DNAHQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRNRGEC*
37	Анти-Her2 WT, тяжелая цепь	EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFNKIDTYIHWV RQAPKGKLEWVQQRKLSRNLNNYATHYAEVKGRFTISADT SKNTAYLQMSNLRAEDTAVYVYCSRWWGDDGPFYAMDY WGQGTLTVTSSASTKGPSPVFLAPPSKSTSCTGAAALG CLVKDVFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTPAVLQSSGLY SLSVTVPSLGLTQYCNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPCCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMSRTPETVCVV DVSHIEDPEVKFNWYVYDGVEVINAKTKPREEQVNN DEEVSVLTFLIJDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKCQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAWEWSNGQPEENNYKTTPPVLDSDGSFLYSLKL TVDKSRWQQGNVFSCSVHMH41LNHYTQKSLSLSPG K*
38	Анти-Her2 S298N/T299A/ Y300S, тяжелая цепь	EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFNKIDTYIHWV RQAPKGKLEWVQQRKLSRNLNNYATHYAEVKGRFTISADT SKNTAYLQMSNLRAEDTAVYVYCSRWWGDDGPFYAMDY WGQGTLTVTSSASTKGPSPVFLAPPSKSTSCTGAAALG CLVKDVFPEPVTVSWNSGALTSGVHTTPAVLQSSGLY SLSVTVPSLGLTQYCNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH TCPCCPAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMSRTPETVCVV DVSHIEDPEVKFNWYVYDGVEVINAKTKPREEQVNN DEEVSVLTFLIJDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKCQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAWEWSNGQPEENNYKTTPPVLDSDGSFLYSLKL TVDKSRWQQGNVFSCSVHMH41LNHYTQKSLSLSPG*

Пример 10. Получение измененных антител, содержащих реакционноспособные

группы гликана

Для получения антител, содержащих группы гликана, способные вступать в реакцию с дериватизированными эффекторными группами, антитело анти-HER сначала гликозилировали *in vitro* с использованием гликозилтрансферазы и соответствующих доноров UDP-сахара. Например, для введения сиаловой кислоты, донорные антитела сначала галактозилировали с помощью β -галактозилтрансферазы, с последующим сиалированием с помощью α 2,6-сиалилтрансферазы в соответствии со способами Kaneko et al. (Kaneko, Y., Nimmerjahn, F., and Ravetch, J. V. (2006) Antiinflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. *Science* 313, 670-3). Реакцию проводили на стадии синтеза в одном реакторе с использованием β -галактозилтрансферазы (50 мЕд./мг, Sigma) и α 2,6-сиалилтрансферазы (5 мкг/мг, R&D system) с субстратами - донорами сахарных нуклеотидов, UDP-галактозы (10 мМ) и CMP-сиаловой кислоты (10 мМ) в буфере 50 мМ MES (рН 6,5), содержащем 5 мМ MnCl₂. Реакционную смесь, содержащую 5 мг/мл антитела анти-HER2, инкубировали в течение 48 часов при 37°C. Сиалирование верифицировали с использованием анализа MALDI-TOF MS перметилированных гликанов, высвобожденных из антитела с помощью PNGase F, анализа содержания сиаловой кислоты с использованием Dionex HPLC и blotting с лектином SNA, лектином, специфическим для α 2,6-сиаловой кислоты.

Анализ MALDI-TOF гликанов, высвобожденных посредством обработки PNGase F сиалированного антитела анти-HER2, показал, что нативные гликаны были полностью ремоделированы с в основном моносиалированной двухантенной структурой, A1F (фигура 27A) вместе с небольшим количеством дисиалированных видов. Обработкой антитела более высокими количествами α 2,6-сиалилтрансферазы получали более гомогенные популяции гликоформы A1F, что позволяет предполагать, что либо активность фермента, либо локализация гликана может предотвращать полное сиалирование. Определили, что содержание сиаловой кислоты составляло ~2 моль на моль антитела, что согласуется с гликаном A1F в качестве главных видов гликоформ (фигура 27B). Пектиновый blotting с лектином SAN, агглютинином *Sambucus nigra*, специфическим для α 2,6-связанной сиаловой кислоты, подтвердил, что сиаловая кислота присутствует в конфигурации с α 2,6-связью (фигура 27C).

В заключение, хотя гликаны природного белка являются несколько гетерогенными, ремоделирование посредством галактозил- и сиалилтрансфераз приводит к почти гомогенному антителу с моносиалированными, но полностью галактозилированными двухантенными гликанами (A1F). Введение только ~1 сиаловой кислоты на два галактозных акцептора на каждом разветвленном гликане может быть обусловлено ограниченной доступностью одной из галактоз из гликанов, которые часто углублены в антитело, или нековалентными взаимодействиями гликанов с поверхностью белка.

Пример 11. Окисление измененных антител, содержащих реакционноспособные группы гликанов

После верификации сиалирования, исследовали окисление в ходе процесса сиалированного антитела анти-HER2 с помощью различных концентраций периода (0,25-2 мМ). Сиалированное антитело сначала подвергали замене буфера в 25 мМ Tris-HCl (рН 7,5), содержащем 5 мМ ЭДТА, с последующей заменой буфера с помощью буфера PBS. Затем забуференную смесь антител наносили колонку с сефарозой с белком A, предварительно уравновешенной с помощью буфера PBS. После промывки колонки 15 объемами колонки PBS, 15 объемами колонки PBS, содержащим 5 мМ ЭДТА, и 30 объемами колонки PBS, затем проводили элюцию 25 мМ цитратно-фосфатным буфером (рН 2,9). Элюаты немедленно нейтрализовали с помощью двухосновного фосфатного

буфера, и антитело концентрировали с использованием Amicon ultra из Millipore. После очистки сиалированное антитело анти-HER2 затем окисляли с помощью периодата натрия (Sigma) в буфере 100 мМ ацетате натрия (рН 5,6) на льду в темноте в течение 30 минут, и реакцию останавливали с помощью 3% глицерина на льду в течение 15 минут.

- 5 Продукт подвергали обессоливанию и смене буфера на 100 мМ ацетат натрия (рН 5,6) посредством 5 циклов ультрафильтрации через 50 кДа Amicons. На фигуре 28A показан анализ содержания сиаловой кислоты сиалированного антитела, титрованной с различными количествами периодата. Полного окисления остатков сиаловой кислоты достигали при концентрации периодата выше 0,5 мМ. Действительно, концентрация 10 периодата, настолько низкая, как 0,5 мМ, являлась достаточной для полного окисления введенной сиаловой кислоты. Соответственно, концентрацию периодата 1 мМ выбрали для окисления сиалированного антитела для конъюгации лекарственного средства.

Окисление может оказывать неблагоприятные эффекты на целостность антитела.

- Для окисления остатков метионина, включая Met-252 и Met-428, локализованные в 15 области CH3 Fc, близко к участкам связывания FcRn, известно влияние на связывание FcRn, которое является критическим для продления времени полужизни антитела в сыворотке (Wang, W., et al. (2011) Impact of methionine oxidation in human IgG1 Fc on serum half-life of monoclonal antibodies. Mol Immunol 48, 860-6). Соответственно, для оценки 20 потенциальных побочных эффектов окисления периодатом на остатки метионина (например, Met-252), критические для взаимодействия с FcRn, состояние окисления сиалированного антитела определяли по анализу LC/MS расщепления пептидов трипсином. Этот анализ выявил ~30% окисление Met-252 и <10% окисление Met-428 после обработки сиалированного трастузумаба 1 мМ периодатом. Для определения 25 вклада этой степени окисления метионина в связывание FcRn, кинетику связывания FcRn для каждого антитела оценивали с использованием поверхностного плазмонного резонанса (BIACORE). Этот анализ выявил, что состояние окисления коррелировало 30 с незначительной потерей связывания FcRn (12% и 26% уменьшение Ka для FcRn мыши и человека, см. фигуры 28B и 28C, соответственно). Фигура 28D представляет собой график, демонстрирующий FcRn-связывание окисленного сиалированного герцептина 35 для человеческого и мышного FcRn в виде процента от контрольного измерения. Следует отметить, что опубликовано, что ~25% уменьшение Ka для FcRn человека не оказывает эффект на время полужизни в сыворотке в трансгенной мыши с FcRn человека, поскольку отдельный интактный участок FcRn на каждом антителе является 40 достаточным для обеспечения функциональности и преимуществ PK (Wang et al., там же).

- В общем, эти данные показывают, что введение чувствительных к периодату остатков сиаловой кислоты посредством обработки сиалилтрансферазой позволяет использование намного более низких концентраций периодата, приводя к минимальным побочным 45 эффектам на взаимодействия антитело-FcRn и целостность антитела, как оценивали по агрегации ($\leq 1\%$). Таким образом, использование сиалированных антител в соответствии со способами по изобретению обеспечивает более широкое окно условий окисления, позволяющее воспроизводимое получение активных гликоконъюгатов без эффекта на время полужизни в сыворотке.

Пример 12. Синтез реакционноспособных эффекторных групп

- Для облегчения конъюгации с дериватизированных альдегидом гликоформ антитела 45 по изобретению, эффекторные группы лекарственных средств-кандидатов (например, монометилауристатин Е (MMAE) и доластатин 10 (Dol10)) дериватизировали с помощью аминооксицистамида, чтобы они содержали функциональные группы (например,

аминоокси-цис) со специфической реакционной способностью для альдегида.

Кратко, для получения аминооксицистамида в качестве исходного материала, S-5 тритил-L-цистеинамид (362 мг, 1 ммоль) добавляли к 3 мл раствора в DMF N-гидроксисукцинимидного сложного эфира т-BOC-аминооксикусной кислоты (289 мг, 1 ммоль). Реакция завершалась через 3 час, как очевидно из анализа HPLC. Затем 10 реакционную смесь разводили с помощью 30 мл дихлорметанэтана и промывали раствором 0,1 М бикарбоната натрия (2×20 мл), водой (2×20 мл), и рассолом (2×20 мл). Раствор сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали до сухости. К этому высушенному осадку добавляли 3 мл TFA с последующими 150 мкл триэтилсилана. Полученный раствор преципитировали из т-бутилметилового эфира, и процесс повторяли три раза. После фильтрации осадок сушили под пониженным давлением с получением 205 мг грязно-белого твердого вещества (выход 67%). Соединение использовали для следующей стадии без дополнительной очистки.

Для получения аминоокси-дериватизированного MMAE (аминоокси-Cys-MC-VC-

15 PABC-MMAE), 30,1 мг аминооксицистамида (0,098 ммоль, 2 экв.) объединяли с 64,6 мг MC-VC-PABC-MMAE (0,049 ммоль) и 100 мкл триэтиламина в 3 мл DMF. Полученную реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 15 минут, 20 времени, за которое реакция завершалась согласно анализу HPLC. Соединение очищали препаративной HPLC с получением 45 мг (62%) желательного продукта в форме грязно-белого твердого вещества. Анализ обращенофазовой HPLC позволял предполагать, что чистота соединения составляет >96%. ESI, рассчитано для C73H116N14O18S (MH)⁺ 1509,8501; обнаружено, m/z 1509,8469.

Для получения аминоокси-дериватизированного Dol10 (аминоокси-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10), 7,4 мг (0,024 ммоль, 3 экв.) аминооксицистамида, 12 мг (0,008 ммоль)

25 MC-VC-PABC-PEG8-Dol10 и 30 мкл триэтиламина объединяли в 3 мл DMF. Реакция завершалась в течение 15 минут согласно анализу HPLC. Очисткой препаративной HPLC получили 6,2 мг (46%) желательного продукта в форме грязно-белого твердого вещества. Анализ обращенофазовой HPLC позволяет предполагать, что чистота соединения составляет >96%. ESI, рассчитано для C80H124N16O19S2 (MH)⁺ 1678,0664; 30 обнаружено, m/z 1678,0613.

Пример 13. Опосредованная сиаловой кислотой (SAM) конъюгация реакционноспособных эффекторных групп

После обессоливания, лекарственные средства-линкеры из примера 11 объединяли с окисленными, сиалированными антителами из примера 10 в 75% DMSO при

35 концентрации 25 мМ для достижения молярного соотношения лекарственного средства-линкера с антителом 24:1 и конечной концентрации антитела 5 мг/мл. Смесь инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. Невключенные лекарственные средства-линкеры и любые свободные лекарственные средства выводили с использованием BioBeads. Продукт подвергали замене буфера в гистидиновом-Твин 40 буфере с использованием колонок PD-10 и стерилизовали фильтрацией. Определяли уровни эндотоксинов, и менее 0,1 ЕЭ/мг ADC достигали для исследования *in vivo*.

На фигуре 29А-С показана хроматография гидрофобного взаимодействия (HIC) различных сиалированных антител (анти-FAP B11 и G11, и антитело анти-HER2 из примера 11), гликоконъюгированных с AO-MMAE. Сиалированное антитело против

45 HER2 также конъюгировали с лекарственным средством-линкером, AO-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10 (фигура 29D). Этот анализ выявил, что присутствовали в основном один или два конъюгата лекарственных средства на антитело с соотношением лекарственного средства к антителу (DAR) в диапазоне 1,3-1,9. Увеличенное время

удержания гликоконъюгата Dol10 (фигура 29D) по сравнению с гликоконъюгатом MMAE (фигура 29C), по-видимому, обусловлено большей гидрофобностью Dol10.

Анализ LC-MS проводили также с антителом анти-HER, конъюгированным с двумя различными лекарственными средствами-линкерами (AO-MMAE или AO-PEG8-Dol10) в масштабе 30 мг. Этот анализ показал сходные значения DAR 1,7 и 1,5 после конъюгации, что является сравнимым с анализом НС. Эксклюзационная хроматография (SEC) показала очень низкие уровни (1%) агрегатов в этих конъюгатах.

В дополнение к природным (дикого типа) сиалированным антителам, исследовали также гликоконъюгацию эффекторных групп с сиалированными антителами, содержащими неприродный (сконструированный) гликан, N-связанный со сконструированными участками гликозилирования. На фигуре 30В показана хроматография НС сиалированного антитела, успешно конъюгированного с аминооксидериватизированным токсином MMAE (АО-ММАЕ; фигура 30А) через сконструированный гликан, присутствующий на сконструированном участке гликозилирования A114N. Приблизительно 60% сиалированного антитела являлось успешно гликоконъюгированным с цитотоксином MMAE. Соответственно, этот анализ подтвердил, что способы гликоконъюгации по изобретению можно применять как к гликанам дикого типа, так и сконструированным гликанам связывающего полипептида.

Пример 14. Анализы ADC пролиферации клеток *in vitro*

Активность *in vitro* молекул гликоконъюгата анти-HER и анти-FAP по изобретению сравнивали также с соответствующими тиоловыми конъюгатами, содержащими такую же группу лекарственного средства, связанную посредством тиоловых связей с цистеинами шарнирной области такого же донорного антитела. Тиоловые конъюгаты содержали приблизительно двойное количество лекарственного средства на антитело (DAR), чем гликоконъюгаты. Конъюгацию на основе тиола проводили, как описано в Stefano et al (Methods in Molecular Biology 2013, *in press*). Затем линии клеток Her2+SK-BR-3 и Her2-MDA-MB-231 использовали для оценки относительной эффективности каждого ADC. Результаты этого анализа представлены в таблице 15 ниже.

Таблица 15.

Сравнение EC₅₀ гликоконъюгатов и тиоловых конъюгатов

	DAR	EC ₅₀ (нг/мл)
Анти-HER-MC-VC-PABC-MMAE (Тиол-MMAE)	3,8*	2,3
AntiHER-AO-Cys-MC-VC-PABC-MMAE (Глико-MMAE)	1,7*	4,7
Анти-HER-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10 (Тиол-Dol10)	3,9*	0,45
Анти-HER-AO-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10 (Глико-Dol10)	1,5*	0,97
Анти-FAP B11-MC-VC-PABC-MMAE (Тиол-MMAE), CHO+FAP	3,3**	382,4
Анти-FAP B11-AO-Cys-MC-VC-PABC-MMAE (Глико-MMAE), CHO+FAP	1,5**	682,4

Примечание: * DAR, определенное по LC-MS; ** DAR, определенное по НС

На фигуре 31 показано сравнение активности *in vitro* гликоконъюгата анти-HER и соответствующего ему тиолового конъюгата. Жизнеспособность клеток определяли после 72 час воздействия конъюгатов на экспрессирующие антиген Her2 клетки (SK-BR-3) (фигура 31А и С) или не экспрессирующие антиген Her2 клетки (MDA-MB-231) (фигура 31В и D). ADC содержали либо MMAE, либо PEG8-Dol10, связанные с гликанами («глико») или, посредством общепринятых химических реакций, с остатками цистеина

шарнирной области («тиол»). Как показано на фигуре 30А и С, ~ в 2 раза более низкую EC₅₀ наблюдали для тиоловых конъюгатов по сравнению с гликоконъюгатами, что согласуется с в 2 раза более высоким DAR в первых, чем в последних. Не наблюдали токсичности для линии Her2-клеток с любым антителом вплоть до 100 мкг/мл.

Сходные тенденции наблюдали также при пролиферации клеток для ADC, полученных с антителами против антигена опухоли (FAP), который на высоком уровне экспрессируют реакционноспособные стромальные фибробласты в эпителиальных злокачественных опухолях, включая злокачественные опухоли ободочной кишки, поджелудочной железы и молочной железы (Teicher, B.A. (2009) Antibody-drug conjugate targets. Curr Cancer Drug Targets 9, 982-1004). Эти конъюгаты снова получали посредством конъюгации либо аминоокси-ММАЕ-лекарственного средства-линкера, либо малеимидо-ММАЕ лекарственного средства-линкера с гликанами или тиоловой группой. Анализы пролиферации клеток для этих конъюгатов показали, что EC₅₀ тиолового конъюгата обладала в ~100 раз более высокой активностью на клетках СНО, трансфицированных FAP человека, чем на таких же клетках, лишенных экспрессии FAP, как изображено на фигуре 32, на которой показано сравнение активности *in vitro* гликоконъюгата и тиолового конъюгата анти-FAP ВН. Жизнеспособность клеток определяли после воздействия конъюгатов на трансфицированные клетки СНО с антигеном FAP или без него. ADC содержали MMAE, связанные с гликанами («глико») или, посредством общепринятых химических реакций, с остатками цистеина шарнирной области («тиол»). Следует отметить, что в ~2 раза более низкая EC₅₀ тиоловых конъюгатов по сравнению с гликоконъюгатами согласуется с относительными количествами лекарственного средства, доставляемыми на антитело, при условии сходной эффективности для связывания мишени и интернализации в экспрессирующих антиген клетках СНО. Параллельно, анализировали гликоконъюгат анти-FAP (B11) ADC с DAR 1,5, как описано ранее, и показали в ~2 раза более высокую EC₅₀, чем у сравнительного тиолового конъюгата (DAR 3,3).

В общем, сайт-специфической конъюгацией лекарственных средств через гликаны с помощью отщепляемых линкеров, получили ADC с токсичностью и эффективностью *in vitro*, эквивалентными общепринятым конъюгатам на основе тиола, как показано с использованием различных антител и различных лекарственных средств-линкеров. Более того, при ниже 2 мМ периода, уровень лекарственного средства коррелирует с восстановлением сиаловой кислоты. Увеличение концентрации периода выше 2 мМ предоставляет небольшое преимущество, как ожидают из полного перевода сиаловой кислоты в окисленную форму. Однако, при всех условиях, количество лекарственного средства на антитело было немного ниже, чем содержание сиаловой кислоты, что указывает на то, что некоторые из окисленных сиаловых кислот могут сходным образом не являться доступными для присоединения, либо из-за заглубления, либо иным образом из-за стерических затруднений, возникающих из-за объема лекарственного средства-линкера.

Пример 15. Характеризация *in vivo* конъюгатов антитела с лекарственным средством Эффективность гликоконъюгатов анти-HER оценивали также в способах ксенотрансплантации Her2+ клеток опухоли и сравнивали с сравнительным тиоловым конъюгатом, обладающим в ~2 раза более высоким DAR. Мышам nude имплантировали SK-OV-3 Her2+ клетки опухолей, которым позволяли развить опухоли ~150 mm³ до начала лечения. ADC в дозах 3 или 10 мг/кг инъектировали через хвостовую вену на сутки 38, 45, 52 и 59. Присутствовали ~10 мышей на группу. Объем опухоли у мышей

в различных группах измеряли, и их выживаемость регистрировали. Кривую выживаемости строили на основании способа Каплана-Мейера.

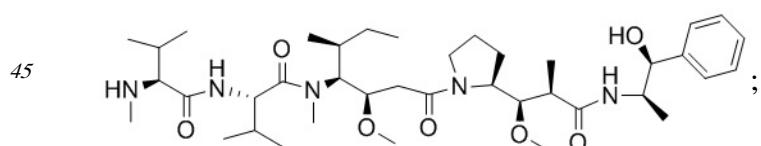
На фигуре 33 показано сравнение эффективности *in vivo* гликоконъюгатов и тиоловых конъюгатов анти-HER в модели ксенотрансплантата Her2+ клеток опухоли. Мышам nude с имплантированными SK-OV-3 Her2+ клетками опухолей вводили дозы MMAE (фигура 33A и B) и PEG8-Dol10 (фигура 33C и D), содержащие гликоконъюгаты или сравнительные тиоловые конъюгаты с в ~2 раза более высоким DAR. Кинетика роста опухолей для конъюгатов MMAE показана на фигуре 33A. В этом случае, для гликоконъюгата показана значительно более высокая эффективность, чем для голого 5 антитела отдельно (черный), но меньшая, чем для сравнительного тиолового конъюгата, обладающего в ~2 раза более высоким DAR (зеленый). Для гликоконъюгата MMAE показаны значительная регрессия опухоли и задержка роста опухоли на ~20 суток (фигура 33A), и ~2-кратное увеличение времени выживаемости от первой дозы (фигура 33B). Для тиолового конъюгата MMAE показана почти полная супрессия опухоли при 10 дозе ADC (10 мг/кг).

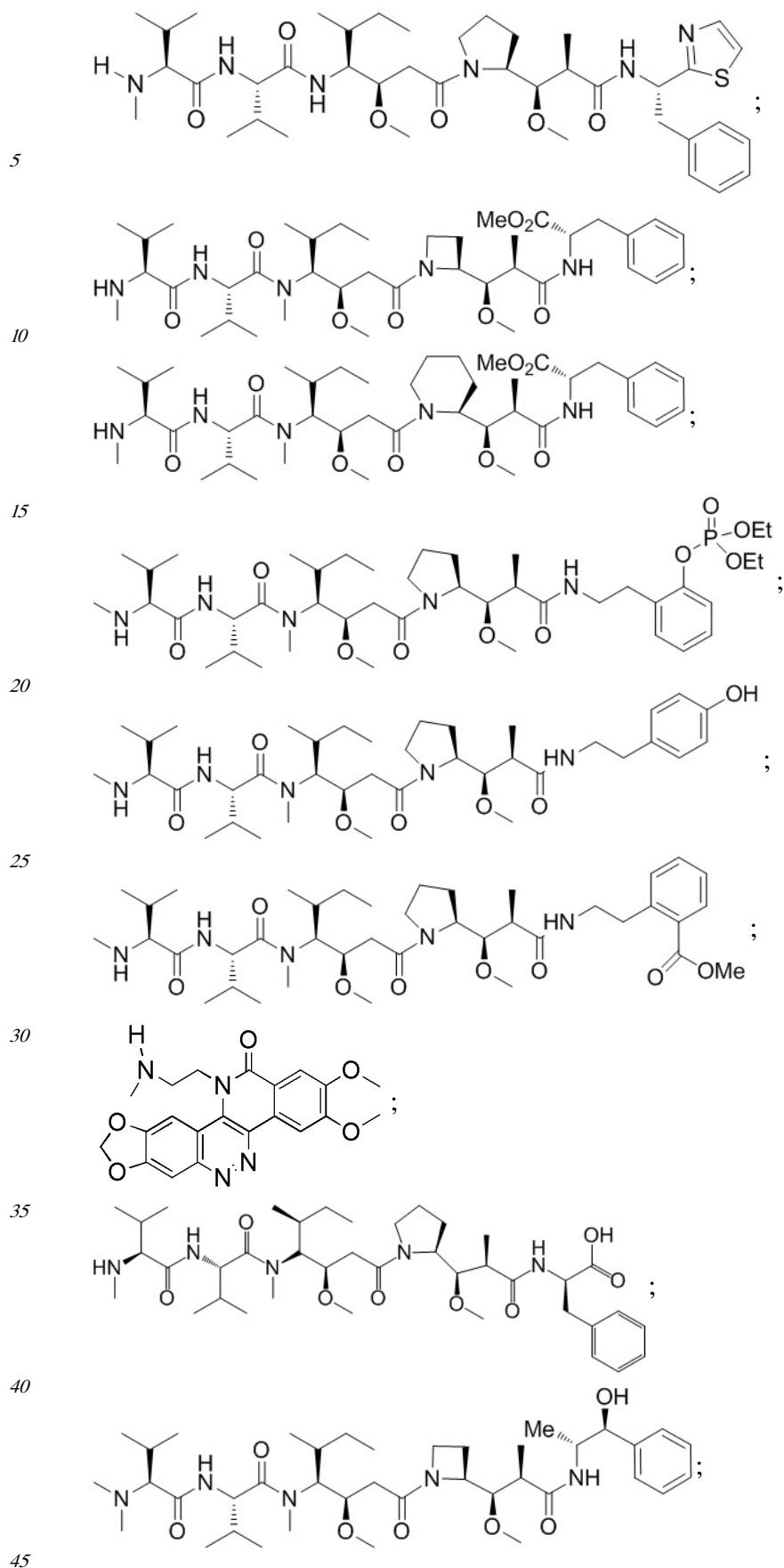
Эффективность *in vivo* гликоконъюгата PEG8-Dol10 («глико-Dol10») и сравнительного тиолового конъюгата с в ~2 раза более высоким DAR («тиол-Dol10») также определяли в той же модели ксенотрансплантата Her2+ клеток опухоли. Для обоих конъюгатов показана более низкая эффективность, чем для конъюгатов MMAE, как описано ранее. 20 Однако, для гликоконъюгата аминоокси-PEG8-Dol10 («глико-Dol10») при 10 мг/кг показана 15-суточная задержка роста опухоли (фигура 33C) и ~20-суточное (1,7-кратное) увеличение времени выживаемости после первого введения (фигура 33D). Тиоловый конъюгат являлся более эффективным в такой же дозе, с показанным 2-кратным 25 увеличением выживаемости. В более низкой дозе (3 мг/кг), для тиолового конъюгата показана меньшая эффективность, чем для гликоконъюгата при 10 мг/кг. Эта доза соответствует дозе 80 мкмоль лекарственного средства PEG8-Dol10 на кг, по сравнению с дозой 110 мкмоль лекарственного средства PEG8-Dol10 на кг для гликоконъюгата.

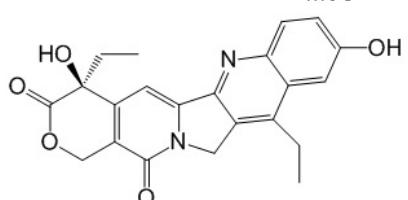
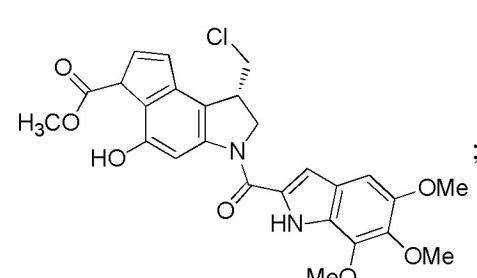
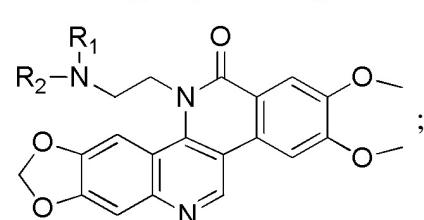
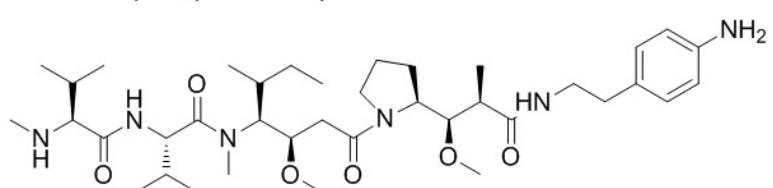
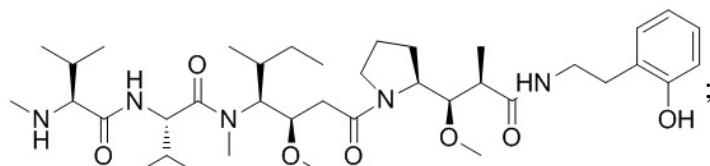
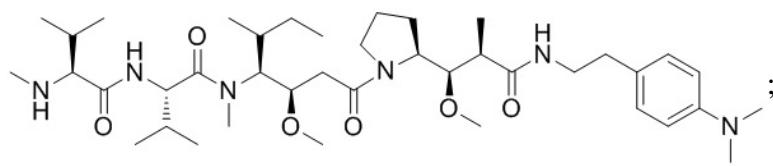
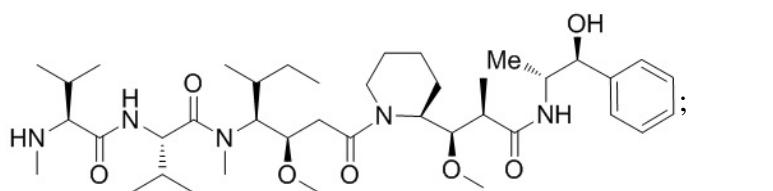
Эти данные показывают, что сайт-специфическая конъюгация лекарственных средств на сиаловой кислоте гликанов антитела приводит к молекулам с активностью, сравнимой 30 с активностью ADC, полученных посредством химических реакций на основе тиола. Несколько более низкая эффективность *in vivo*, по-видимому, обусловлена меньшим количеством лекарственных средств, которое каждое антитело переносит в клетки опухолей посредством интернализации каждого связанного с антителом антигена. Хотя авторы настоящего изобретения не сравнивали эти гликоконъюгаты с тиоловыми 35 конъюгатами с таким же DAR, эффективность, наблюдаемая при различных дозах двух ADC, представляющих сравнимые уровни введенного лекарственного средства, показывает, что гликоконъюгаты обладают присущей им эффективностью, сравнимой с эффективностью их тиоловых эквивалентов, указывая на отсутствие неблагоприятного эффекта конъюгации в этом участке. Более того, доза 10 мг/кг гликоконъюгата Dol10, 40 которая вводила только на 28% более лекарственного средства, обеспечивала 2-кратное увеличение выживаемости по сравнению с тиоловым конъюгатом (при 3 мг/кг), что позволяет предполагать, что эти конъюгаты могут даже обеспечивать эффективность, превосходящую эффективность при таком же DAR. Принимая во внимание очевидное ограничение включения сиаловой кислоты в природные гликаны, более высокой 45 нагрузки лекарственного средства, можно достигать посредством ряда различных способов, включая использование разветвленных линкеров для лекарственного средства или введение дополнительных участков гликозилирования, и с использованием такого же способа.

(57) Формула изобретения

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для доставки цитотоксина, содержащие домен CH1 IgG, где домен CH1 IgG содержит остаток аспарагина в положении аминокислоты 114 в соответствии с нумерацией Kabat, где боковая цепь указанного остатка аспарагина связана с гликаном.
2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для доставки средства для детекции, содержащие домен CH1 IgG, где домен CH1 IgG содержит остаток аспарагина в положении аминокислоты 114 в соответствии с нумерацией Kabat, где боковая цепь указанного остатка аспарагина связана с гликаном.
3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или 2, где домен CH1 дополнительно содержит: любой аминокислотный остаток, кроме пролина, в положении 115 в соответствии с нумерацией Kabat и остаток серина или треонина в положении 116 в соответствии с нумерацией Kabat.
4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или 2, где домен CH1 представляет собой домен CH1 IgG1 или его вариант.
5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 4, где домен CH1 представляет собой домен CH1 IgG1 человека или его вариант.
6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или 2, где боковая цепь остатка аспарагина связана с гликаном посредством β -гликозиламидной связи.
7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6, где гликан представляет собой двухантенный гликан.
8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6, где гликан представляет собой природную гликоформу млекопитающих.
9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6, где гликан содержит реакционноспособную альдегидную группу.
10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 6, где гликан содержит окисленный сахаридный остаток, содержащий реакционноспособную альдегидную группу.
11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 10, где окисленный сахаридный остаток представляет собой концевую сиаловую кислоту или галактозу.
12. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для доставки цитотоксина, содержащие домен CH1 IgG, где домен CH1 IgG содержит остаток аспарагина в положении аминокислоты 114 в соответствии с нумерацией Kabat, где боковая цепь указанного остатка аспарагина связана с гликаном посредством β -гликозиламидной связи и где гликан связан с цитотоксином.
13. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для доставки средства для детекции, содержащие домен CH1 IgG, где домен CH1 IgG содержит остаток аспарагина в положении аминокислоты 114 в соответствии с нумерацией Kabat, где боковая цепь указанного остатка аспарагина связана с гликаном посредством β -гликозиламидной связи и где гликан связан со средством детекции.
14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 12, где цитотоксин выбран из группы, состоящей из:

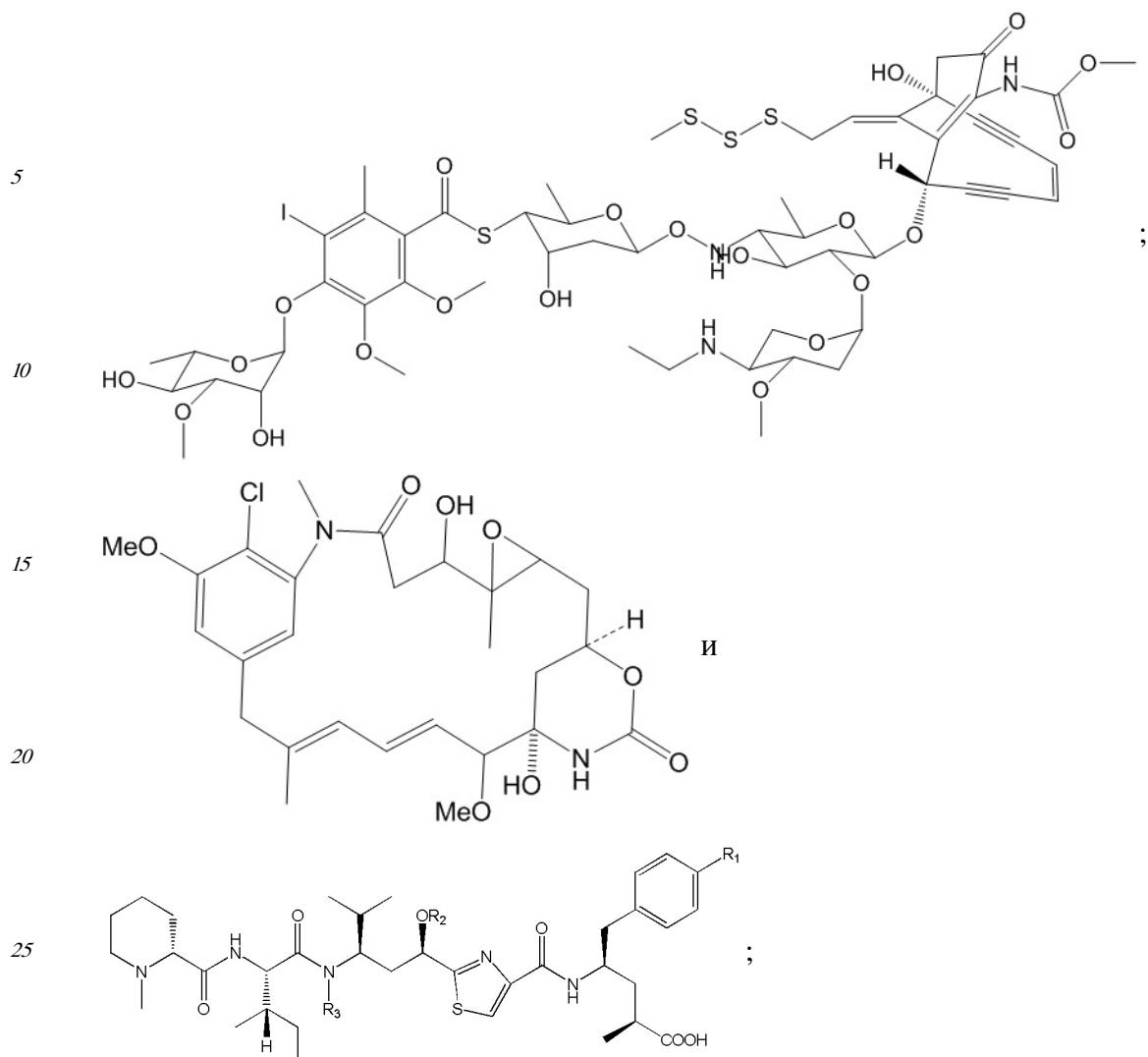






40

45



где R_1 представляет собой любую алкильную, арильную, алcoxси- или арилоксигруппу

и R_2 и R_3 представляют собой алкильную или арильную группу.

15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 12, где цитотоксин связан через оксимную или гидразоновую связь с сахаридным остатком гликана.

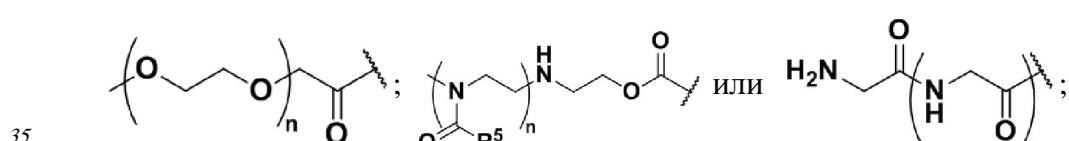
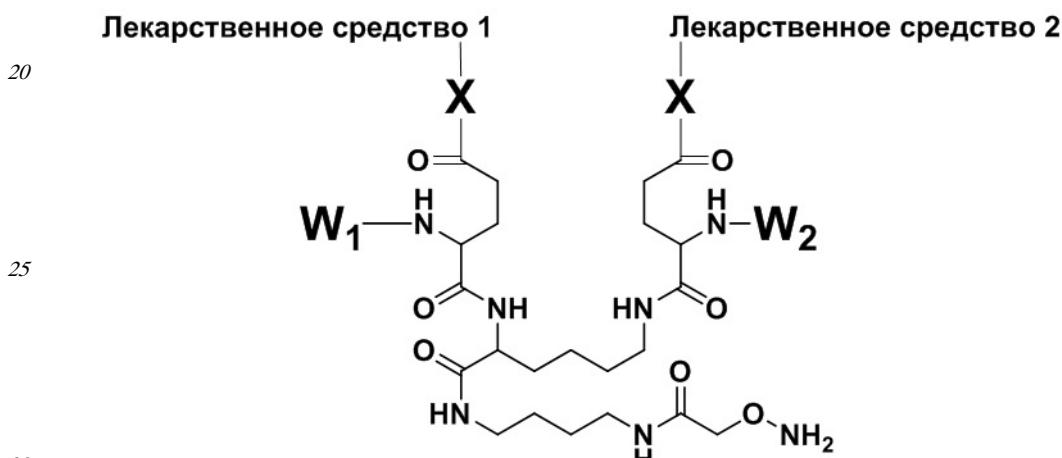
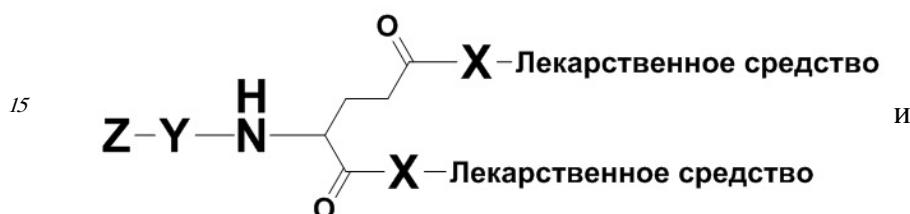
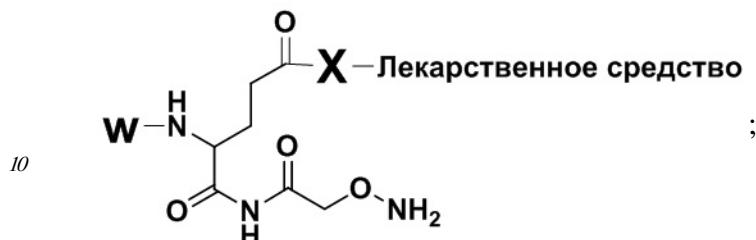
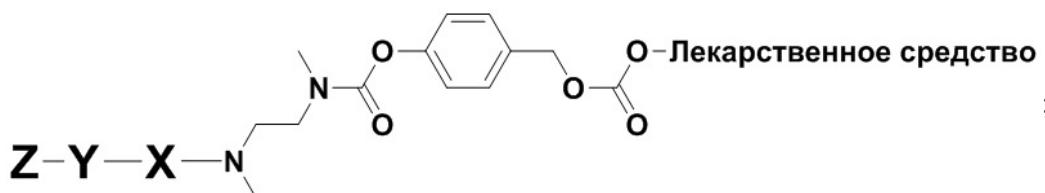
16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 13, где средство для детекции связано через оксимную или гидразоновую связь с сахаридным остатком гликана.

17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 15 или 16, где сахарид представляет собой концевой остаток сиаловой кислоты или галактозы гликана.

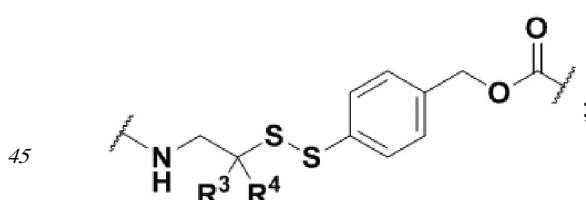
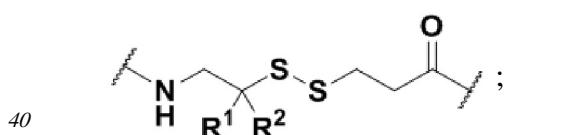
18. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 12 или 13, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит рН-чувствительный линкер, дисульфидный линкер, фермент-чувствительный линкер или другую отщепляемую линкерную группу.

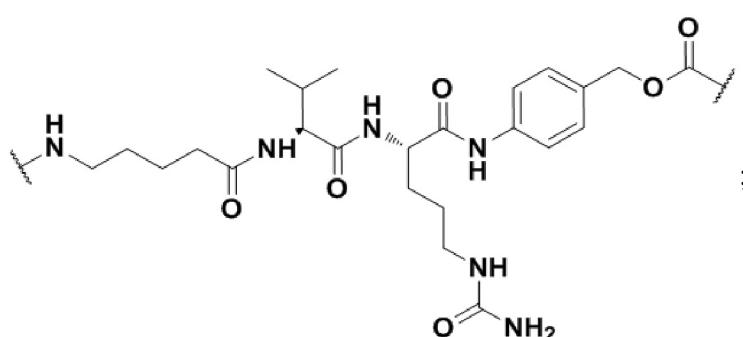
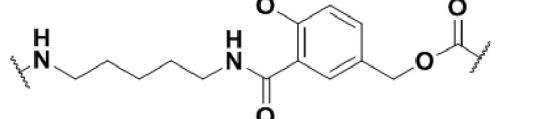
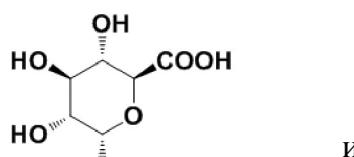
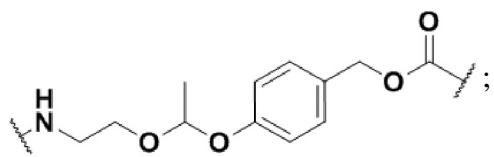
19. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 12-17, содержащие линкерную группу, выбранную из группы, состоящей из:

$Z - Y - X -$ Лекарственное средство;

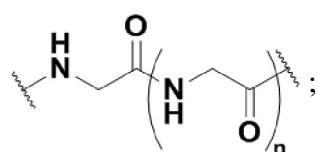
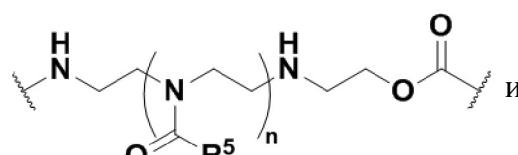


где каждый X независимо выбран из:

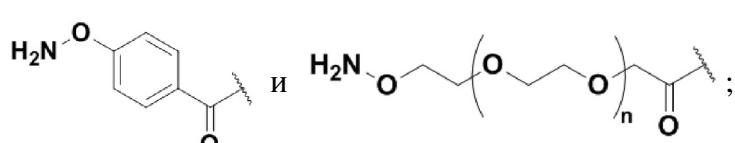
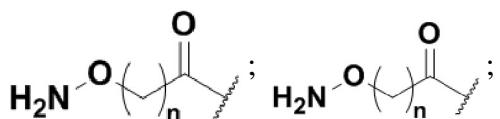




Y выбран из:



Z выбран из:



и где R^1-R^5 каждый независимо выбран из группы, состоящей из:
Н, алкильной группы или арильной группы.

20. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для связывания цитотоксина, содержащий домен CH1 IgG, где домен CH1 IgG содержит свободный остаток аспарагина в положении аминокислоты 114 в соответствии с нумерацией Kabat.

21. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент для связывания средства для детекции, содержащие домен CH1 IgG, где домен CH1 IgG содержит свободный остаток аспарагина в положении аминокислоты 114 в соответствии с нумерацией Kabat.

5 22. Конъюгат антитела с цитотоксином для доставки цитотоксина субъекту, где остаток в положении аминокислоты 114 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п. 1 связан с гликаном через β -гликозиламидную связь и где цитотоксин связан через оксимную или гидразоновую связь с сахаидным остатком гликана.

10 23. Конъюгат антитела со средством для детекции для доставки средства для детекции субъекту, где остаток в положении аминокислоты 114 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по п. 1 связан с гликаном через β -гликозиламидную связь и где средство для детекции связано через оксимную или гидразоновую связь с сахаидным остатком гликана.

15 24. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 12, где цитотоксин связан через боковую цепь модифицированного остатка аспарагина с сахаидным остатком гликана.

25 25. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 13, где средство для детекции связано через боковую цепь модифицированного остатка аспарагина с сахаидным остатком гликана.

20 26. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 24 или 25, где сахаид представляет собой концевой остаток сиаловой кислоты или галактозы гликана.

27. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 24, где цитотоксин связан через оксимную или гидразоновую связь с сахаидным остатком гликана.

25 28. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 25, где средство для детекции связано через оксимную или гидразоновую связь с сахаидным остатком гликана.

29. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 24, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент для доставки цитотоксина содержит конъюгат антитела с лекарственным средством (ADC).

30 30. Композиция для лечения рака, содержащая в эффективном количестве антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предшествующих пунктов и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

31. Способ лечения рака у нуждающегося в этом пациента, включающий введение эффективного количества композиции по п. 30.

35 32. Выделенный полинуклеотид, кодирующий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-29.

33. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п. 32.

34. Клетка-хозяин для продуцирования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-29, содержащая полинуклеотид по п. 32 или вектор по п. 33.

40 35. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий экспрессию полинуклеотида по п. 32 или вектора по п. 33 в клетке и выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из этой клетки.

36. Композиция для диагностического применения, содержащая в эффективном количестве антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-29 и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

1

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> GENZYME CORPORATION

<120> ГИПЕРГЛИКОЗИЛИРОВАННЫЕ СВЯЗЫВАЮЩИЕ ПОЛИПЕПТИДЫ

<130> 554314 SA9-079PC

<140> PCT/US2014/022623

<141> 2014-03-10

<150> 61/776,724

<151> 2013-03-11

<150> 61/776,715

<151> 2013-03-11

<150> 61/776,710

<151> 2013-03-11

<160> 41

<170> PatentIn версии 3.5

<210> 1

<211> 218

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

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

<400> 1

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln Gly
85 90 95Thr His Leu His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

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

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 2

<211> 443

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

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

<400> 2

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

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

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

Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu Ser
 50 55 60

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

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

Cys Thr Pro Val Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 115 120 125

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
 180 185 190

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 195 200 205

Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
 210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 225 230 235 240

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
 260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 305 310 315 320

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
 325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 340 345 350

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 3

<211> 444

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

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

<400> 3

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 Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30

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

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Pro Val Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser Asn Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 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

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
 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

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
 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

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
 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

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
 435 440

<210> 4

<211> 444

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

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

<400> 4

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 Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30

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

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Pro Val Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 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
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			
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
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			
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
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			
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
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

Ser Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 5
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 5
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Pro Val Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 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

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
 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

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
 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

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
 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

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 Asn Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 6
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 6
 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 Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30

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

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Pro Val Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 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

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
 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

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
 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

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
 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

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 Asn Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 7
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 7
 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 Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30

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

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Pro Val Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 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

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
 195 200 205

13

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

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
 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

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
 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

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 Asn Gly Thr
 435 440 445

<210> 8
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

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

<400> 8

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

15

225 230 235 240

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
245 250 255Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
260 265 270Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
275 280 285Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Thr Ser Arg Val Val Ser Val Leu Thr
290 295 300Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
305 310 315 320Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
325 330 335Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
340 345 350Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
355 360 365Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
370 375 380Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
385 390 395 400Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
405 410 415Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 9

<211> 215

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

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

16

<400> 9
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile 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
 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

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
 210 215

<210> 10
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

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

<400> 10

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Ala	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
1				5						10			15		

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Gly	Ser	Ile	Arg	Ser	Tyr
				20			25				30				

Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Tyr	Ile
				35			40				45				

Gly	Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Ser	Ala	Ile	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Gln
				50			55			60					

Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu
	65				70			75			80				

Lys	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85				90				95			

Arg	Glu	Gly	Val	Arg	Gly	Ala	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp
	100				105				110						

Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys
					115			120			125				

Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly
	130				135				140						

Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro
145				150			155			160					

Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr
				165				170			175				

Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val
			180				185			190					

Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn
	195				200				205						

Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro
	210				215			220							

Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu
225				230			235				240				

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 355 360 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 11
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <221> источник

19

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

<400> 11
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Ala Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Tyr Tyr Thr Gly Ser Ala Ile Tyr Asn Pro Ser Leu Gln
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Asn Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Glu Gly Val Arg Gly Ala Ser Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
 100 105 110

Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Asn Ser Thr Lys
 115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240

20

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 355 360 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 12
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <221> источник

21

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

<400> 12
 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
 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

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 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

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
 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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 13

<211> 450

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

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

<400> 13

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
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		

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
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			

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
195								200			205				

Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
210								215			220				

Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

23

225	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
245	250	255	
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
260	265	270	
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
275	280	285	
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg			
290	295	300	
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
305	310	315	320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
325	330	335	
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
340	345	350	
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
355	360	365	
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
370	375	380	
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val			
385	390	395	400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp			
405	410	415	
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His			
420	425	430	
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro			
435	440	445	
Gly Lys			
450			

<210> 14
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

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

<400> 14

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

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr
														20	30

Tyr	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
														35	45

Ala	Arg	Ile	Tyr	Pro	Thr	Asn	Gly	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
														50	60

Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Ala	Tyr
														65	80

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

Ser	Arg	Trp	Gly	Gly	Asp	Gly	Phe	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
														100	110

Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Asn	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
														115	125

Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala
														130	140

Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser
														145	160

Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val
														165	175

Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro
														180	190

Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys
														195	205

Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
														210	220

Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
														225	240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 15
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

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

<400> 15

Gl	u	V	a	G	n	L	e	u	V	a	G	l	u	G	l	u	L	e	u	V	a	G	l	u	P	o	G	l	u	
1																														
				</																										

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Ala Ser Arg
 290 295 300

 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

 Gly Lys
 450

 <210> 16
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

 <220>
 <221> источник

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

<400> 16
 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
 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

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

 Ser Arg Trp Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Asn Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 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

 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
 195 200 205

 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

29

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Ala Ser Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 17
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <221> источник

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

<400> 17
Gly Gly Gly Gly
1

<210> 18
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"

<400> 18
Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 19
<211> 6
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"

<400> 19
Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 20
<211> 7
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"

<400> 20
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 21
<211> 8
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"

<400> 21

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
1 5

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"

<400> 22
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

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

<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 23
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Arg Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

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
 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

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> 24

<211> 450

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

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

<400> 24

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 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

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
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 25

<211> 450

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

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

<400> 25

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 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

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
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Thr Ser Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

36

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 26

<211> 450

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

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

<400> 26

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser 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

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
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Ala Ser Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

38

385

390

395

400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 27
 <211> 450

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

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

<400> 27

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 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

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
 195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Asn Thr Ser Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 28
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"
 <400> 28
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln Gly
 85 90 95

Thr His Leu His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

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

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 29

<211> 444

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

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

<400> 29

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

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

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

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Pro Val Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 115 120 125

42

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

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
 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

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
 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

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
 355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380

43

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400

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
 435 440

<210> 30

<211> 444

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

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

<400> 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 Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30

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

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Pro Val Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 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

44

145	150	155	160
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			
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
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			
275	280	285	
Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Thr Ser 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
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			
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
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln			

45

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
 435 440

<210> 31

<211> 218

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

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

<400> 31

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Val Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln Gly
 85 90 95

Ser His Phe His Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140

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

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 32

<211> 444

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

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

<400> 32

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Pro Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 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

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
 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

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
 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

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
 355 360 365

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 370 375 380 385

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 385 390 395 400

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
 435 440

<210> 33
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <221> источник
 <223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический полипептид"

<400> 33
 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 Pro Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Pro Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 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

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
 165 170 175

49

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
 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

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
 275 280 285

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Thr Ser 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

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
 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

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

50

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 34

<211> 444

<212> PRT

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

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

<400> 34

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 Pro Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Gly Gln Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60

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

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

Tyr Cys Thr Pro Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
 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

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

51

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

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
 275 280 285

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Ala Ser 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

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
 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

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
 435 440

<210> 35

<211> 444

<212> PRT

<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	Pro	Phe	Ser	Asn	Tyr
	20							25					30		

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

Gly	Gln	Ile	Arg	Leu	Lys	Ser	Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr	His	Tyr	Ala	Glu
	50				55					60					

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

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

Tyr	Cys	Thr	Pro	Ile	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val
			100				105					110			

Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser
	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				

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
			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

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
 275 280 285

Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Asn Thr Ser 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

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
 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

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
 435 440

<210> 36
 <211> 214
 <212> PRT
 <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	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					

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
				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						

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
				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						

Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys
				210	

<210> 37

<211> 450

<212> PRT

55

<213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

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

<400> 37

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
												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			

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
				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			

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
				195		200		205							

Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
						210		215		220					

56

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 435 440 445

Gly Lys
 450

<210> 38
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<221> источник

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

<400> 38

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
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		

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
						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		

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
					195			200			205				

Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp
					210		215			220					

Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly

58

225	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
245	250	255	
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
260	265	270	
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
275	280	285	
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Asn Ala Ser Arg			
290	295	300	
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
305	310	315	320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
325	330	335	
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
340	345	350	
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
355	360	365	
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
370	375	380	
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val			
385	390	395	400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp			
405	410	415	
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His			
420	425	430	
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro			
435	440	445	
Gly Lys			
450			

<210> 39
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Искусственная последовательность

<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"

<400> 39
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 40
<211> 4
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

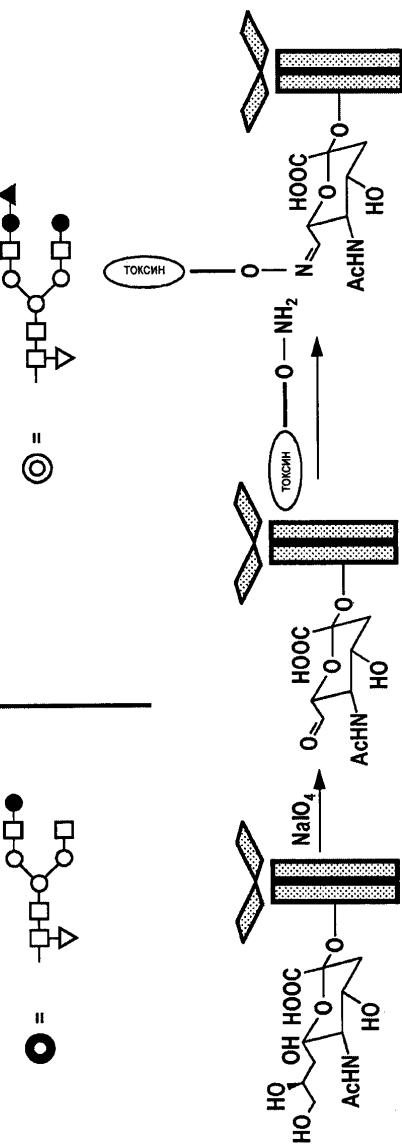
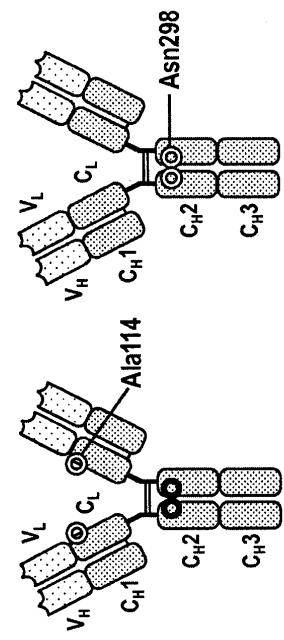
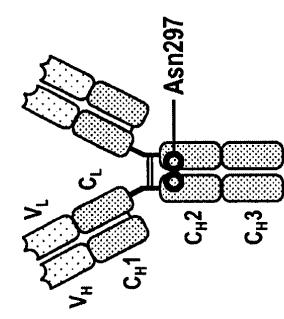
<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"

<400> 40
Asn Asn Ala Ser
1

<210> 41
<211> 4
<212> PRT
<213> Искусственная последовательность

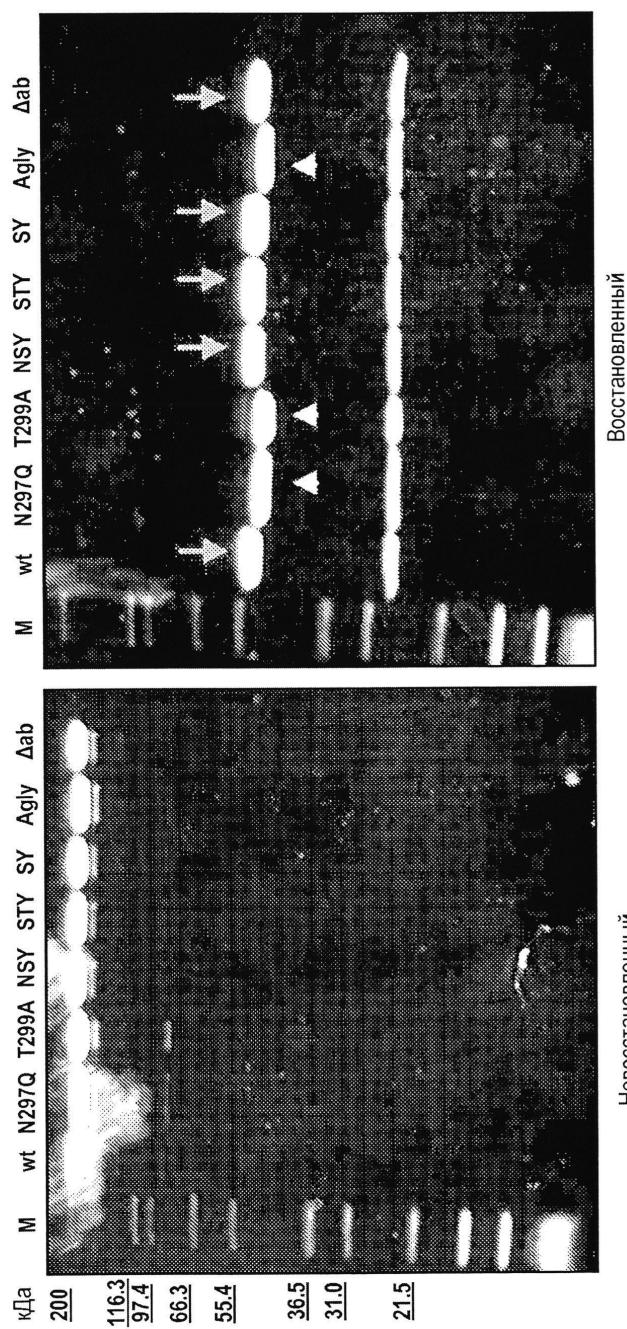
<220>
<221> источник
<223> /примечание="Описание искусственной последовательности: Синтетический пептид"

<400> 41
His His His His
1



ΦИГ. 1

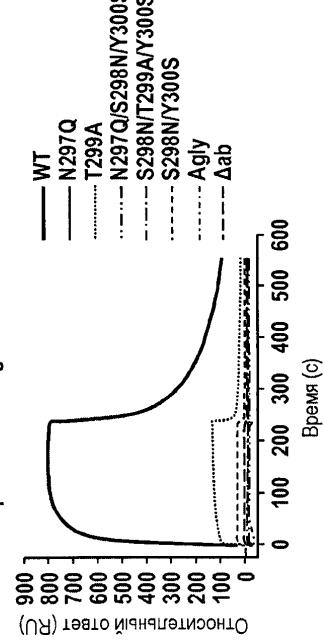
2/39



ФИГ. 2

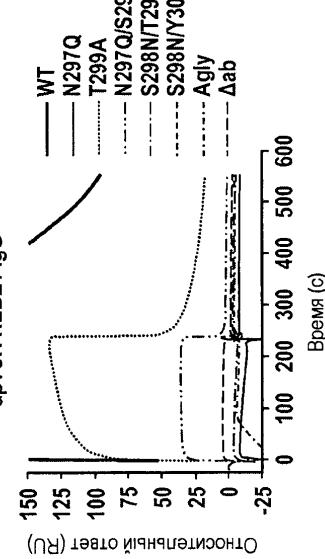
Полный размер: CD16a-Val158

Связывание FcγRIIa-Val158 человека с мутантами



приближение:

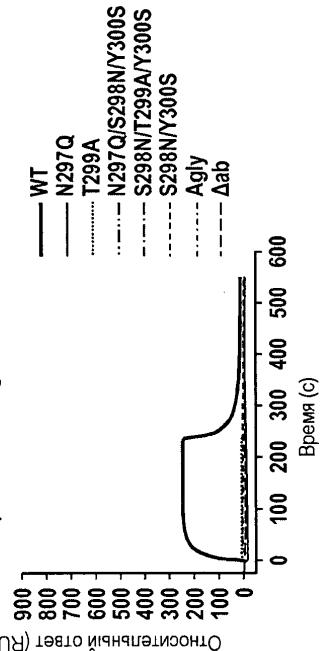
Связывание FcγRIIa-Val158 человека с мутантами



Фиг. 3

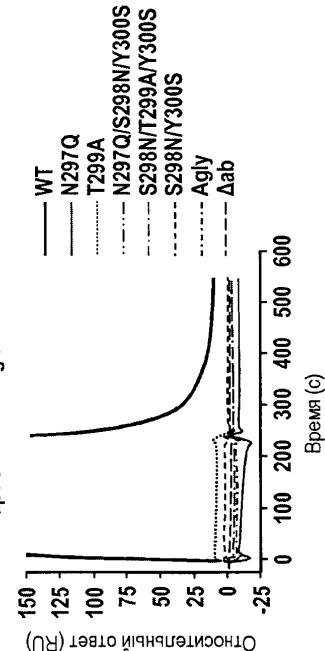
Полный размер: CD16a-Phe158

Связывание FcγRIIa-Phe158 человека с мутантами



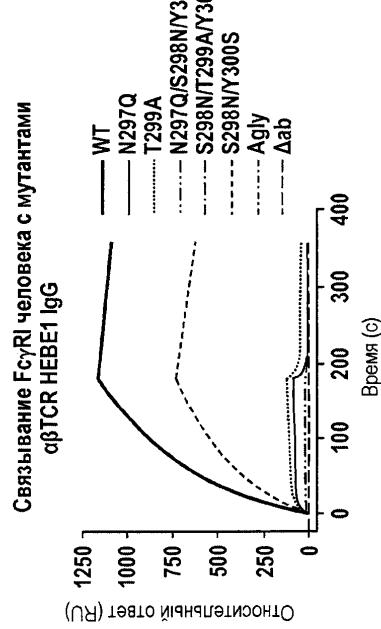
приближение:

Связывание FcγRIIa-Phe158 человека с мутантами

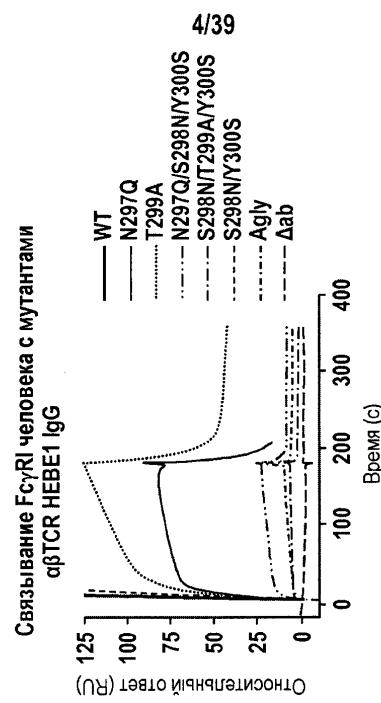


3/39

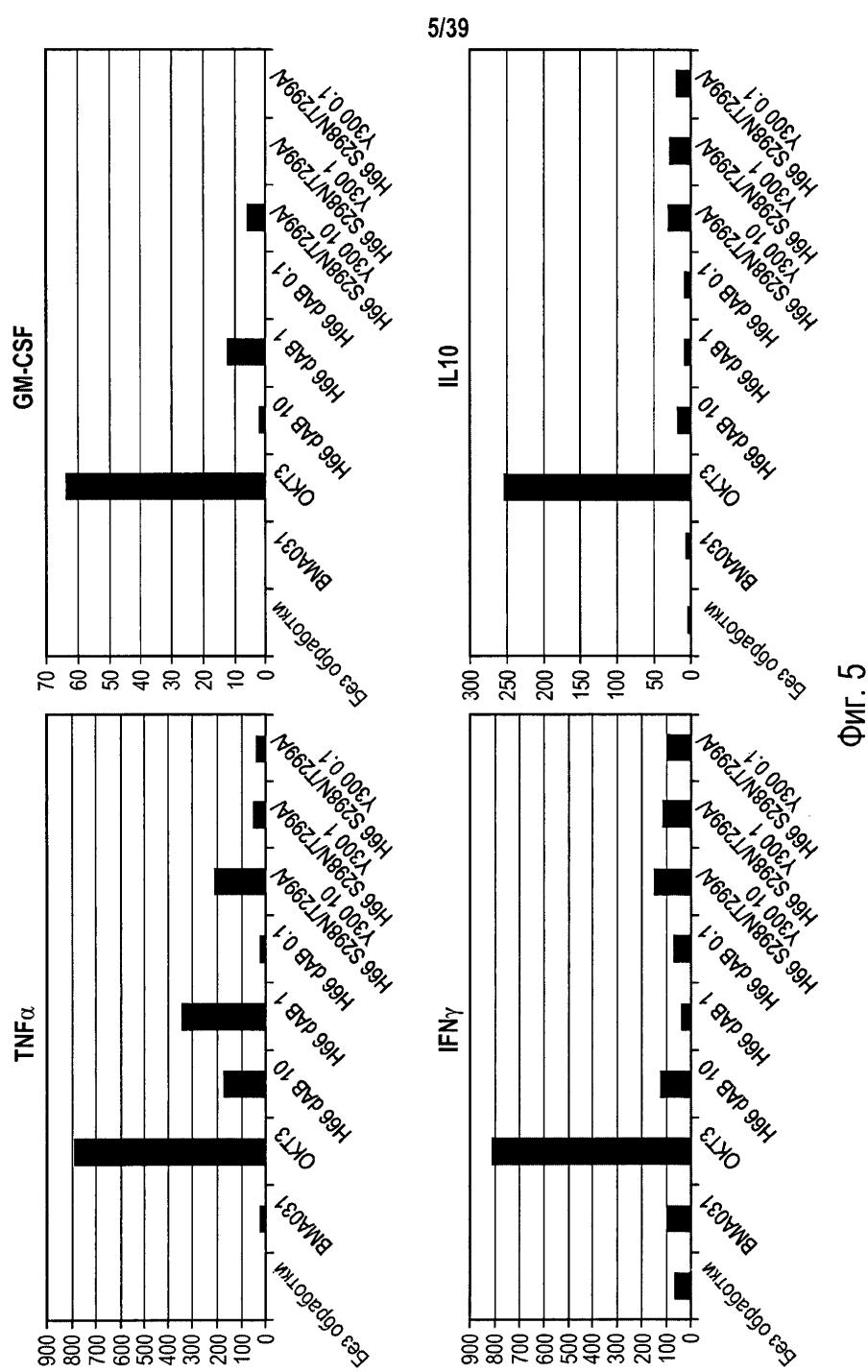
Полный размер:



приближение:

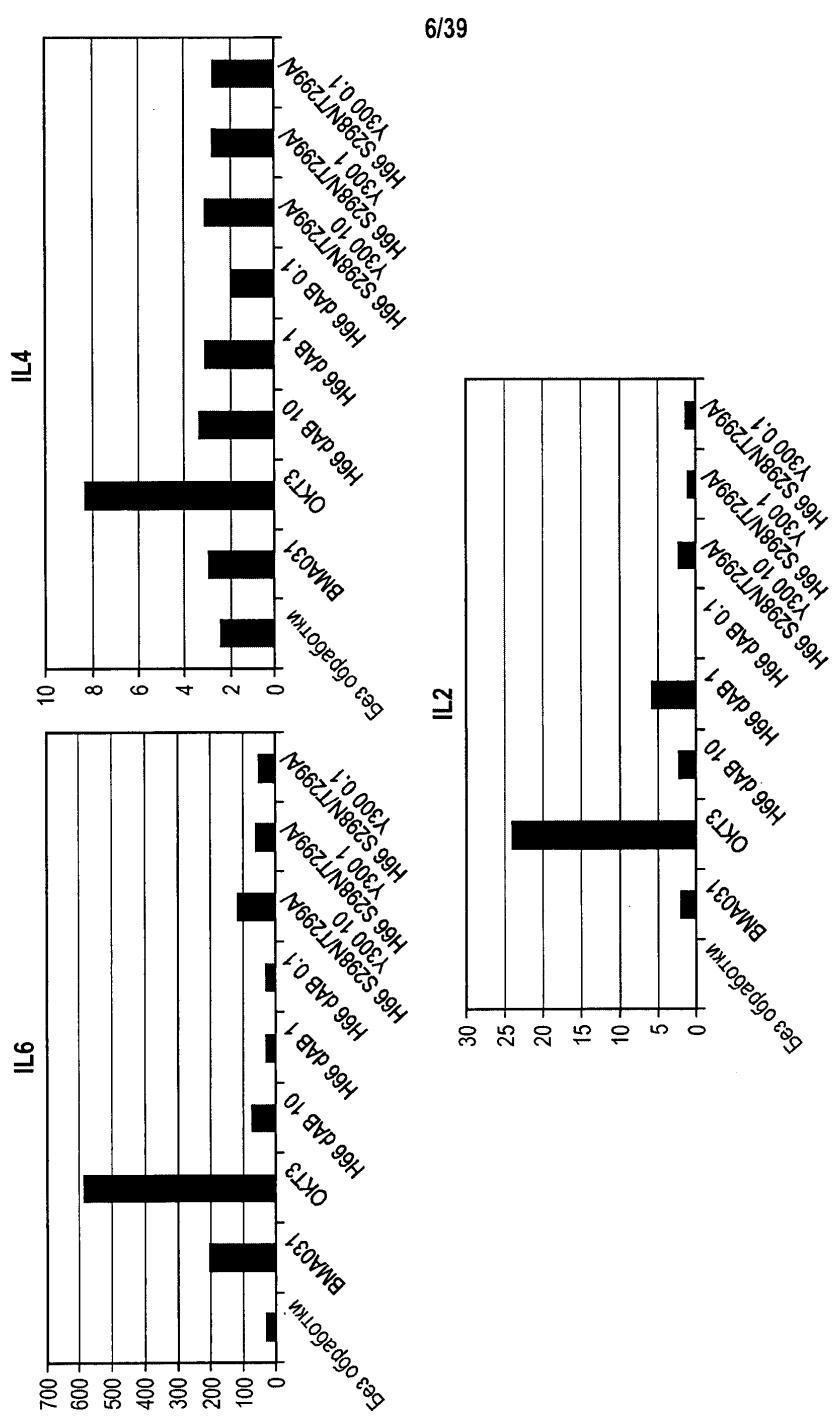


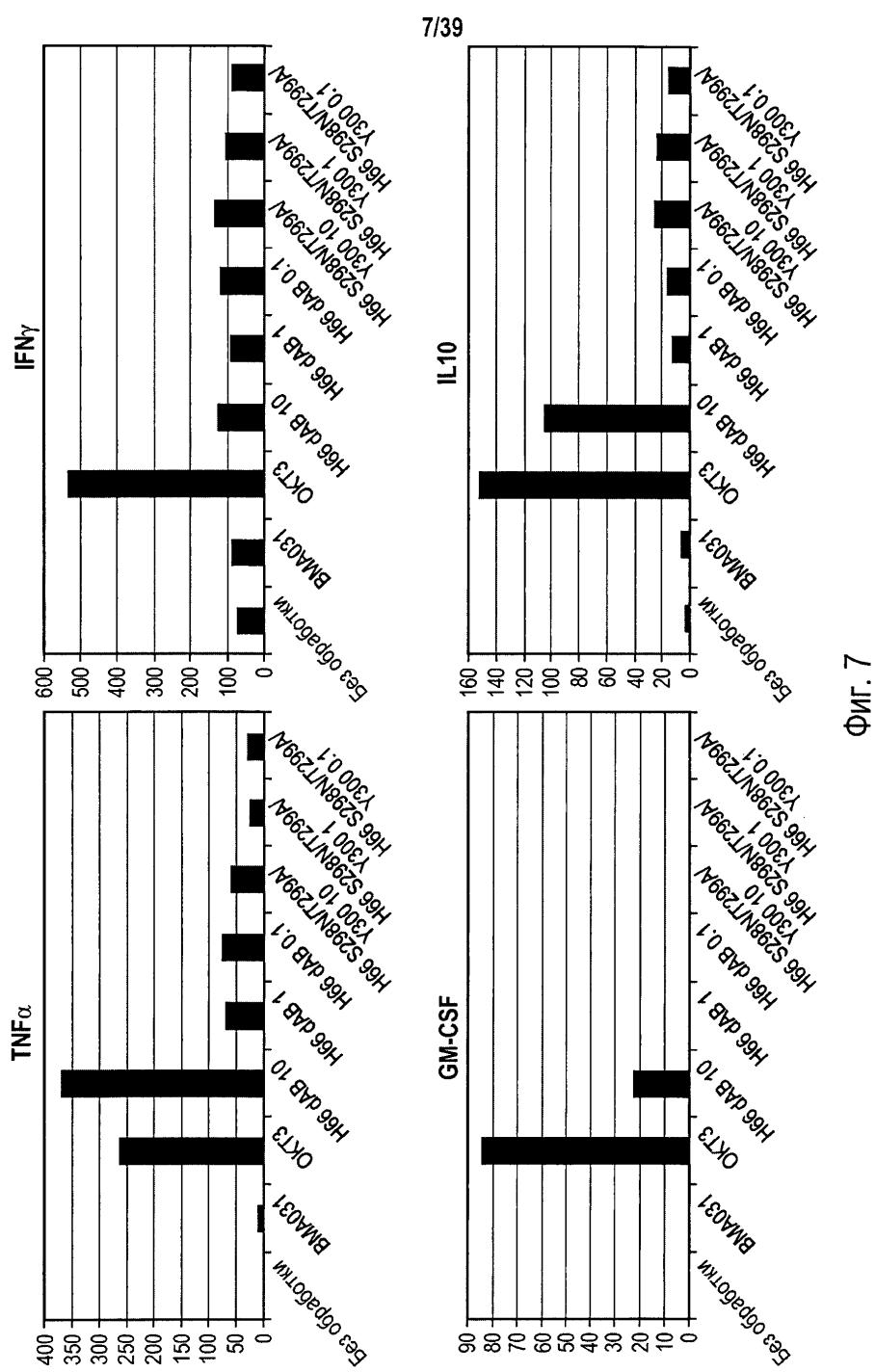
Фиг. 4

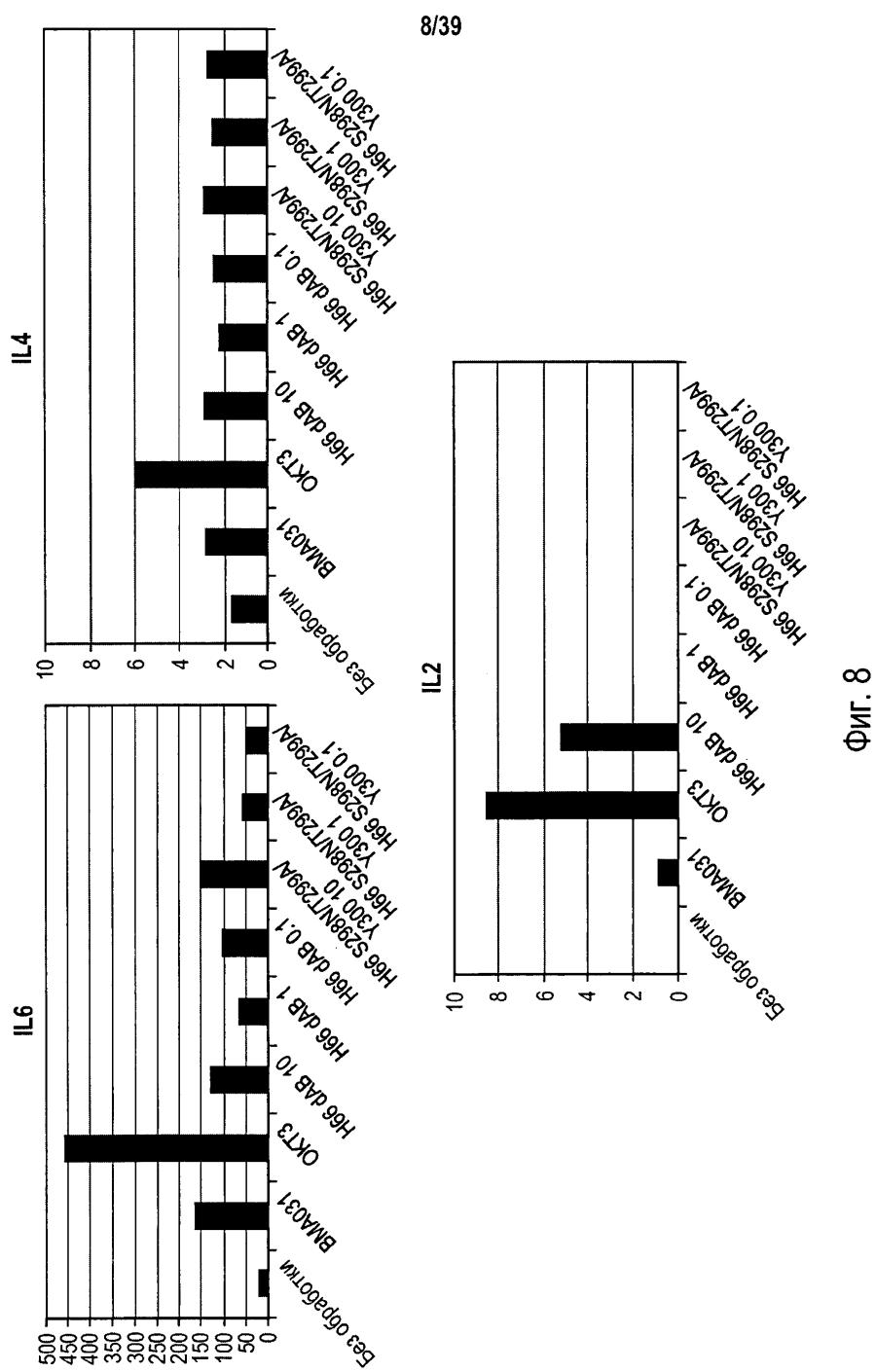


Фиг. 5

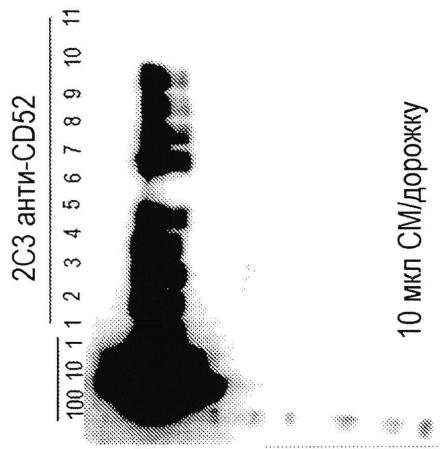
ФИГ. 6







A. Вестерн-блоттинг



2C3 анти-CD52

100 10 1 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

1 - WT
2 - WT
3 - A114N
4 - Y436S
5 - Y436T
6 - S440N
7 - S442N
8 - NGT
9 - 298N/Y300S
10 - Ложная трансфекция
11 - Среда

10 мкг СМ/дорожку

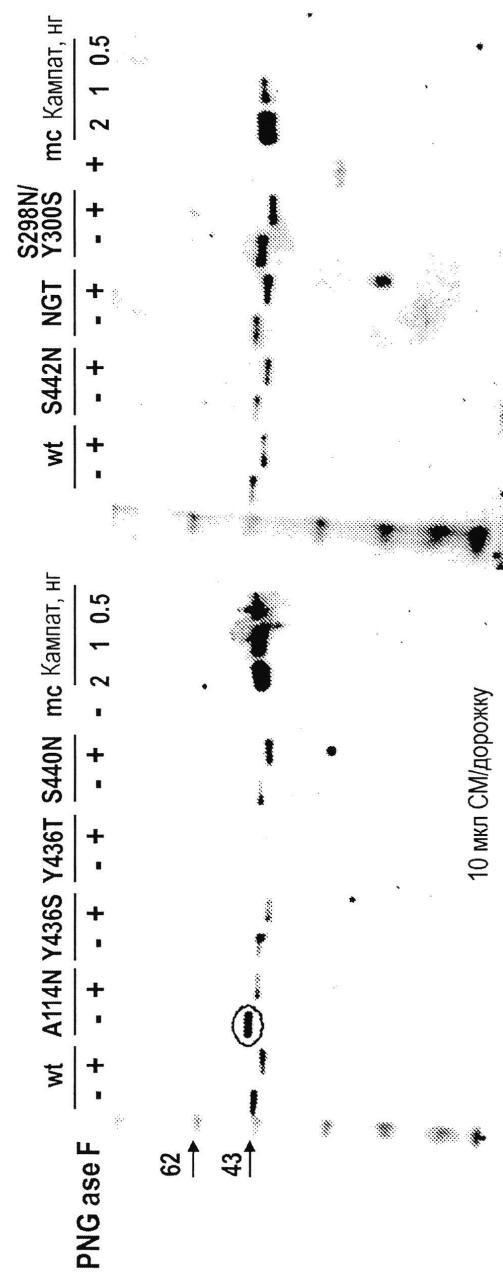
B.

Biacore

Неназначенное	Конц. (мкг/мл)	Относительный ответ (RU)	Расчетная конц. (RU)	Расчетная конц. (мкг/мл)
2C3 в среде	3.00	855.75	2.45E-08	3.669
2C3 в среде	3.00	860.96	2.47E-08	3.710
2C3 в среде	3.00	866.89	2.51E-08	3.758
A114N		146.5	1.60E-09	0.240
Ложная трансфекция		87.84	8.62E-10	0.129
NGT		124.52	1.30E-09	0.196
S298N/Y300S		112.14	1.15E-09	0.172
S440N		146.36	1.60E-09	0.240
S442N		121.21	1.26E-09	0.189
WT (Катя)		148.41	1.63E-09	0.244
WT (Тим)		148.08	1.62E-09	0.244
Y436S		158.72	1.78E-09	0.267
Y436T		84.27	8.23E-10	0.123
Инкубированная среда		87.38	8.57E-10	0.129

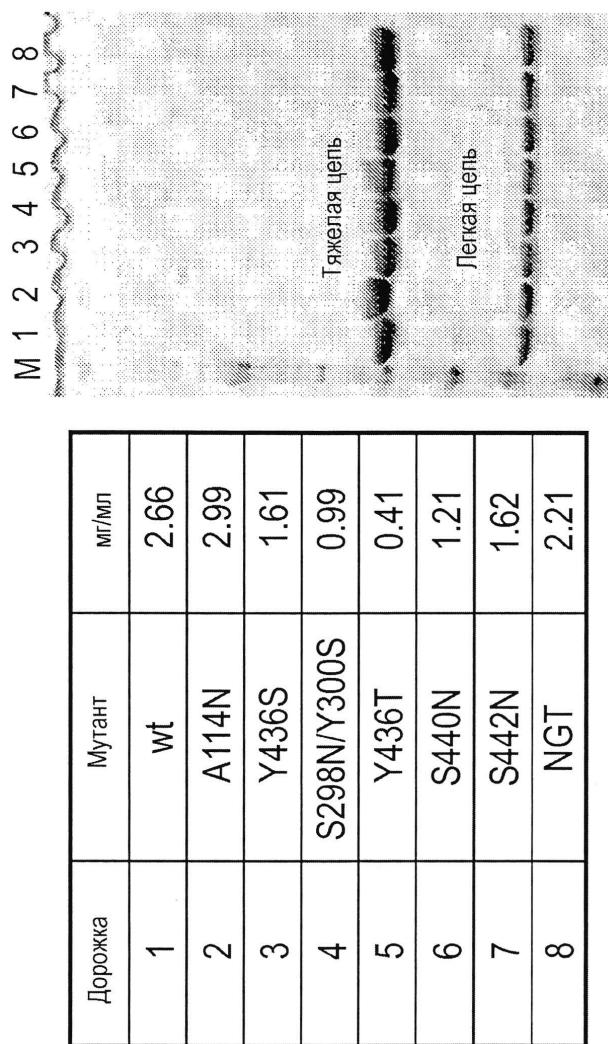
Фиг. 9

10/39



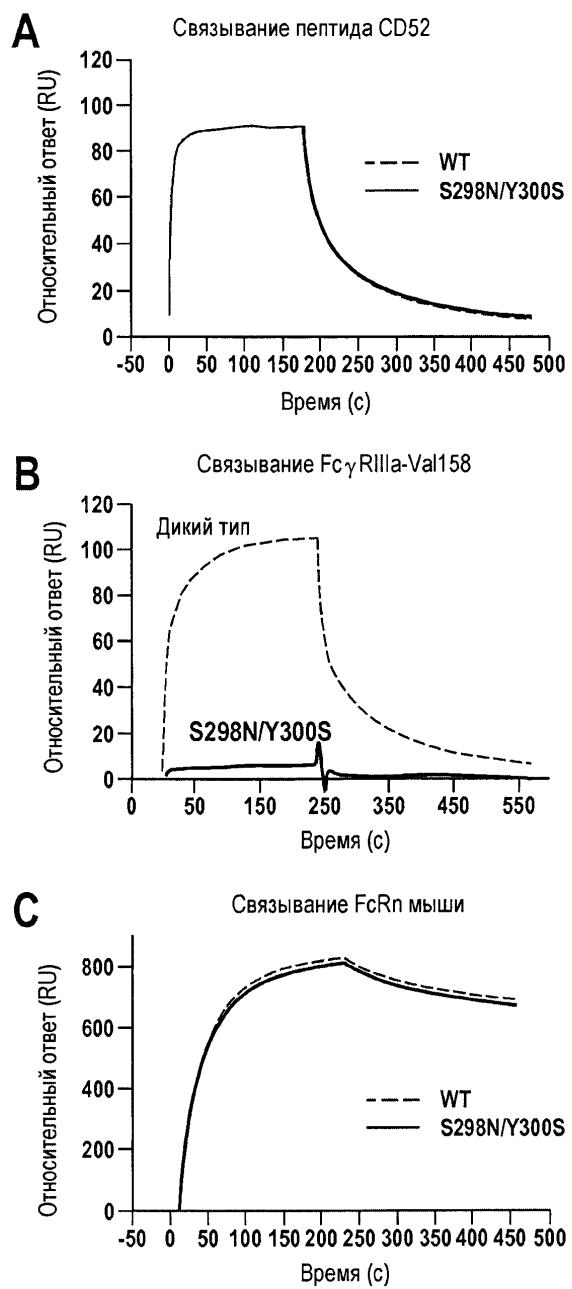
ФИГ. 10

11/39



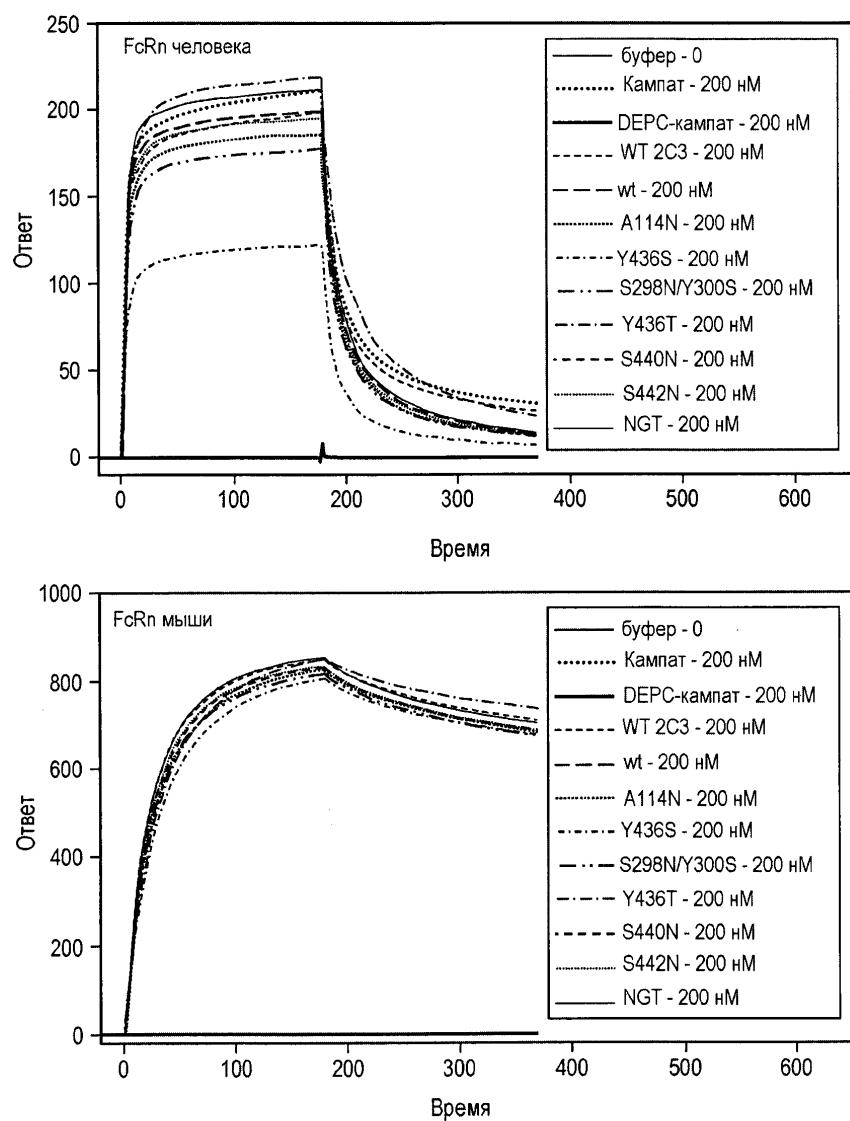
Фиг. 11

12/39



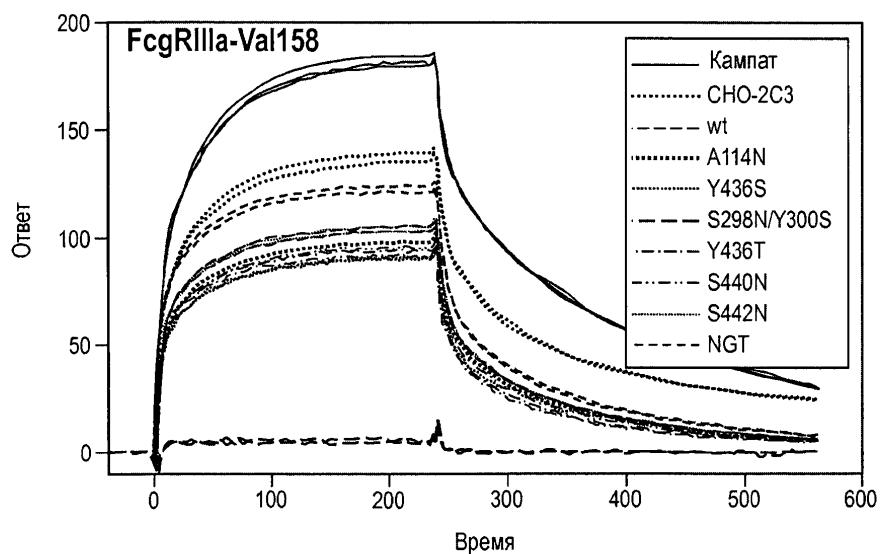
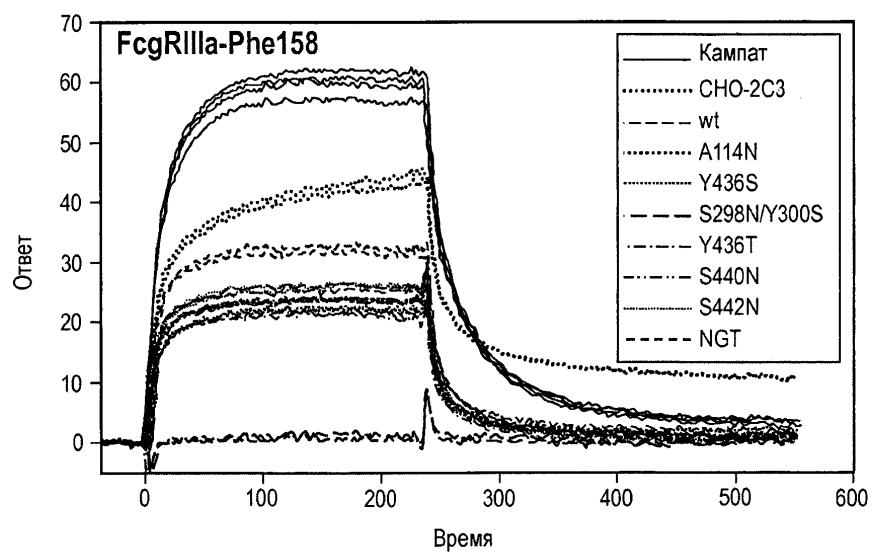
Фиг. 12

13/39



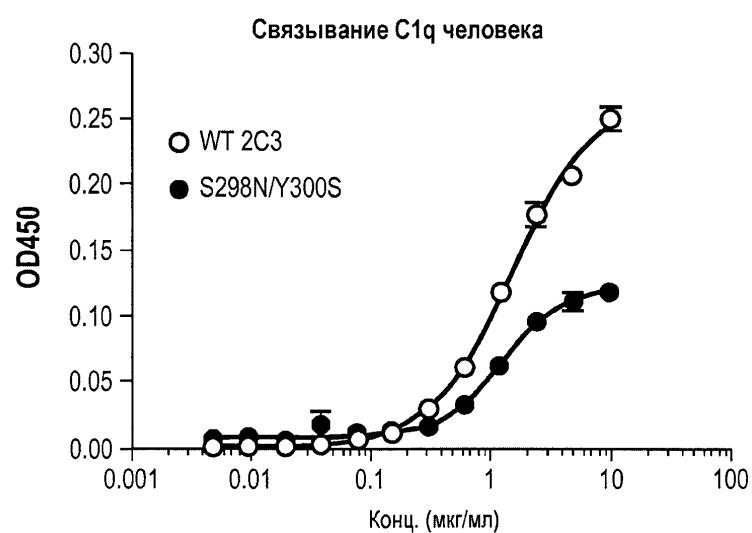
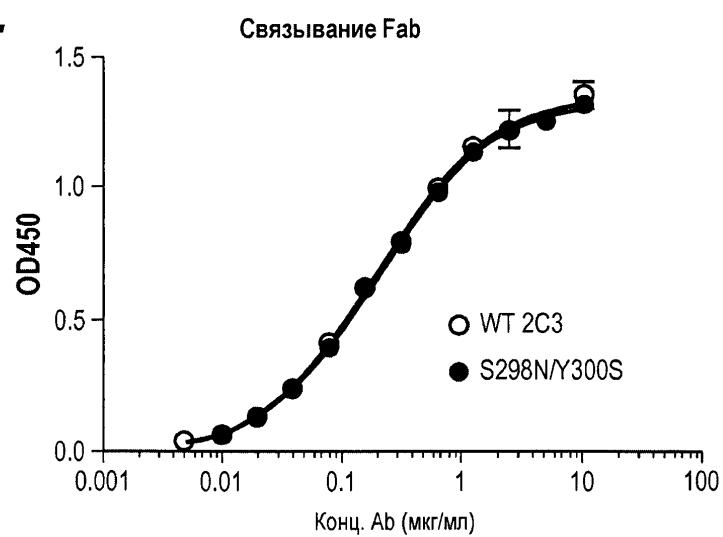
Фиг. 13

14/39

A.**B.**

Фиг. 14

15/39

A.**B.**

Фиг. 15

16/39

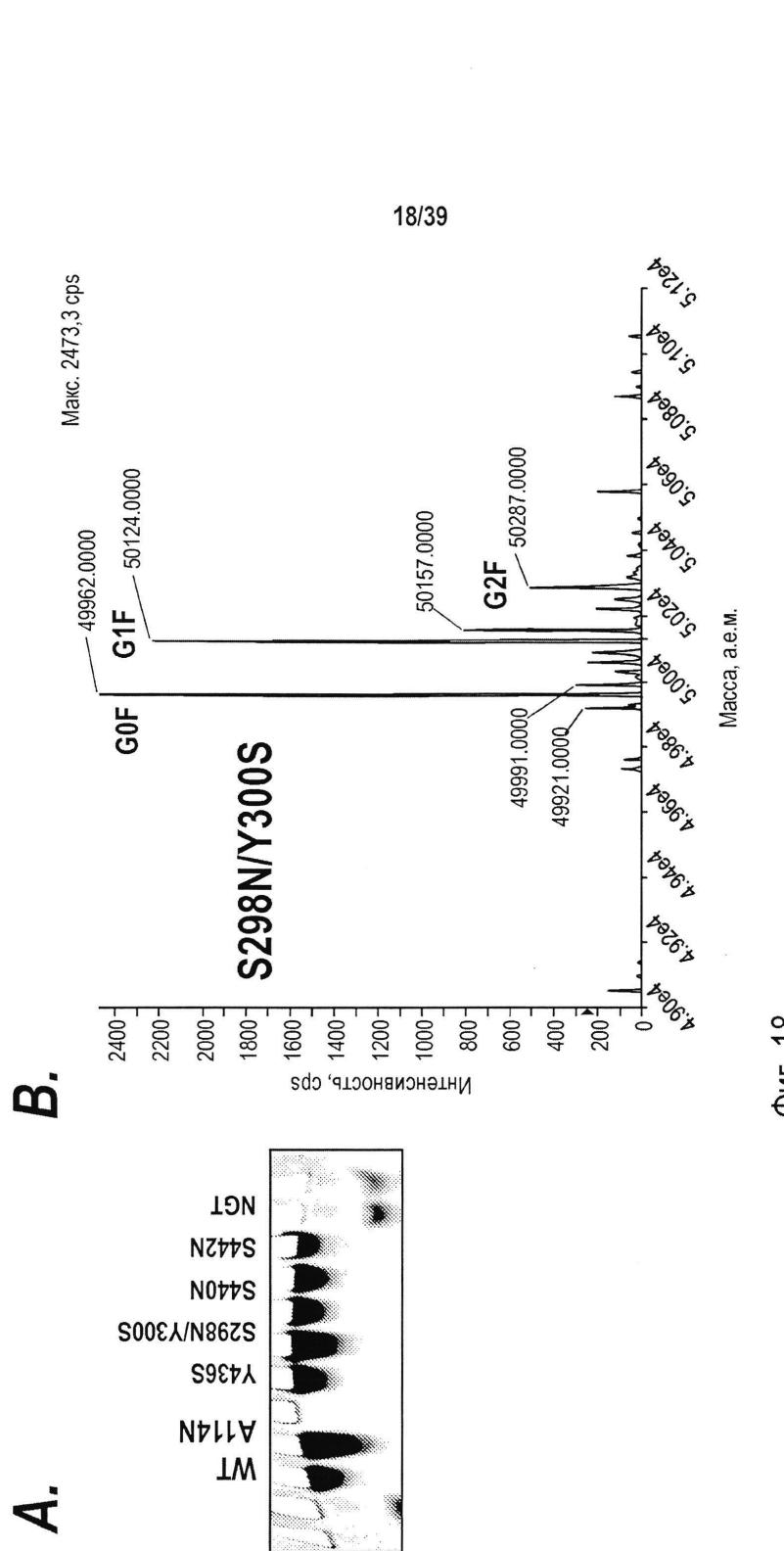
Образец	$k_a \times 10^6 / \text{M} \cdot \text{с}$	$k_d \times 10^{-2} / \text{с}$	$R_{\text{макс}} (\text{RU})$	$K_D (\text{нМ})$
GLD52	7.0	1.7	67.0	2.44
WT 2C3	6.0	1.1	64.2	1.75
A114N	4.7	1.1	59.5	2.45
Y436S	5.9	1.0	66.9	1.73
S298N/Y300S	5.7	1.0	63.3	1.80
Y436T	4.8	0.9	65.7	1.95
S440N	5.8	1.1	66.8	1.84
S442N	5.7	1.1	66.2	1.85
NGT	7.9	1.1	70.2	1.35

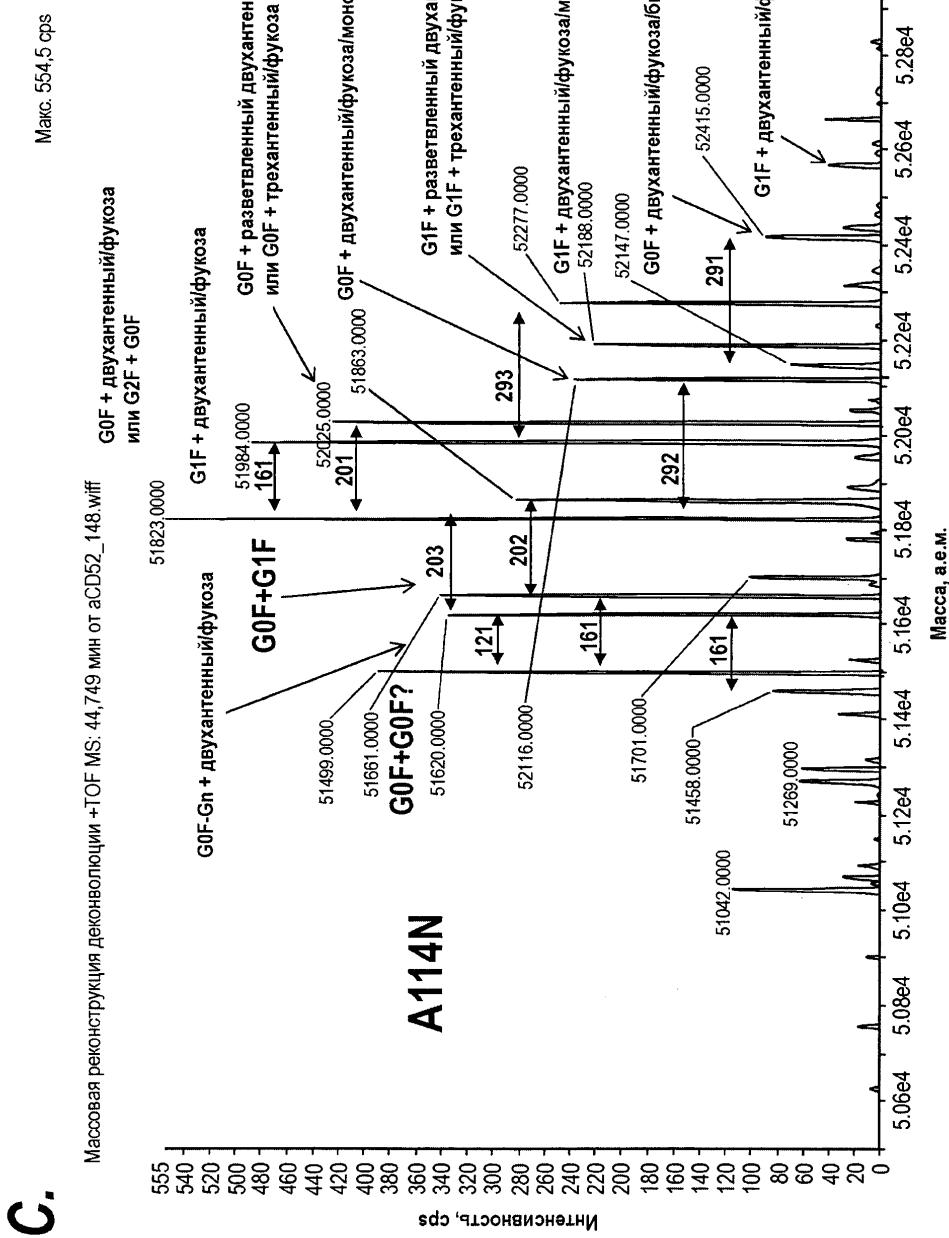
Фиг. 16

17/39

Образец	Kon (x106•M-1•c-1)	Koff (x10-2•c-1)	KD (нM)
WT 2C3	5.2	1.1	2.1
A114N	5.3	1.3	2.4

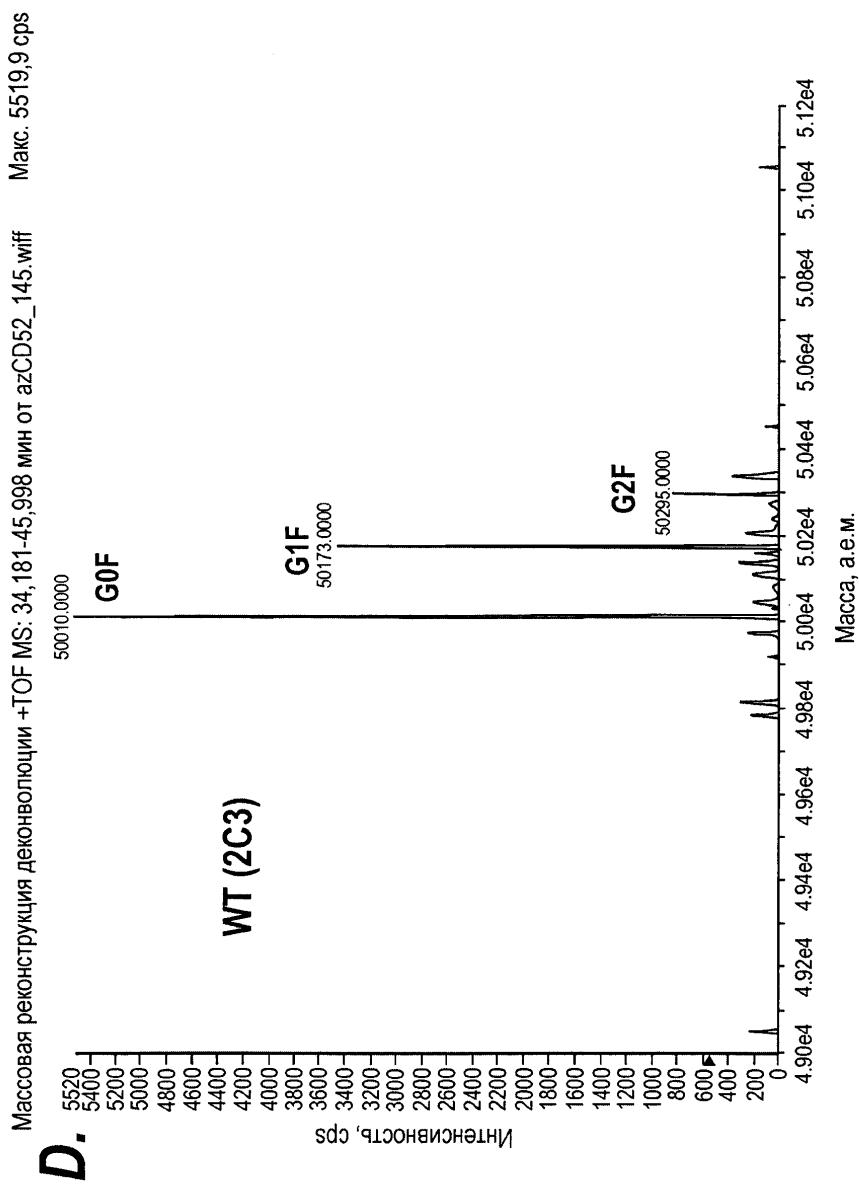
Фиг. 17





Фиг. 18 (продолжение)

20/39

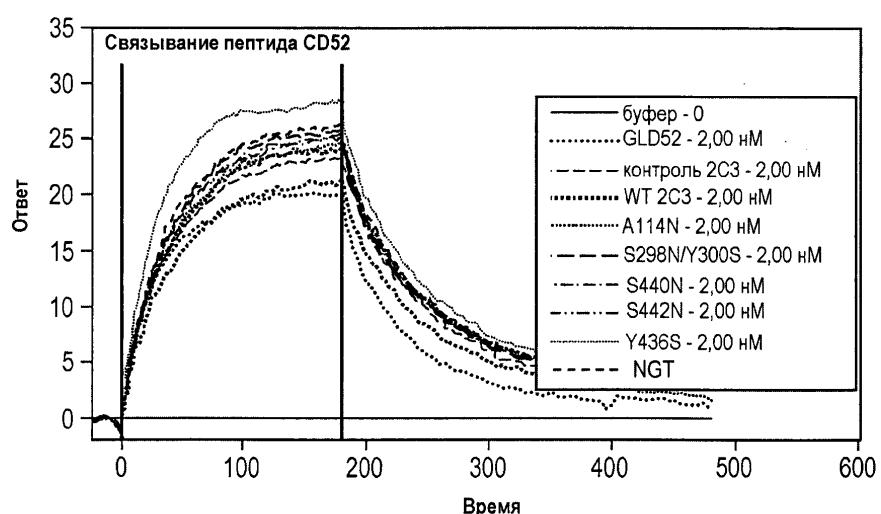


ФИГ. 18 (продолжение)

21/39

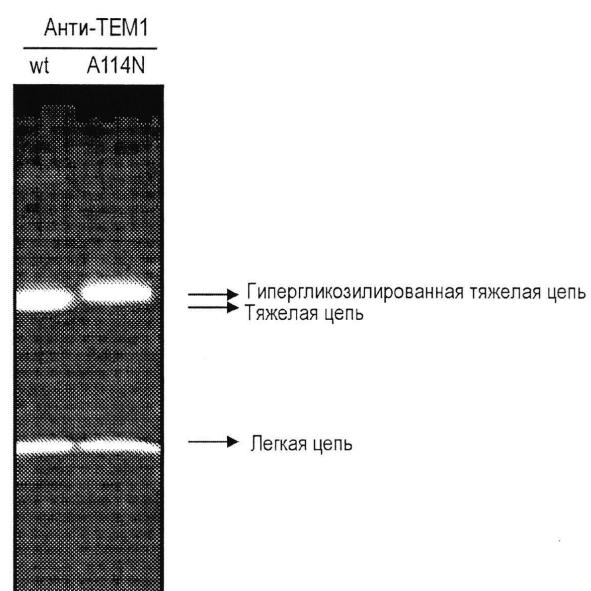
A.

Образец	партия #	Конц. по Octet (мкг/мл)
Среда после ложной трансфекции	11/23/2009	СЛИШКОМ НИЗКАЯ
wt 2C3	11/23/2009	2.54
A114N	11/23/2009	2.83
S298N/Y300S	11/23/2009	1.36
S440N	11/23/2009	1.32
S442N	11/23/2009	1.21
Y436S	11/23/2009	1.92
Y436T	11/23/2009	0.34
NGT	11/23/2009	1.90

B.

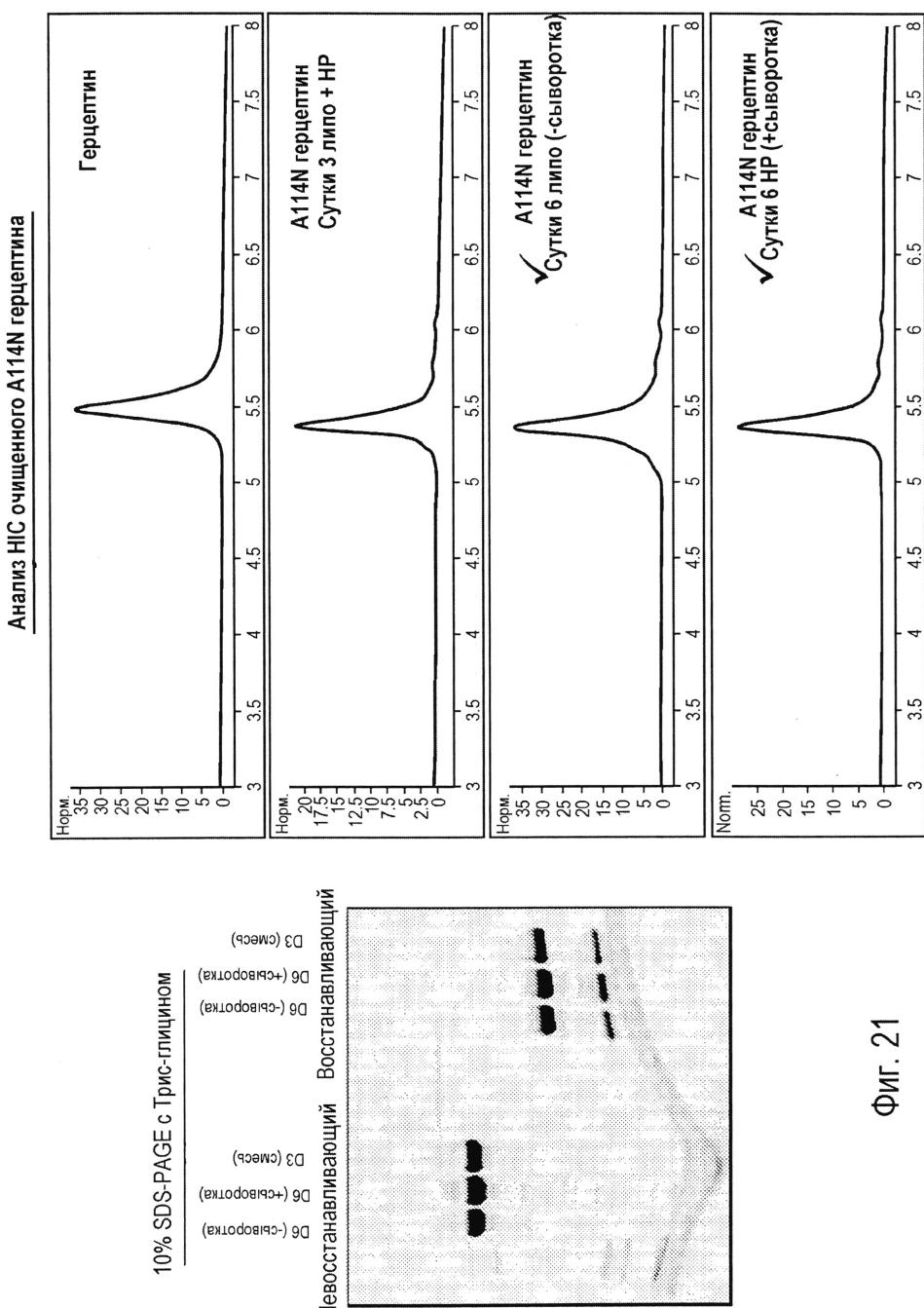
Фиг. 19

22/39



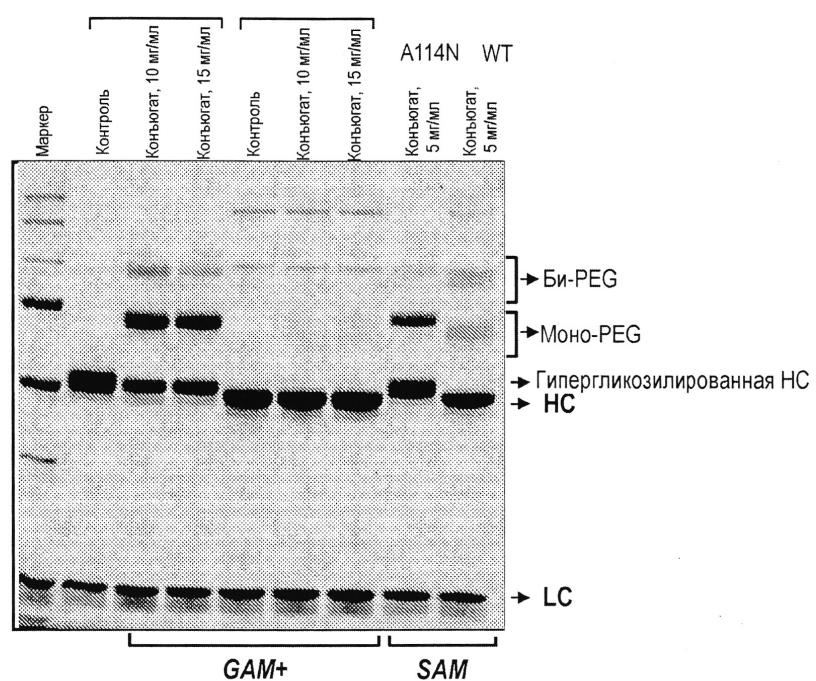
Фиг. 20

23/39

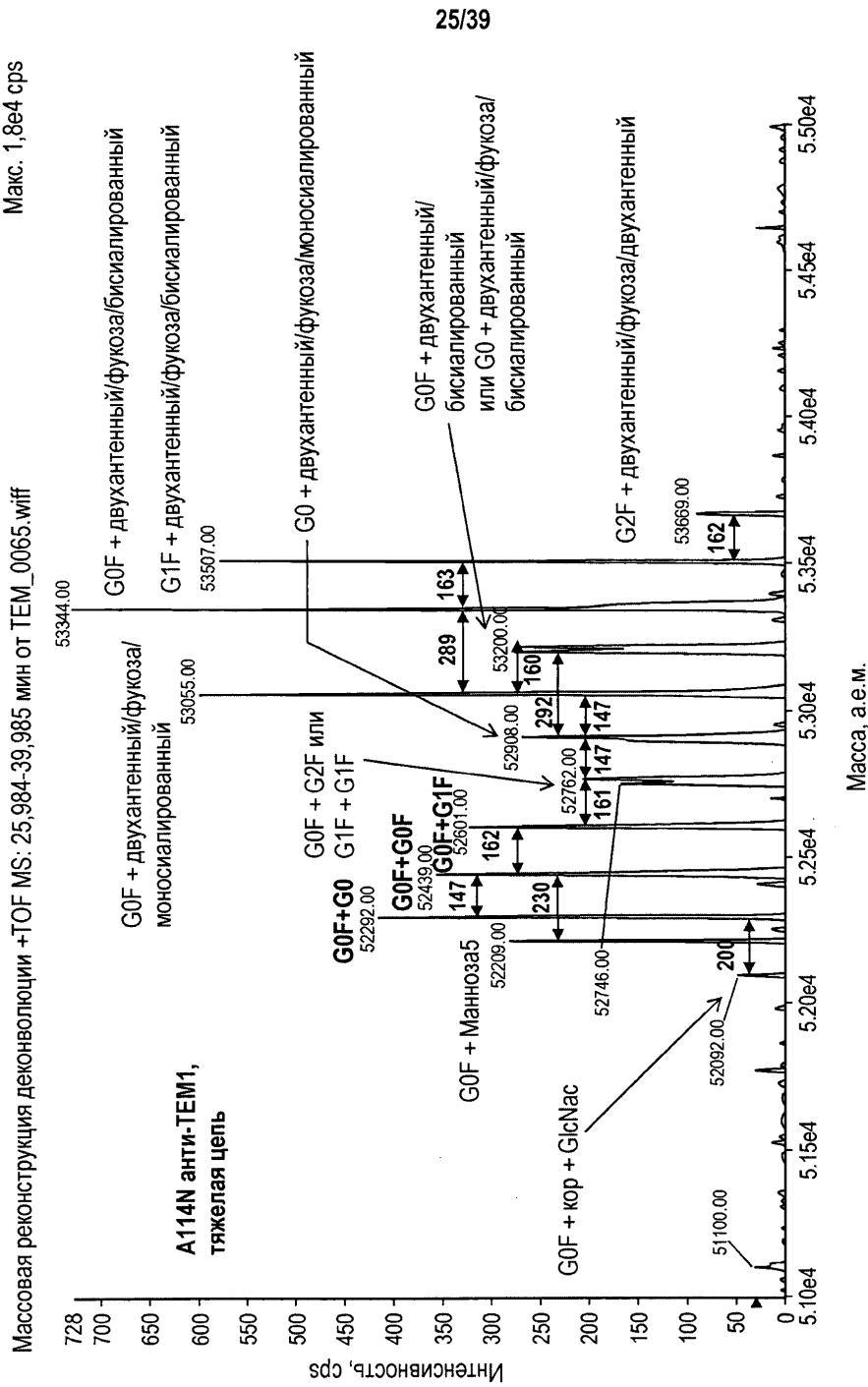


ФИГ. 21

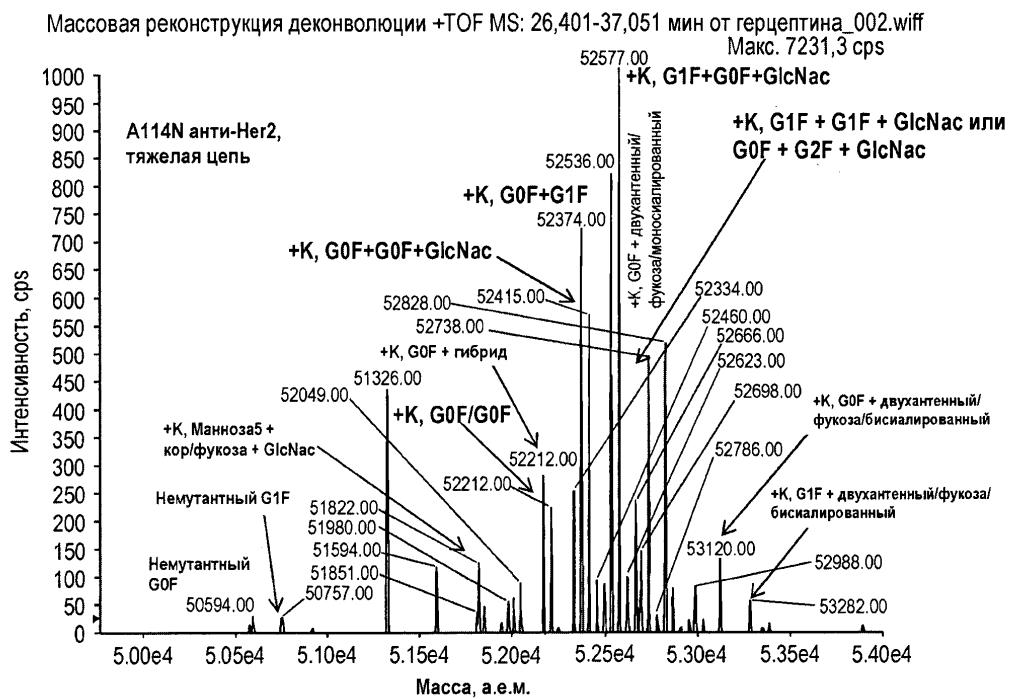
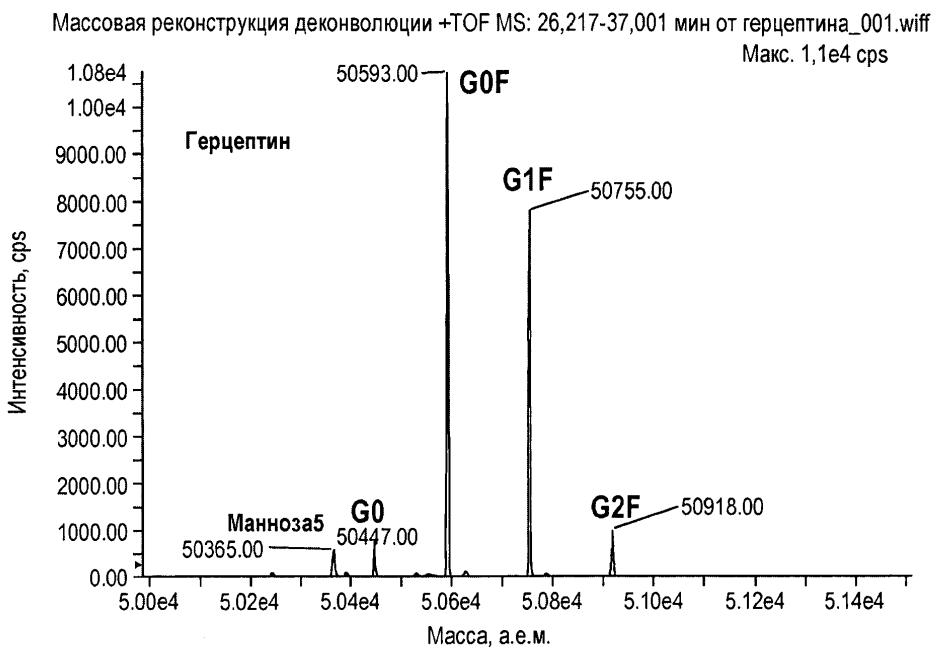
24/39



Фиг. 22



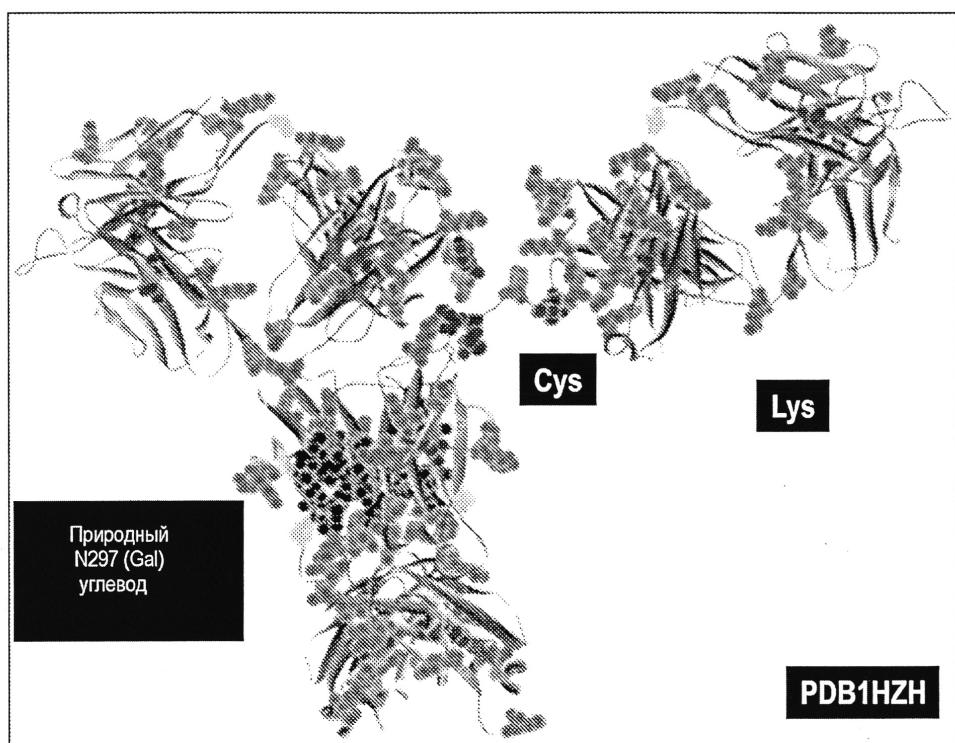
Фиг. 23



Фиг. 24

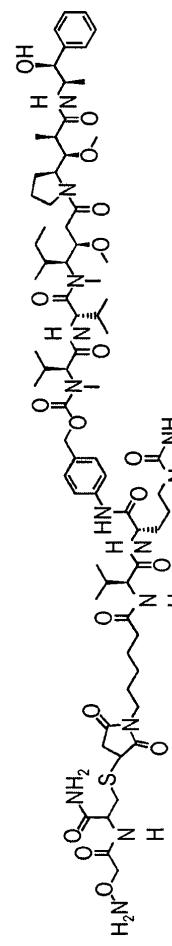
27/39

A.



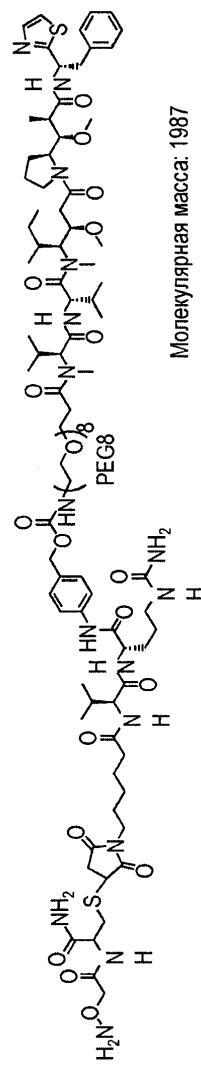
Фиг. 25

B.
Аминоокси-Cys-MC-VC-PABC-MMAE



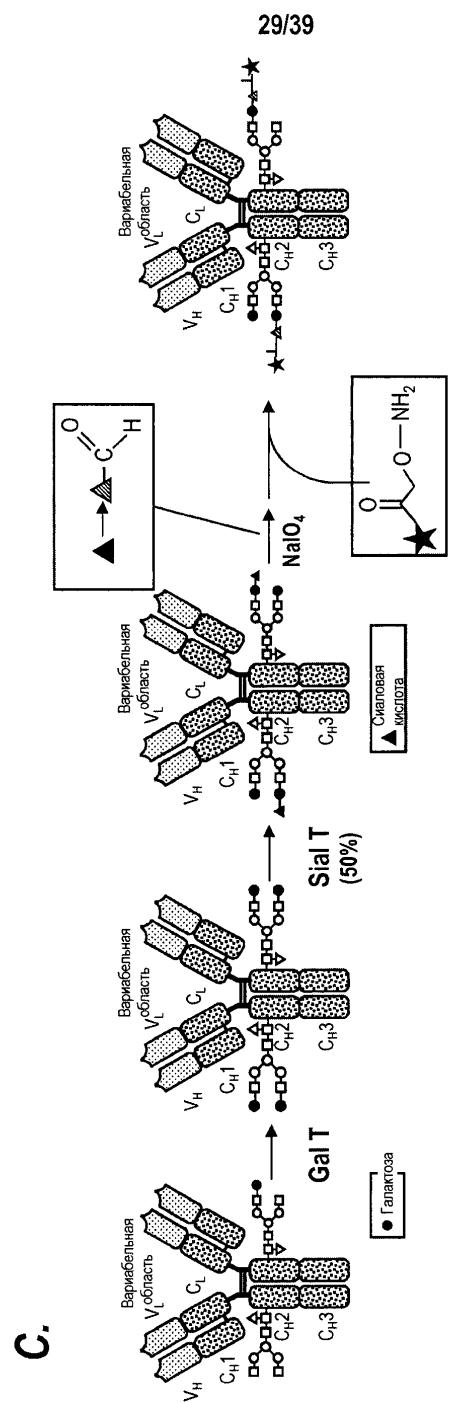
Молекулярная масса: 1510

Аминоокси-Cys-MC-VC-PABC-PEG8-Dol10



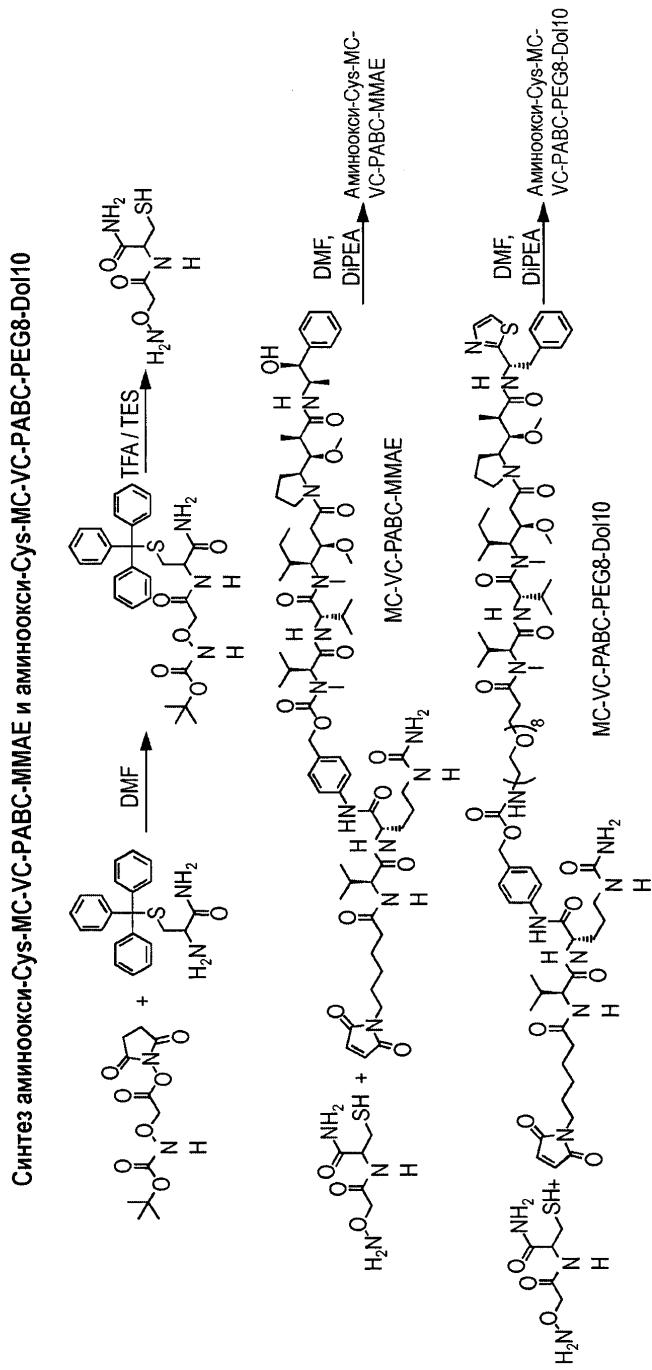
Молекулярная масса: 1987

Фиг. 25 (продолжение)

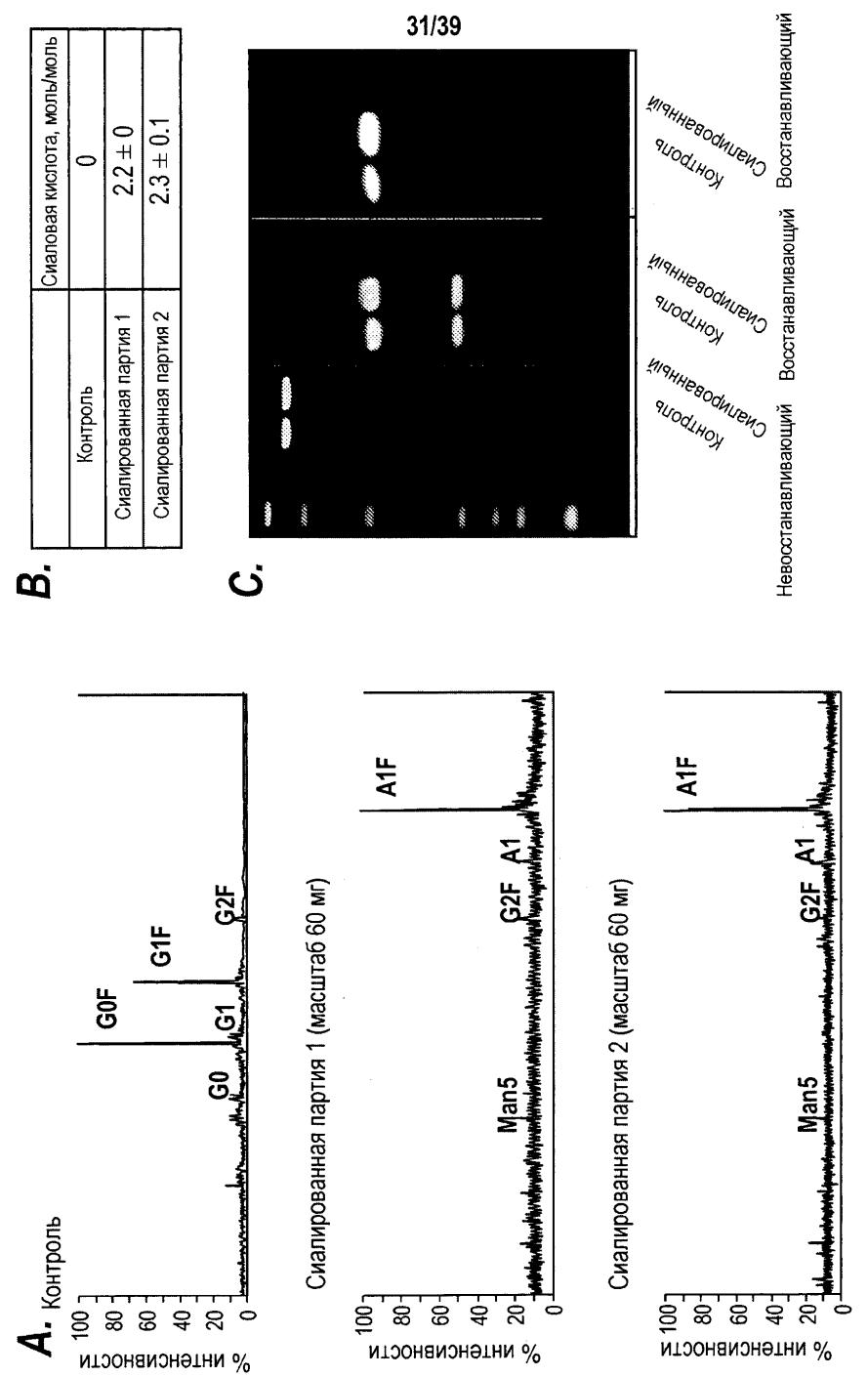


Фиг. 25 (продолжение)

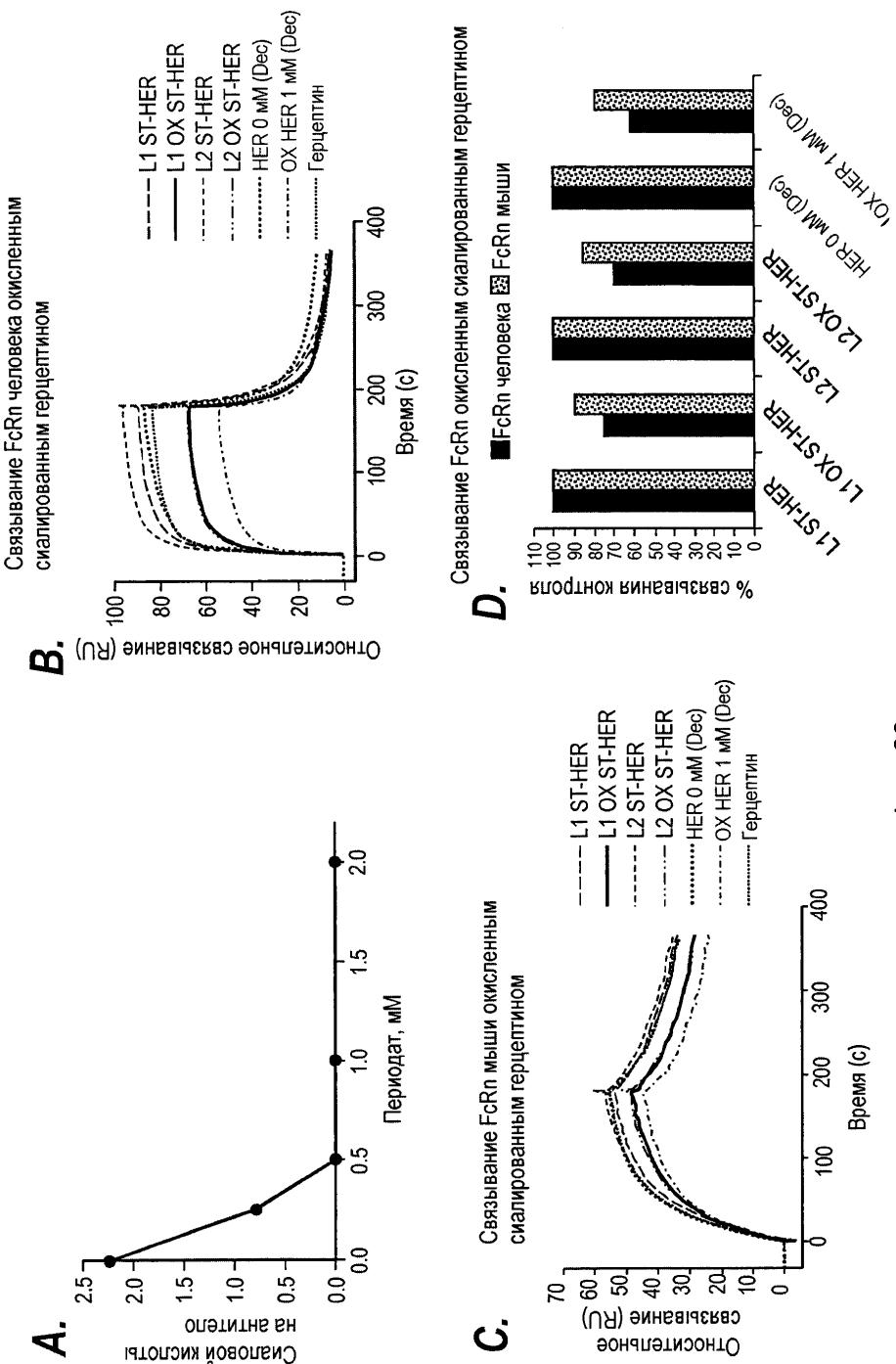
30/39



ФИГ. 26

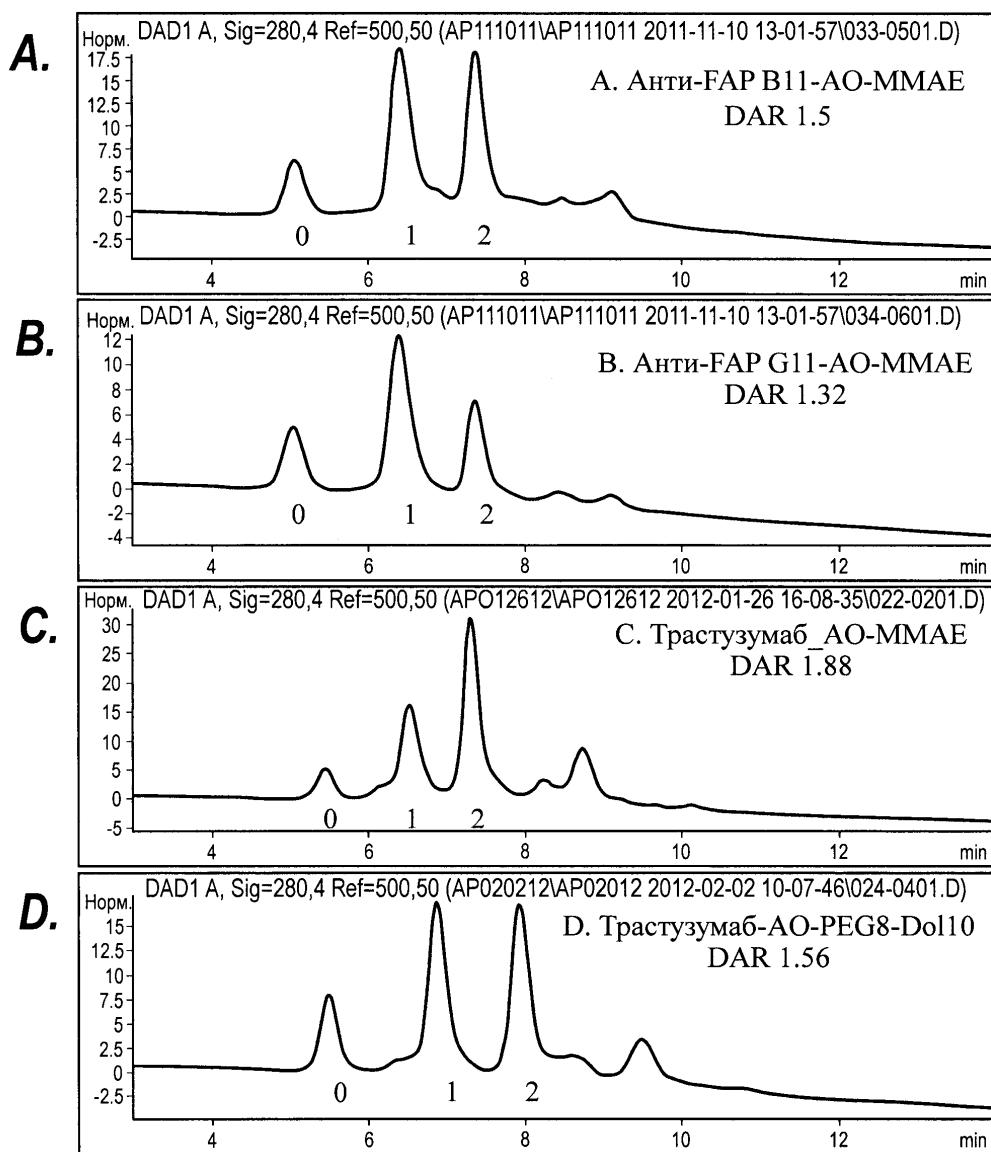


ФИГ. 27



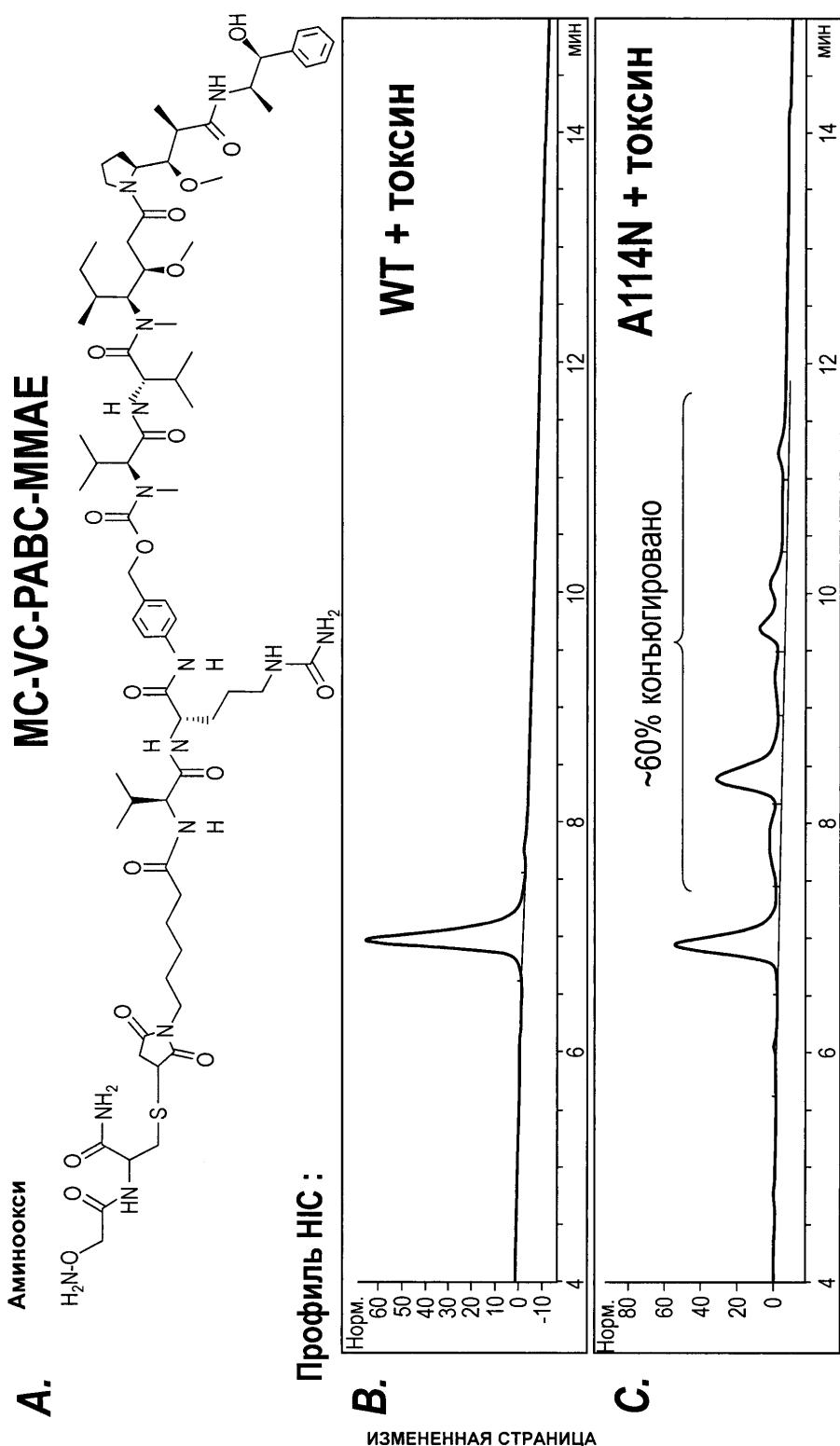
ФИГ. 28

33/39



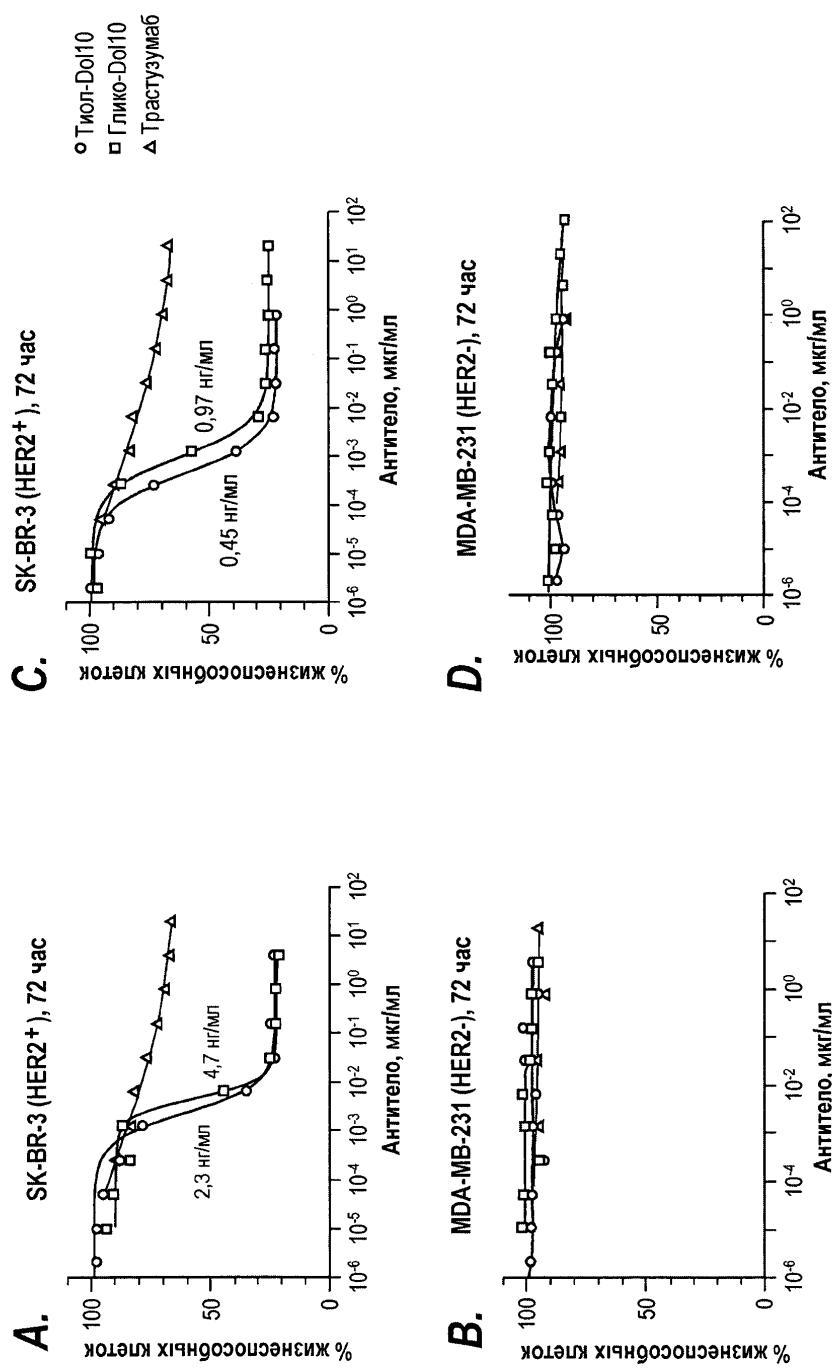
Фиг. 29

34/39



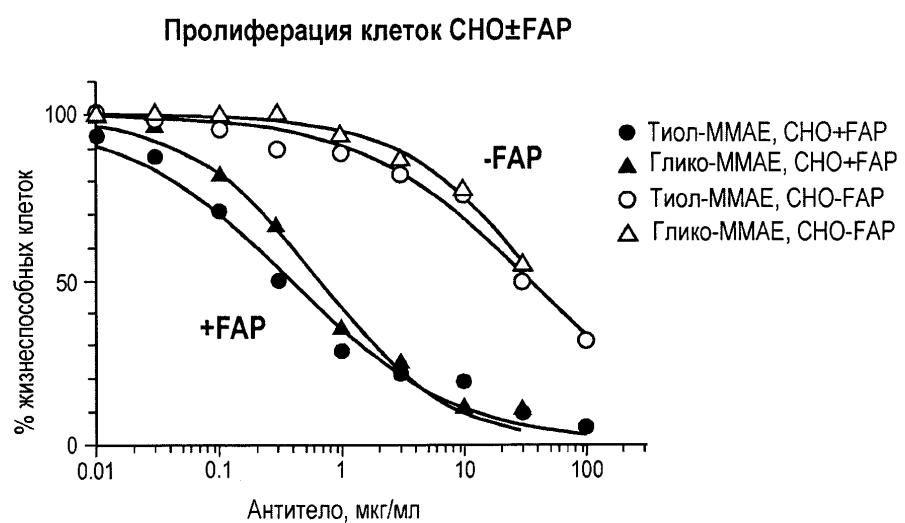
Фиг. 30

35/39

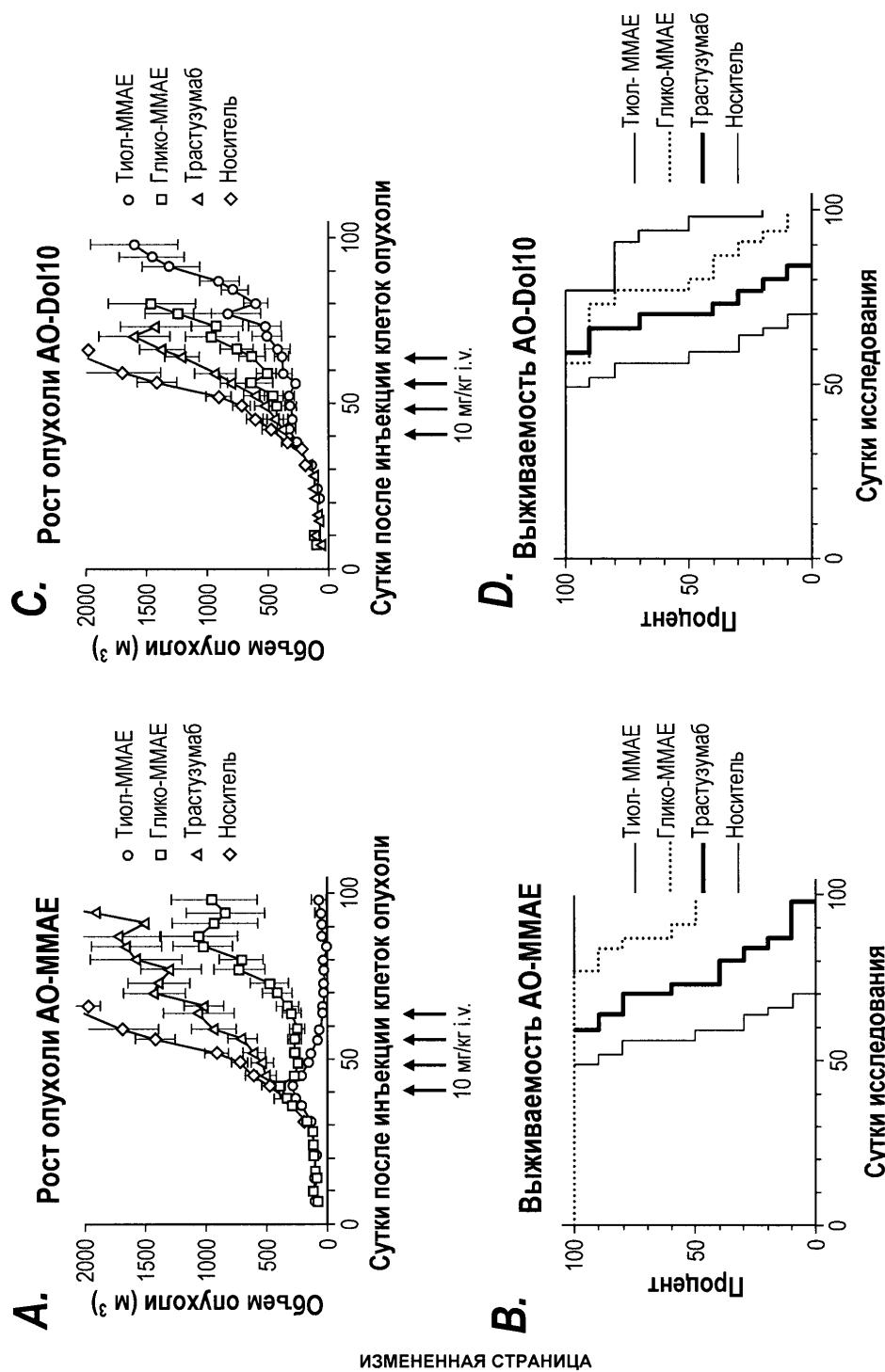


Фиг. 31

36/39

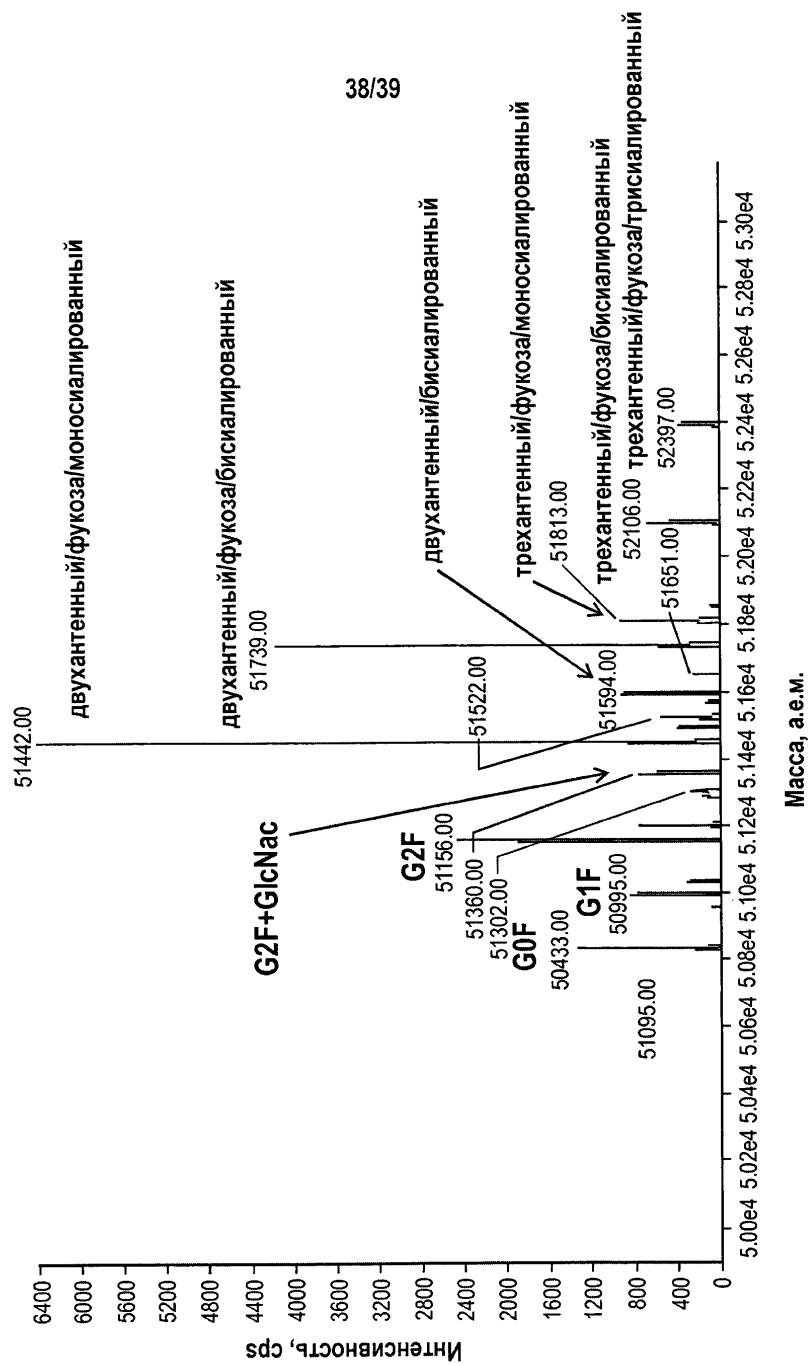


Фиг. 32



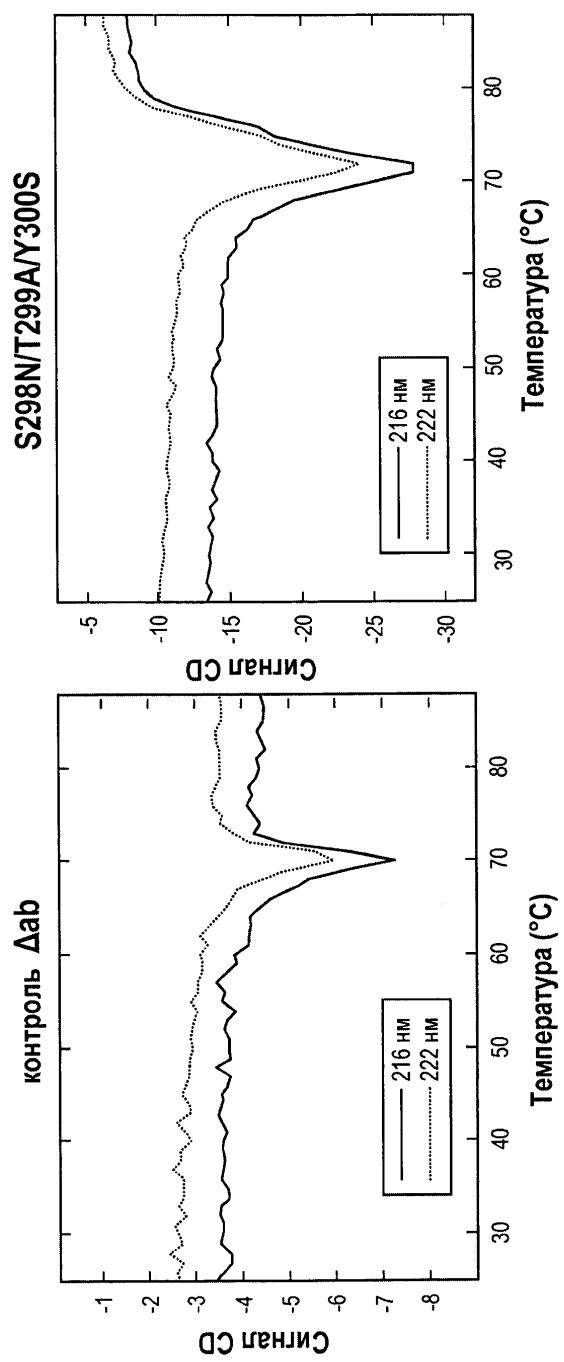
Фиг. 33

LC/MS тяжелой цепи S298N/T299A/Y300S (INNAs)



Фиг. 34

39/39



Фиг. 35