



(51) МПК
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 16/28 (2020.02); A61K 39/395 (2020.02); C07K 2317/565 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2019105648, 07.08.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
07.08.2017Дата регистрации:
07.07.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
05.08.2016 KR 10-2016-0100210;
07.08.2017 KR 10-2017-0099672

(45) Опубликовано: 07.07.2020 Бюл. № 19

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 05.03.2019(86) Заявка РСТ:
KR 2017/008494 (07.08.2017)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2018/026248 (08.02.2018)Адрес для переписки:
101000, Москва, ул. Мясницкая, 13, стр. 5, ООО
"Союзпатент", С.Б. Фелициной

(72) Автор(ы):

ПАК, Чэ Ын (KR),
КИМ, Су Юн (KR),
ЛИ, Хён Ми (KR),
ЛИ, Си Хён (KR),
ЛИ, Хён Кён (KR),
КИМ, Хие-Нан (KR),
ЮН, Чин Чуль (KR),
ПАК, Бум-чан (KR),
ЛИМ, Чон Чхэ (KR),
ЧО, Юн-Гиу (KR),
ПАК, Юн У (KR)

(73) Патентообладатель(и):

И-БАЙОЛОДЖИКС ИНК. (KR)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2008/156712 A1, 24.12.2008. WO
2015/036394 A1, 19.03.2015. US 2015/203579 A1,
23.07.2015. RU 2007/145419 A, 20.06.2009.
IWAMOTO, NORIKO, et al. "Validated LC-MS/
MS analysis of immune checkpoint inhibitor
nivolumab in human plasma using a Fab peptide-
selective quantitation method: nano-surface and
molecular-orientation limited (nSMOL) (см.
прод.)

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ БЕЛКА-1 ЗАПРОГРАММИРОВАННОЙ КЛЕТОЧНОЙ СМЕРТИ (PD-1) И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Данная группа изобретений относится к иммунологии. Представлены антитело против белка-1 запрограммированной клеточной смерти (PD-1) либо его антигенсвязывающий фрагмент, а также кодирующая нуклеиновая кислота, вектор, содержащий эту нуклеиновую кислоту, выделенная клетка, трансформированная этим вектором, способ получения указанного антитела либо его антигенсвязывающего фрагмента и

содержащая его композиция для профилактики или лечения рака. Антитело по данному изобретению способно связываться с PD-1 и ингибировать его активность, поэтому оно применимо для разработки иммунотерапевтических средств от различных заболеваний, связанных с PD-1. 6 н. и 5 з.п. ф-лы, 23 ил., 16 табл., 13 пр.

(56) (продолжение):

proteolysis." *Journal of Chromatography B*, 2016 (Available online 27April 2016), 1023: 9-16.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC
C07K 16/28 (2020.02); A61K 39/395 (2020.02); C07K 2317/565 (2020.02)

(21)(22) Application: **2019105648, 07.08.2017**

(24) Effective date for property rights:
07.08.2017

Registration date:
07.07.2020

Priority:

(30) Convention priority:
05.08.2016 KR 10-2016-0100210;
07.08.2017 KR 10-2017-0099672

(45) Date of publication: **07.07.2020 Bull. № 19**

(85) Commencement of national phase: **05.03.2019**

(86) PCT application:
KR 2017/008494 (07.08.2017)

(87) PCT publication:
WO 2018/026248 (08.02.2018)

Mail address:
101000, Moskva, ul. Myasnitskaya, 13, str. 5, OOO
"Soyuzpatent", S.B. Felitsinoj

(72) Inventor(s):

PARK, Jae Eun (KR),
KIM, Soo Young (KR),
LEE, Hyun Mi (KR),
LEE, Si Hyung (KR),
LEE, Hyun Kyung (KR),
KIM, Hye-Nan (KR),
YOUN, Jin Chul (KR),
PARK, Bum-chan (KR),
LIM, Jung Chae (KR),
CHO, Young-Gyu (KR),
PARK, Young Woo (KR)

(73) Proprietor(s):

Y-BIOLOGICS INC. (KR)

(54) **PROGRAMMED CELL DEATH (PD-1) PROTEIN-1 ANTIBODIES AND USE THEREOF**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: present group of inventions refers to immunology. What is presented is an anti-protein-1 antibody programmed cell death (PD-1) or its antigen-binding fragment, as well as a coding nucleic acid, a vector containing said nucleic acid, an isolated cell transformed with said vector, a method of producing

said antibody or its antigen-binding fragment and a composition thereof for preventing or treating cancer.

EFFECT: antibody according to the invention is able to bind to PD-1 and inhibit its activity, therefore it is applicable for development of immunotherapeutic agents against various diseases associated with PD-1.

11 cl, 23 dwg, 16 tbl, 13 ex

RU 2 725 950 C1

RU 2 725 950 C1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение касается антител против белка-1 запрограммированной клеточной смерти (PD-1), либо их антигенсвязывающих фрагментов, кодирующих их нуклеиновых кислот, векторов, содержащих эти нуклеиновые кислоты, выделенных 5 клеток, трансформированных этими векторами, способа получения антител либо их антигенсвязывающих фрагментов и содержащих их композиций для профилактики или лечения рака.

Уровень техники

Химиотерапевтические противораковые препараты первого поколения и целевые 10 противораковые препараты второго поколения, которые широко применяются в настоящее время, имеют проблемы с побочными эффектами из-за токсичности противораковых средств, высокого риска лекарственной устойчивости и ограниченности в том, что их можно назначать только пациентам, имеющим специфические генные мутации. Иммунные противораковые препараты (иммуноонкологические средства), 15 которые называют “противораковыми препаратами третьего поколения”, преодолевают эти проблемы, действуя на сигнальные пути иммунных клеток и активируя их, тем самым атакуя раковые клетки и обеспечивая при этом терапевтические эффекты. В отличие от традиционных противораковых препаратов, иммунные противораковые препараты могут применяться при различных заболеваниях, включая рак, с тем чтобы 20 лечить заболевания с помощью иммунной системы человека, причем отмечается, что они вызывают меньше побочных эффектов, чем традиционные противораковые препараты.

PD-1 (также известный как “CD279”) представляет собой рецепторный белок в 55 кД, связанный с семейством костимулирующих/ингибирующих рецепторов CD28/CTLA4 25 (Blank et al., 2005 Cancer Immunol Immunother. 54: 307-314).

Его характеристики изучают на мышах и людях путем клонирования гена и кДНК, кодирующей PD-1 (Ishida et al., 1992 EMBO J. 11: 3887-3395; Shinohara et al., 1994 Genomics 23: 704-706). Полноразмерный PD-1 содержит 288 аминокислотных остатков (номер 30 доступа в NCBI: NP_005009). Внеклеточный домен состоит из аминокислотных остатков 1-167, а цитоплазматический С-концевой участок содержит аминокислотные остатки 191-288, которые содержат два гипотетических иммунорегуляторных мотива, а именно ингибиторный мотив иммунорецептора на основе тирозина (ITIM; Vivier et al. al., 1997 Immunol Today 18: 286-291) и мотив тирозинового переключателя иммунорецептора (ITSM; Chemnitz et al., 2004 J Immunol 173: 945-954).

К настоящему времени известно, что с PD-1 специфически взаимодействуют два 35 родственных по последовательности лиганда, PD-L1 (B7-H1) и PD-L2 (B7-DC), вызывая внутриклеточную передачу сигналов и ингибируя опосредованную CD3 и CD28 активацию Т-клеток (Riley, 2009 Immunol Rev. 229: 114-125), которая в конечном счете регулирует активность Т-клеток, например, снижает секрецию других факторов роста 40 и цитокинов, а также рост клеток и секрецию IL-2 и IFN-γ.

Экспрессия PD-1 часто встречается в таких иммунных клетках, как Т-клетки, В-клетки, мононуклеары и клетки естественных киллеров (NK), но почти не экспрессируется в других тканях человека типа мышц, эпителия и нервной ткани. Кроме того, высокие уровни экспрессии PD-1 часто связаны с активностью иммунных клеток. 45 Например, при активации Т-клеточной линии Jurkat человека с помощью РНА (фитогемагглютинаина) или ТРА (12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетата) усиливается экспрессия PD-1, как это видно при Вестерн-блоттинге. Такое же явление наблюдалось на стимулированных Т- и В-лимфоцитах мыши и первичных Т-клетках CD4+ человека

при стимуляции антителом против CD3. Повышение экспрессии PD-1 вызывает стимуляцию эффекторных Т-клеток и ведет активированные эффекторные Т-клетки в направлении истощенной и пониженной иммунной активации. Таким образом, опосредованные PD-1 ингибиторные сигналы играют ключевую роль в

5 иммунотолерантности.

Повышение экспрессии PD-1 в инфильтрирующих опухоли лимфоцитах (TILs) и экспрессии лигандов PD-1 в опухолевых клетках отмечалось при различных раковых заболеваниях и отмечалось и в других типах тканей и органов, включая легкие, печень, желудок, молочные железы, яичники, поджелудочную железу, меланоциты и пищевод.

10 Чаще всего экспрессия PD-1 и PD-L1 при таких раковых заболеваниях связана с плохим прогнозом по выживаемости пациентов. Важность сигнального пути PD-1 по регуляции иммунной системы для устранения рака или толерантности к раку была более подробно описана на трансгенных мышах, у которых при нокауте генов PD-1 ингибируется рост

клеток раковых ксенотрансплантатов.

15 Повышающая регуляция сигнализации PD-1 приводит к иммунотолерантной пролиферации рака, а также к вирусным инфекциям и метастазированию у человека. Пандемический вирус гепатита В, HBV и HCV индуцируют гиперэкспрессию лигандов PD-1 в гепатоцитах и активируют сигнализацию PD-1 в эффекторных Т-клетках, что ведет к истощению Т-клеток и толерантности к вирусной инфекции. Точно так же ВИЧ-

20 инфекция зачастую избегает иммунной системы человека по аналогичному механизму. Сигнализацию PD-1 можно терапевтически модулировать при помощи антагонистических молекул с тем, чтобы иммунные клетки могли излечиться от толерантности и реактивироваться для устранения рака и хронических вирусных инфекций.

25 Ниволумаб и пембролизумаб, которые являются моноклональными антителами, известны как лекарственные средства, нацеленные на PD-1, и применяются в качестве терапевтических средств при злокачественной меланоме и немелкоклеточном раке легких. Однако сообщалось, что эти препараты ложатся огромным финансовым бременем на пациентов из-за высокой стоимости, и требуется их точная проверка.

30 Следовательно, существует острая потребность в разработке новых терапевтических средств, нацеленных на PD-1, которые могут преодолеть ограниченность традиционных препаратов.

На этом техническом фоне авторы настоящего изобретения приложили усилия для разработки антител для лечения рака, которые специфически связываются с PD-1. В

35 результате они разработали антитела против PD-1, которые связываются с высоким сродством с PD-1, используя технологию фагового дисплея, и обнаружили, что такие антитела против PD-1 могут значительно ингибировать образование комплекса PD-1/PD-L1, и тем самым совершили настоящее изобретение.

Сущность изобретения

40 Техническая проблема

Итак, одной из целей настоящего изобретения является получение новых антител к PD-1 либо их антигенсвязывающих фрагментов.

Другой целью настоящего изобретения является получение нуклеиновых кислот, кодирующих эти антитела либо их антигенсвязывающие фрагменты.

45 Другой целью настоящего изобретения является создание вектора, включающего нуклеиновую кислоту, рекомбинантной клетки, в которую вводится вектор, и способ ее получения.

Еще одной целью настоящего изобретения является получение композиций для

профилактики или лечения рака, содержащих эти антитела либо их антигенсвязывающие фрагменты.

Техническое решение

В соответствии с настоящим изобретением, вышеуказанные и другие цели могут
5 быть достигнуты путем получения антител, связывающихся с PD-1, либо их антиген-
связывающего фрагмента, содержащих: переменную область тяжелой цепи,
включающую CDR1 тяжелой цепи, включающего последовательность на 90% или более
идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из
10 последовательностей, приведенных в SEQ ID NOs: 1-30, CDR2 тяжелой цепи,
включающего последовательность на 90% или более идентичную последовательности,
выбранной из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NOs:
31-56, и CDR3 тяжелой цепи, включающего последовательность на 90% или более
идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из
15 последовательностей, приведенных в SEQ ID NOs: 57-79; и переменную область легкой
цепи, содержащую CDR1 легкой цепи, включающего последовательность на 90% или
более идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из
последовательностей, приведенных в SEQ ID NOs: 198-222, CDR2 легкой цепи,
включающего последовательность на 90% или более идентичную последовательности,
выбранной из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NOs:
20 223-241, и CDR3 легкой цепи, включающего последовательность на 90% или более
идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из
последовательностей, приведенных в SEQ ID NOs: 242-269.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предусмотрены
25 нуклеиновые кислоты, кодирующие данные антитела или антигенсвязывающие
фрагменты.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предусмотрены
экспрессионные векторы, содержащие данные нуклеиновые кислоты.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предусмотрены клетки,
трансформированные данным экспрессионный вектором.

30 В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предусмотрен способ
получения антител либо их антигенсвязывающих фрагментов, включающий (а)
культивирование клеток и (b) извлечение антител либо их антигенсвязывающих
фрагментов из культивированной клетки.

В соответствии с другим аспектом настоящего изобретения предусмотрены
35 композиции для профилактики или лечения рака, содержащие в качестве активного
ингредиента данные антитела либо их антигенсвязывающие фрагменты.

Краткое описание фигур

40 Вышеуказанные и другие цели, особенности и другие преимущества настоящего
изобретения станут более понятными из следующего подробного описания в сочетании
с прилагаемыми чертежами.

На фиг. 1 представлена схематическая диаграмма экспрессионного PD-1 вектора,
содержащего Fc человека или Fc мыши, слитый с его карбоксильным концом.

На фиг. 2A-D представлены результаты по очистке белка PD-1, а именно:

на фиг. 2A представлены результаты по идентификации белка в отношении PD1-hFc
45 в 10% геле SDS-PAGE в восстановительных (RE) и невосстановительных (NR) условиях;

на фиг. 2B представлены результаты по SEC-HPLC в G-3000 SWXL при скорости
потока 1 мл/мин с использованием PBS в качестве рабочего растворителя;

на фиг. 2C представлены результаты по идентификации белка в отношении PD1-mFc

в 10% геле SDS-PAGE в восстановительных (RE) и невосстановительных (NR) условиях; на фиг. 2D представлены результаты по SEC-HPLC в G-3000 SWXL при скорости потока 1 мл/мин с использованием PBS в качестве рабочего растворителя.

На фиг. 3 представлена способность антител к связыванию с PD-1 в зависимости от количества раундов пэннинга.

На фиг. 4 представлены результаты по ELISA для измерения способности монофагов к связыванию с PD1-His.

На фиг. 5 представлены результаты анализа SDS-PAGE для определения чистоты антител к PD-1.

На фиг. 6 представлены результаты по оценке эффективности антител к PD-1 *in vitro*.

На фиг. 7 представлены результаты по оценке зависимой от концентрации эффективности антител к PD-1 *in vitro*.

На фиг. 8 представлена способность антител к зависимому от концентрации связыванию с PD-1 человека, гиперэкспрессированным на клеточной поверхности, на основании средней интенсивности флуоресценции (MFI).

На фиг. 9 представлены результаты по измерению кинетики связывания между PD1-hFc и антителами 45D6 и 49A2 к PD1.

На фиг. 10 представлены результаты скрининга при оптимизации моноклонов.

На фиг. 11 представлен сравнительный анализ степени экспрессии между антителами к PD1 и исходным антителом.

На фиг. 12 представлены результаты по оценке эффективности *in vitro* в отношении антител к PD1 по настоящему изобретению.

На фиг. 13 представлены результаты по оценке зависимой от концентрации эффективности *in vitro* антител к PD1 по настоящему изобретению.

На фиг. 14 представлены результаты по идентификации моноклональных антител в отношении связывания выбранных вариантов антител к PD1 с PD-1, экспрессированным на клеточной поверхности.

На фиг. 15 представлены результаты по измерению способности выбранных вариантов антител к PD1 к связыванию с PD-1, экспрессированным на клеточной поверхности.

На фиг. 16 представлены результаты по идентификации при иммуноадсорбции фермента в отношении ингибирующей активности выбранных антител по предотвращению образования комплекса PD-1/PD-L1 или PD-1/PD-L2.

На фиг. 17 представлены результаты по измерению кинетики связывания между белком PD1-hFc и антителами 45D6, 49A2 и 49A2 (2B9).

На фиг. 18 представлена схематическая диаграмма мутантов PD1.

На фиг. 19 представлены результаты по идентификации при иммуноадсорбции фермента в отношении способности выбранных фагов к связыванию с мутантами PD-1, причем при снижении способности к связыванию уменьшается и соответствующая величина.

На фиг. 20 представлены результаты по идентификации при иммуноадсорбции фермента в отношении способности выбранных антител к связыванию с мутантами PD-1.

На фиг. 21 представлены результаты по идентификации при иммуноадсорбции фермента в отношении специфичности связывания.

На фиг. 22 представлены результаты по сравнению продуктивности после краткосрочной экспрессии в клетках HEK293.

На фиг. 23 представлены результаты по идентификации в отношении повышения

активности под действием моноклональных антител к PD1 при гетерогенной MLR (реакции смешанных лимфоцитов).

Раскрытие сущности изобретения

Если не указано иначе, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такие же значения, как те, которые известны специалистам в той области, к которой относится настоящее изобретение. В общем, используемая здесь номенклатура хорошо известна в данной области, обычно она и применяется.

В одном аспекте настоящее изобретение направлено на антитела, связывающиеся с PD-1, либо их антигенсвязывающий фрагмент, содержащее: переменную область тяжелой цепи, включающую CDR1 тяжелой цепи, включающего последовательность на 90% или более идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NOs: 1-30, CDR2 тяжелой цепи, включающего последовательность на 90% или более идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NOs: 31-56, и CDR3 тяжелой цепи, включающего последовательность на 90% или более идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NOs: 57-79; и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи, включающего последовательность на 90% или более идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NOs: 198-222, CDR2 легкой цепи, включающего последовательность на 90% или более идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NOs: 223-241, и CDR3 легкой цепи, включающего последовательность на 90% или более идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NOs: 242-269.

Авторы настоящего изобретения приложили усилия для разработки антител для химиотерапии, связывающихся с PD-1, который, как известно, экспрессируется при различных формах рака. В результате авторы изобретения получили антитела против PD-1, которые связываются с PD-1 с высоким сродством, используя технологию фагового дисплея, и обнаружили, что такие антитела против PD-1 могут ингибировать активность PD-1.

В настоящем изобретении понятие “белок-1 запрограммированной клеточной смерти (PD-1)” означает сигнальный белок, который функционирует для регуляции активации и функций Т-клеток. При связывании PD-1 из Т-клеток со своим лигандом PD-L1, который экспрессируется в раковых клетках, в микроокружении опухоли активируется сигнальный путь PD-1, который затем индуцирует инактивацию Т-клеток. Это явление встречается при различных формах рака, как-то злокачественной меланоме, немелкоклеточном раке легких и раке почек.

В настоящем изобретении термин “антитело” означает антитело против PD-1, которое специфически связывается с PD-1. В рамки настоящего изобретения входят не только полные антитела, специфически связывающиеся с PD-1, но также и антигенсвязывающий фрагмент молекулы антитела.

Полное антитело означает структуру, содержащую две полноразмерные легкие цепи и две полноразмерные тяжелые цепи, причем каждая легкая цепь связана с соответствующей тяжелой цепью дисульфидной связью. Константная область тяжелой цепи бывает типа гамма (γ), мю (μ), альфа (α), дельта (δ) или эпсилон (ϵ) и подразделяется на гамма-1 ($\gamma 1$), гамма-2 ($\gamma 2$), гамма-3 ($\gamma 3$), гамма-4 ($\gamma 4$), альфа-1 ($\alpha 1$) и альфа-2 ($\alpha 2$). Константная область легкой цепи бывает типа каппа (κ) и лямбда (λ).

Антигенсвязывающий фрагмент антитела или же фрагмент антитела означает такой фрагмент, который по меньшей мере обладает способностью к связыванию антигена, и охватывает Fab, F(ab'), F(ab')₂ и Fv. Из всех фрагментов антител Fab означает структуру, включающую переменную область каждой из тяжелых и легких цепей, константный домен легкой цепи и первый константный домен (C_{H1}) тяжелой цепи, каждый из которых содержит один антигенсвязывающий сайт. Fab' отличается от Fab тем, что он дополнительно включает шарнирный участок, содержащий по меньшей мере один остаток цистеина на С-конце домена C_{H1} тяжелой цепи. F(ab')₂ образуется по дисульфидной связи между остатками цистеина в шарнирном участке Fab'. Fv – минимальный фрагмент антитела, содержащий только переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, а рекомбинантная технология получения Fv изложена в таких международных публикациях РСТ, как WO 88/01649, WO 88/06630, WO 88/07085, WO 88/07086 и WO 88/09344. Двухцепочечный Fv представляет собой фрагмент, в котором переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи связаны нековалентной связью, а одноцепочечный Fv представляет собой фрагмент, в котором переменная область тяжелой цепи и переменные области легкой цепи обычно связаны ковалентной связью через пептидный линкер или непосредственно связаны на С-конце, образуя димероподобную структуру типа двухцепочечного Fv. Такие фрагменты антител могут быть получены с помощью протеаз (например, Fabs могут быть получены путем рестрикционного расщепления всего антитела папаином, а F(ab')₂-фрагмент может быть получен путем рестрикционного расщепления всего антитела пепсином), а также могут быть получены методами генетической рекомбинации.

В одном воплощении антитело по настоящему изобретению представлено в виде Fv (к примеру, scFv), Fab или полного антитела. Кроме того, константная область тяжелой цепи может быть выбрана из изоформ, состоящих из гамма (γ), мю (μ), альфа (α), дельта (δ) или эpsilon (ε). Например, константная область может быть типа гамма-1 (IgG1), гамма-3 (IgG3) или гамма-4 (IgG4). Константная область легкой цепи может быть типа каппа или лямбда.

В настоящем изобретении термин “тяжелая цепь” охватывает как полноразмерную тяжелую цепь, которая включает переменный домен (V_H), аминокислотная последовательность которого содержит достаточную последовательность переменной области для придания специфичности к антигену, и три константных домена (C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}), так и её фрагмент. В настоящем изобретении термин “легкая цепь” охватывает как полноразмерную легкую цепь, которая включает переменный домен (V_L), содержащий аминокислотную последовательность, содержащую достаточную последовательность переменной области для придания специфичности к антигену, и константный домен (C_L), так и её фрагменты.

Антитела по настоящему изобретению включают, без ограничения, моноклональные антитела, мультиспецифичные антитела, человеческие антитела, гуманизованные антитела, химерные антитела, короткоцепочечные Fv (scFv), короткоцепочечные антитела, Fab-фрагменты, F(ab')-фрагменты, связанные дисульфидными связями Fv (sdFVs), антиидиотипические (анти-Id) антитела или же эпитоп-связывающие фрагменты таких антител и т.п.

Моноклональные антитела означают одинаковые антитела, исключая возможные природные мутации, причем антитела получены из популяции практически однородных

антител, то есть каждое антитело, составляющее эту популяцию, может присутствовать в незначительном количестве. Моноклональные антитела очень специфичны и вырабатываются против одного антигенного сайта.

5 Нечеловеческие (например, мышинные) антитела “гуманизованной” формы представляют собой химерные антитела, содержащие минимальную последовательность, происходящую не из иммуноглобулина человека. В большинстве случаев гуманизованные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (антитела-реципиенты), у которых остатки из гипервариабельной области реципиента заменены на остатки из гипервариабельной области другого вида, чем человек (донора), как-то
10 мыши, крысы, кролика или приматов, отличных от человека, обладающие требуемой специфичностью, сродством и способностью.

Термин “человеческое антитело” обозначает молекулы, происходящие из иммуноглобулина человека, у которых все аминокислотные последовательности, составляющие антитело, включая определяющие комплементарность участки и
15 структурные участки, состоят из иммуноглобулина человека.

Некоторые части тяжелой цепи и/или легкой цепи идентичны или гомологичны соответствующей последовательности у антител, происходящих из определенного вида или принадлежащих к определенному классу или подклассу антител, тогда как остальные части включают “химерные” антитела (иммуноглобулины), которые идентичны или
20 гомологичны соответствующим последовательностям у антител, происходящих из другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, проявляющие требуемую биологическую активность.

В настоящем изобретении термин “вариабельный домен антитела” относится к областям легкой и тяжелой цепи молекул антител, включающим аминокислотные
25 последовательности определяющих комплементарность участков (CDR; т.е. CDR1, CDR2 и CDR3) и каркасной области (FR). V_H означает вариабельный домен тяжелой цепи. V_L означает вариабельный домен легкой цепи.

Термин “определяющий комплементарность участок” (CDR; т.е. CDR1, CDR2 и CDR3)
30 относится к таким аминокислотным остаткам вариабельного домена антител, которые необходимы для связывания антигена. Каждый вариабельный домен обычно содержит три участка CDR, обозначаемые как CDR1, CDR2 и CDR3.

В настоящем изобретении антитела, связывающиеся с PD-1, либо их антигенсвязывающие фрагменты содержат:

35 вариабельную область тяжелой цепи, включающую:
CDR1 тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 1-30;
CDR2 тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 31-56; и
CDR3 тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 57-79;
а также вариабельную область легкой цепи, включающую:
40 CDR1 легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 198-222;
CDR2 легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 223-241; и
CDR3 легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 242-269.

В частности, антитела, связывающиеся с PD-1, либо их антигенсвязывающие фрагменты содержат:

45 вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR1 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 31 и CDR3 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 57;
вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR1 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 32 и CDR3 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 58;
вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR1 тяжелой цепи по SEQ ID

213, CDR2 легкой цепи по SEQ ID NO: 230 и CDR3 легкой цепи по SEQ ID NO: 257;

вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR1 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 3 и CDR3 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 58, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR1 легкой цепи по SEQ ID NO:

5 215, CDR2 легкой цепи по SEQ ID NO: 230 и CDR3 легкой цепи по SEQ ID NO: 249;

вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR1 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 13, CDR2 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 44 и CDR3 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 74, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR1 легкой цепи по SEQ ID NO: 211, CDR2 легкой цепи по SEQ ID NO: 238 и CDR3 легкой цепи по SEQ ID NO: 259;

10 вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR1 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 15, CDR2 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 46 и CDR3 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 76, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR1 легкой цепи по SEQ ID NO: 217, CDR2 легкой цепи по SEQ ID NO: 239 и CDR3 легкой цепи по SEQ ID NO: 336; или

вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR1 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 8, CDR2 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 47 и CDR3 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 77, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR1 легкой цепи по SEQ ID NO: 218, CDR2 легкой цепи по SEQ ID NO: 240 и CDR3 легкой цепи по SEQ ID NO: 337.

В соответствии с одним воплощением настоящего изобретения, антитела далее подвергаются скринингу по процедуре оптимизации, причем антитела либо их
20 антигенсвязывающие фрагменты по изобретению могут содержать следующие вариабельные области тяжелой цепи и вариабельные области легкой цепи:

вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR1 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 17, CDR2 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 49 и CDR3 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 58, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR1 легкой цепи по SEQ ID NO:
25 220, CDR2 легкой цепи по SEQ ID NO: 230 и CDR3 легкой цепи по SEQ ID NO: 252;

вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR1 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 18, CDR2 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 50 и CDR3 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 58, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR1 легкой цепи по SEQ ID NO: 215, CDR2 легкой цепи по SEQ ID NO: 230 и CDR3 легкой цепи по SEQ ID NO: 252;

30 вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR1 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 19, CDR2 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 51 и CDR3 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 58, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR1 легкой цепи по SEQ ID NO: 218, CDR2 легкой цепи по SEQ ID NO: 240 и CDR3 легкой цепи по SEQ ID NO: 337;

вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR1 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 20, CDR2 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 52 и CDR3 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 58, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR1 легкой цепи по SEQ ID NO: 205, CDR2 легкой цепи по SEQ ID NO: 230 и CDR3 легкой цепи по SEQ ID NO: 264;

вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR1 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 21, CDR2 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 51 и CDR3 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 58,
40 и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR1 легкой цепи по SEQ ID NO: 205, CDR2 легкой цепи по SEQ ID NO: 230 и CDR3 легкой цепи по SEQ ID NO: 265;

вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR1 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 22, CDR2 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 53 и CDR3 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 58, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR1 легкой цепи по SEQ ID NO:
45 221, CDR2 легкой цепи по SEQ ID NO: 230 и CDR3 легкой цепи по SEQ ID NO: 266;

вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR1 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 23, CDR2 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 49 и CDR3 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 58, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR1 легкой цепи по SEQ ID NO:

215, CDR2 легкой цепи по SEQ ID NO: 230 и CDR3 легкой цепи по SEQ ID NO: 252;

вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR1 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 25, CDR2 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 56 и CDR3 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 57, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR1 легкой цепи по SEQ ID NO:

5 205, CDR2 легкой цепи по SEQ ID NO: 230 и CDR3 легкой цепи по SEQ ID NO: 257;

вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR1 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 26, CDR2 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 31 и CDR3 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 57, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR1 легкой цепи по SEQ ID NO: 220, CDR2 легкой цепи по SEQ ID NO: 230 и CDR3 легкой цепи по SEQ ID NO: 267;

10 вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR1 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 27, CDR2 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 31 и CDR3 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 57, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR1 легкой цепи по SEQ ID NO: 205, CDR2 легкой цепи по SEQ ID NO: 230 и CDR3 легкой цепи по SEQ ID NO: 252;

вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR1 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 28, CDR2 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 31 и CDR3 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 57, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR1 легкой цепи по SEQ ID NO: 205, CDR2 легкой цепи по SEQ ID NO: 230 и CDR3 легкой цепи по SEQ ID NO: 252;

вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR1 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 29, CDR2 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 31 и CDR3 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 57, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR1 легкой цепи по SEQ ID NO: 205, CDR2 легкой цепи по SEQ ID NO: 230 и CDR3 легкой цепи по SEQ ID NO: 252; или

вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR1 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 30, CDR2 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 31 и CDR3 тяжелой цепи по SEQ ID NO: 57, и вариабельную область легкой цепи, включающую CDR1 легкой цепи по SEQ ID NO: 220, CDR2 легкой цепи по SEQ ID NO: 230 и CDR3 легкой цепи по SEQ ID NO: 267.

Термин “каркасный участок” (FR) относится к остаткам вариабельного домена, отличным от остатков CDR. Каждый вариабельный домен обычно содержит четыре FR, обозначаемых как FR1, FR2, FR3 и FR4.

В соответствии с одним воплощением настоящего изобретения, антитела либо их антигенсвязывающие фрагменты могут включать в себя:

FR1 вариабельной области тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 80-95;

FR2 вариабельной области тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 96-113;

35 FR3 вариабельной области тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 114-134; и

FR4 вариабельной области тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 135-145.

Кроме того, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может включать:

40 FR1 вариабельной области легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 270-294;

FR2 вариабельной области легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 295-315;

45 FR3 вариабельной области легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 316-355; и

FR4 вариабельной области легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 356-367.

Фрагмент “Fv” представляет собой фрагмент антитела, содержащий полные сайты

распознавания и связывания антител. Такая область включает димер, к примеру, scFv, который состоит из одного переменного домена тяжелой цепи и одного переменного домена легкой цепи, весьма крепко связанных ковалентно друг с другом.

5 “Fab”-фрагмент содержит переменный и константный домены легкой цепи и переменный и первый константный домен (C_{H1}) тяжелой цепи. F(ab')₂-фрагмент антител обычно включает пару Fab-фрагментов, ковалентно связанных через шарнирный цистеин, расположенный между ними вблизи карбоксильного конца.

10 “Одноцепочечный Fv” или “scFv”-фрагмент антитела включает домены V_H и V_L антитела, причем эти домены присутствуют в виде одной полипептидной цепи. Полипептид Fv может дополнительно содержать полипептидный линкер между доменом V_H и доменом V_L для того, чтобы scFv образовывал структуру, необходимую для связывания антигена.

15 Антитела к PD-1 являются моновалентными или бивалентными и включают в себя короткие или двойные цепи. Функционально, сродство связывания антител к PD-1 составляет от 10⁻⁵ М до 10⁻¹² М. К примеру, сродство связывания антител к PD-1 составляет от 10⁻⁶ М до 10⁻¹² М, от 10⁻⁷ М до 10⁻¹² М, от 10⁻⁸ М до 10⁻¹² М, от 10⁻⁹ М до 10⁻¹² М, от 10⁻⁵ М до 10⁻¹¹ М, от 10⁻⁶ М до 10⁻¹¹ М, от 10⁻⁷ М до 10⁻¹¹ М, от 10⁻⁸ М до 10⁻¹¹ М, от 10⁻⁹ М до 10⁻¹¹ М, от 10⁻¹⁰ М до 10⁻¹¹ М, от 10⁻⁵ М до 10⁻¹⁰ М, от 10⁻⁶ М до 10⁻¹⁰ М, от 10⁻⁷ М до 10⁻¹⁰ М, от 10⁻⁸ М до 10⁻¹⁰ М, от 10⁻⁹ М до 10⁻¹⁰ М, от 10⁻⁵ М до 10⁻⁹ М, от 10⁻⁶ М до 10⁻⁹ М, от 10⁻⁷ М до 10⁻⁹ М, от 10⁻⁸ М до 10⁻⁹ М, от 10⁻⁵ М до 10⁻⁸ М, от 10⁻⁶ М до 10⁻⁸ М, от 10⁻⁷ М до 10⁻⁸ М, от 10⁻⁵ М до 10⁻⁷ М, от 10⁻⁶ М до 10⁻⁷ М или от 10⁻⁵ М до 10⁻⁶ М.

25 Антитела, связывающиеся с PD-1, либо их антигенсвязывающие фрагменты могут содержать переменную область тяжелой цепи, включающую последовательность, которая на 90% или больше идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NOs: 146-193. Антитела, связывающиеся с PD-1, либо их антигенсвязывающие фрагменты могут содержать переменную область тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 146-193. В одном воплощении настоящего изобретения антитела либо их антигенсвязывающие фрагменты могут содержать переменную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 163, 165, 166, 168, 169 или 171-188.

30 Кроме того, антитела, связывающиеся с PD-1, либо их антигенсвязывающие фрагменты могут содержать переменную область легкой цепи, включающую последовательность, которая на 90% или больше идентична последовательности, выбранной из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NOs: 368-420. Антитело, связывающееся с PD-1, либо его антигенсвязывающий фрагмент может содержать переменную область легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NOs: 368-420. В одном воплощении настоящего изобретения антитела либо их антигенсвязывающие фрагменты могут содержать переменную область легкой цепи по SEQ ID NO: 371-380, 383, 385, 386, 388, 389 или 391-415.

45 В одном конкретном воплощении настоящего изобретения антитела, связывающиеся с PD-1, либо их антигенсвязывающие фрагменты могут включать в себя:

переменную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 151 и переменную область

легкой цепи по SEQ ID NO: 400;

вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 181 и вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 401;

5 вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 181 и вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 402;

вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 181 и вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 403;

вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 181 и вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 404;

10 вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 181 и вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 405;

вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 182 и вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 406;

15 вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 182 и вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 407;

вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 182 и вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 408;

вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 182 и вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 409;

20 вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 183 и вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 410;

вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 184 и вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 411;

25 вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 185 и вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 412;

вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 186 и вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 413;

вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 187 и вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 414; или

30 вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 188 и вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 415.

В другом конкретном воплощении настоящего изобретения антитела, связывающиеся с PD-1, либо их антигенсвязывающие фрагменты могут включать в себя:

35 вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 155 и вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 375;

вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 158 и вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 378;

вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 165 и вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 385;

40 вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 171 и вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 391;

вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 175 и вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 395;

45 вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 176 и вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 396;

вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 178 и вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 398;

вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 181 и вариабельную область

легкой цепи по SEQ ID NO: 401; или

вариабельную область тяжелой цепи по SEQ ID NO: 181 и вариабельную область легкой цепи по SEQ ID NO: 405.

Часть, представленная X или Хаа в последовательности по настоящему изобретению, означает неопределенную аминокислоту и указывает, что здесь может находиться любая аминокислота.

“Фаговый дисплей” представляет собой метод выставления мутантных полипептидов в виде слитых белков с по меньшей мере частью белка оболочки, к примеру, на поверхности частиц фага, к примеру, филаментного фага. Полезность фагового дисплея состоит в быстрой и эффективной классификации тех последовательностей, которые связываются с целевыми антигенами с высоким сродством, в больших библиотеках рандомизованных мутантов белка. Выставление пептидов и библиотек белков на фагах применяется для скрининга миллионов полипептидов с тем, чтобы идентифицировать полипептиды с определенными свойствами связывания.

Технология фагового дисплея оказалась мощным инструментом для создания и скрининга новых белков, связывающихся с определенными лигандами (например, антигенами). По технологии фагового дисплея можно создавать большие библиотеки мутантов белка и быстро классифицировать последовательности, связывающиеся с целевыми антигенами с высоким сродством. Нуклеиновую кислоту, кодирующую мутантные полипептиды, сливают с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей белок оболочки вируса, например, белки гена III или белки гена VIII. Разработана монофазная система фагового дисплея, в которой последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей белок или полипептид, сливается с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей часть белка гена III. В монофазной системе дисплея слитый ген экспрессируется на низком уровне, также экспрессируется белок гена III дикого типа, при этом сохраняется инфекционность частиц.

При разработке библиотек антител типа фагового дисплея важно продемонстрировать экспрессию пептидов на поверхности филаментного фага и экспрессию функциональных фрагментов антител в периферической цитоплазме *E. coli*. Библиотеки антител либо антигенсвязывающих полипептидов получают рядом методов, к примеру, путем модификации одного гена при вставке случайной последовательности ДНК или клонирования последовательности родственного гена. Библиотеки можно подвергать скринингу на экспрессию антител или антигенсвязывающих белков с требуемыми характеристиками.

Технология фагового дисплея имеет ряд преимуществ перед стандартными гибридными и рекомбинантными методами получения антител с нужными характеристиками. Этот метод обеспечивает получение больших библиотек антител с разнообразными последовательностями за короткое время без использования животных. Для получения гибридом и получения гуманизованных антител может потребоваться время в несколько месяцев. Кроме того, поскольку иммунитет не требуется, то фаговые библиотеки антител могут вырабатывать антитела против антигенов, которые являются токсичными или обладают слабой антигенностью. Фаговые библиотеки антител также можно использовать для получения и идентификации новых терапевтических антител.

Можно использовать методы получения человеческих антител от неиммунизованных людей, из гаметных последовательностей или Ig-репертуаров наивных В-клеток, которых иммунизировали с помощью библиотек фагового дисплея. Можно использовать различные лимфатические ткани для получения библиотек нативных или

неиммуногенных антигенсвязывающих полипептидов.

Для выделения новых терапевтических антител важны методы идентификации и выделения антител с высоким сродством из библиотек фагового дисплея. Выделение антител с высоким сродством из библиотек может зависеть от размера библиотеки, эффективности продукции в бактериальных клетках и разнообразия библиотек. Размер библиотек уменьшается при неэффективной укладке антител или антигенсвязывающих белков и неэффективной продукции из-за присутствия стоп-кодона. Экспрессия в бактериальных клетках может ингибироваться при неправильной укладке антител или антигенсвязывающего домена. Экспрессия может быть улучшена путем попеременного мутирования остатков на поверхности границ переменных/константных областей или выбранных остатков CDR. Последовательность каркасной области является тем элементом, который обеспечивает надлежащую укладку при получении фаговых библиотек антител в бактериальных клетках.

При выделении антител с высоким сродством важно создавать разнообразные библиотеки антител или антигенсвязывающих белков. Участки CDR3, как оказалось, зачастую участвуют в связывании антигена. Поскольку участки CDR3 в тяжелой цепи значительно различаются по размерам, последовательности и структурно-пространственной морфологии, то с их помощью можно получать разнообразные библиотеки.

Кроме того, можно создавать разнообразие путем рандомизации участков CDR у переменных тяжелых и легких цепей, используя все 20 аминокислот в каждом положении. Использование всех 20 аминокислот ведет к получению последовательностей антител с повышенным разнообразием и повышенной вероятностью выявления новых антител.

Антитела или фрагменты антител по настоящему изобретению могут включать в себя описанные здесь последовательности антител против PD-1 по настоящему изобретению, а также их биологические эквиваленты, если только эти антитела или фрагменты антител могут специфически распознавать PD-1. Например, в аминокислотной последовательности антитела могут производиться дополнительные вариации с тем, чтобы еще больше улучшить сродство связывания и/или другие биологические свойства антитела. Такие вариации включают, к примеру, делеции, вставки и/или замены остатков в аминокислотной последовательности антитела. Такие вариации аминокислот проводятся на основании относительного сходства (идентичности) заместителей в боковой цепи аминокислот типа гидрофобности, гидрофильности, заряда или размера. Анализ размеров, формы и типа заместителей в боковой цепи аминокислот показывает, что аргинин, лизин и гистидин являются положительно заряженными остатками, аланин, глицин и серин имеют близкие размеры, а фенилаланин, триптофан и тирозин имеют близкие формы. Так, исходя из этих соображений, аргинин, лизин и гистидин; аланин, глицин и серин; фенилаланин, триптофан и тирозин считаются биологически функционально эквивалентными.

В другом аспекте настоящее изобретение касается нуклеиновых кислот, кодирующих антитела либо их антигенсвязывающие фрагменты.

Антитела либо их антигенсвязывающие фрагменты могут быть получены рекомбинантным способом путем выделения нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело либо его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению. Нуклеиновую кислоту выделяют и вставляют в реплицирующийся вектор для дальнейшего клонирования (амплификации ДНК) или дальнейшей экспрессии. Исходя из этого, в другом аспекте настоящее изобретение касается векторов, содержащих

нуклеиновые кислоты.

Термин “нуклеиновая кислота” служит для обозначения молекул ДНК (гДНК и кДНК) и РНК, а нуклеотиды, которые являются основными составляющими единицами нуклеиновой кислоты, включают как нуклеотиды природного происхождения, так и их аналоги, у которых модифицированы молекулы сахаридов или оснований.

Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей вариabельные области тяжелой и легкой цепи по настоящему изобретению, может варьироваться. Такие вариации включают добавление, делеции или неконсервативные либо консервативные замены нуклеотидов.

Аминокислотная последовательность антител или их антигенсвязывающих фрагмента либо кодирующей их нуклеиновой кислоты по настоящему изобретению также может включать в себя последовательности, проявляющие существенную идентичность с последовательностью, приведенной в соответствующем SEQ ID NO. Термин “последовательность, проявляющая существенную идентичность” означает такую последовательность, которая проявляет идентичность по меньшей мере на 90%, наиболее предпочтительно по меньшей мере на 95%, 96% и более, 97% и более, 98% и более или 99% и более при совмещении последовательности по настоящему изобретению таким образом, чтобы она как можно больше соответствовала какой-либо другой последовательности, и анализе совмещенных последовательностей с помощью алгоритма, который обычно используется в данной области.

Исходя из этого, антитела либо их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут проявлять идентичность последовательности на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% и больше. Такая идентичность определяется путем сравнения и/или совмещения последовательностей методами, известными в данной области. Например, степень идентичности последовательности нуклеиновой кислоты или белка по настоящему изобретению можно определить с помощью алгоритма сравнения последовательностей (т.е. BLAST или BLAST 2.0), совмещения вручную или визуального осмотра.

ДНК, кодирующая антитело, может быть легко выделена или синтезирована по стандартной методике (например, с помощью олигонуклеотидного зонда, специфически связывающегося с ДНК, кодирующей тяжелые и легкие цепи антитела). Доступны различные векторы. Компоненты векторов обычно включают, без ограничения, один или несколько из следующих компонентов: сигнальные последовательности, точки начала репликации, один или несколько маркерных генов, элементы энхансеров, промоторы и последовательности терминации транскрипции.

В настоящем изобретении термин “вектор” означает средство для экспрессии целевых генов в клетках хозяина и включает: плазмидные векторы; космидные векторы; и вирусные векторы, как-то бактериофаговые векторы, аденовирусные векторы, ретровирусные векторы и аденоассоциированные вирусные векторы. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело в векторе, оперативно связана с промотором.

Термин “оперативно связанный” означает функциональную связь между последовательностью, регулирующей экспрессию нуклеиновой кислоты (например, промотором, сигнальной последовательностью или набором сайтов связывания регуляторов транскрипции), и другой последовательностью нуклеиновой кислоты, которая регулируется при транскрипции и/или трансляции последовательности нуклеиновой кислоты.

При использовании в качестве хозяина прокариотических клеток вектор обычно содержит сильный промотор, способный осуществлять транскрипцию (как-то промотор

tas, промотор lac, промотор lacUV5, промотор lpp, промотор pLλ, промотор pRλ, промотор gac5, промотор amp, промотор recA, промотор SP6, промотор trp или промотор T7), сайт связывания рибосомы для инициации трансляции и последовательность терминации транскрипции/трансляции. Кроме того, к примеру, при использовании в качестве хозяина эукариотических клеток вектор содержит промотор (например, промотор металлотioneина, промотор β-актина, промотор гемоглобина человека или промотор мышечного креатина человека), полученный из генома клеток млекопитающих, промотор, происходящий из вируса животных, как-то поздний промотор аденовируса, промотор 7.5K вируса коровьей оспы, промотор SV40, промотор цитомегаловируса (CMV), tk-промотор HSV, промотор вируса опухоли молочной железы мыши (MMTV), промотор LTR ВИЧ, промотор вируса Молони, промотор вируса Эпштейна-Барра (EBV) и промотор вируса саркомы Рауса (RSV), а также обычно содержит последовательность полиаденилирования в качестве последовательности терминации транскрипции.

Необязательно вектор может быть слит с другой последовательностью для облегчения очистки экспрессируемых из него антител. Последовательности для слияния включают, к примеру, глутатион-S-трансферазу (Pharmacia, USA), мальтозосвязывающий белок (NEB, USA), FLAG (IBI, USA), 6xHis (гексагистидин; Quiagen, USA) и др.

Векторы содержат гены устойчивости к антибиотикам, обычно используемые в данной области в качестве отборочных маркеров, примеры которых включают гены устойчивости к ампициллину, гентамицину, карбенициллину, хлорамфениколу, стрептомицину, канамицину, генетицину, неомицину и тетрациклину.

В другом аспекте настоящее изобретение касается клеток, трансформированных вышеупомянутыми векторами. Клетки, используемые для получения антител по настоящему изобретению, могут представлять собой прокариотические клетки, дрожжевые клетки или высшие эукариотические клетки, без ограничения.

Можно использовать штаммы из рода *Bacillus* типа *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* и *Bacillus tuligensis*, *Streptomyces*, *Pseudomonas* (к примеру, *Pseudomonas putida*) и такие прокариотические клетки хозяина, как *Proteus mirabilis* и *Staphylococcus* (к примеру, *Staphylococcus carnosus*).

Наибольший интерес представляют клетки животных, а примеры полезных линий клеток хозяина включают, без ограничения, COS-7, ВНК, CHO, CHOК1, DXB-11, DG-44, CHO/DHFR, CV1, COS-7, НЕК293, ВНК, ТМ4, VERO, HELA, MDCK, BRL 3A, W138, Нер G2, SK-Нер, ММТ, TRI, MRC 5, FS4, 3Т3, RIN, А549, РС12, К562, PER.C6, SP2/0, NS-0, U20S или НТ1080.

В другом аспекте настоящее изобретение касается способа получения антител либо их антигенсвязывающих фрагментов, включающего: (а) культивирование клетки; и (b) выделение антител либо их антигенсвязывающих фрагментов из культивированной клетки.

Клетки можно культивировать в различных средах. В качестве культуральной среды можно использовать любые коммерчески доступные среды без ограничения. Все другие необходимые добавки, хорошо известные специалистам в данной области, могут быть включены в соответствующих концентрациях. Условия культивирования типа температуры и рН уже использовались с выбранными для экспрессии клетками хозяина и должны быть известны специалистам в данной области.

В настоящем изобретении термин “трансформация” означает введение вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую целевой белок, в клетки хозяина с тем, чтобы кодируемый нуклеиновой кислотой белок мог экспрессироваться в клетках

хозяина. Трансформирующая нуклеиновая кислота охватывает и трансформирующую нуклеиновую кислоту, вставленную и встроившуюся в хромосому клетки хозяина, так и трансформирующую нуклеиновую кислоту, расположенную вне хромосом, если только она может экспрессироваться в клетках хозяина. Кроме того, нуклеиновая кислота включает ДНК и РНК, кодирующие целевой белок. Нуклеиновая кислота может быть введена в любой форме, если только она может вводиться в клетки хозяина и экспрессироваться в них. Например, нуклеиновая кислота может быть введена в клетки хозяина в виде экспрессионной кассеты, которая представляет собой генную конструкцию, содержащую все элементы, необходимые для самостоятельной экспрессии. Экспрессионная кассета обычно включает промотор, сигнал терминации транскрипции, сайт связывания рибосомы и сигнал терминации трансляции, которые функционально связаны с нуклеиновой кислотой. Экспрессионная кассета может иметь вид экспрессионного вектора, обеспечивающего саморепликацию. Нуклеиновая кислота также может быть введена в клетки хозяина в своем собственном виде и функционально связана с последовательностью, необходимой для экспрессии в клетках хозяина.

Извлечение антител либо их антигенсвязывающих фрагментов может проводиться, к примеру, путем центрифугирования или ультрафильтрации для удаления примесей и очистки полученного препарата, к примеру, методом аффинной хроматографии. Можно использовать и другие методы очистки типа анионообменной или катионообменной хроматографии, хроматографии гидрофобных взаимодействий, хроматографии на гидроксипатите и др.

В другом аспекте настоящее изобретение касается получение композиций для профилактики или лечения рака, содержащих антитела либо их антигенсвязывающие фрагменты в качестве активного ингредиента.

Настоящим изобретением предусмотрены, к примеру, композиции для профилактики или лечения рака, содержащие: (а) фармацевтически эффективное количество антитела к PD-1 или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению; и (b) фармацевтически приемлемый носитель. Настоящим изобретением также предусмотрен способ профилактики или лечения рака, включающий введение антител к PD-1 либо их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению в эффективном количестве, необходимом для пациента.

В настоящем изобретении рак предпочтительно выбирают из группы, состоящей из меланомы, рака легких, рака печени, глиоцитомы, рака яичников, рака толстой кишки, рака головы и шеи, рака мочевого пузыря, рака почек, рака желудка, рака молочной железы, метастатического рака, лимфомы Ходжкина, рака простаты и рака поджелудочной железы, не ограничиваясь этим.

В настоящем изобретении термин “лечение” означает подавление или облегчение рака либо вызванного им одного или нескольких симптомов, а также предотвращение прогрессирования рака или такое лечение рака, которое нормализует симптомы заболевания, путем введения композиции, а термин “предотвращение” означает любое действие, которое тормозит или замедляет прогрессирование рака путем введения композиции. В настоящем изобретении профилактика или лечение рака происходит путем связывания между антителом, полученным по настоящему изобретению, и PD-1. Антитело, которое связывается с PD-1, значительно ингибирует активность PD-1, тем самым вызывая предотвращение или лечение рака.

Термин “фармацевтически приемлемый носитель” в настоящем изобретении означает такой носитель или разбавитель, который не нарушает биологическую активность или свойства вводимого соединения и не вызывает раздражения в организме. Для

композиций, составленных в виде жидких растворов, приемлемыми фармацевтическими носителями являются стерилизованные и биосовместимые, а их примеры включают солевые растворы, стерильную воду, раствор Рингера, забуференные солевые растворы, растворы для инъекций с альбумином, растворы декстрозы, растворы мальтодекстрина, глицерин, этанол и смеси одного или нескольких из них. При необходимости можно добавлять и другие стандартные добавки типа антиоксидантов, буферов и бактериостатических средств. Кроме того, при составлении растворов для инъекций типа водных растворов, суспензий и эмульсий, пилюль, капсул, гранул или таблеток можно еще добавлять разбавители, диспергаторы, поверхностно-активные вещества, связующие и смазывающие вещества.

Композиции для профилактики или лечения рака, содержащие антитела и фармацевтически приемлемый носитель, можно вносить в лекарственные формы, содержащие их в качестве активного ингредиента, в виде препаратов для перорального или парентерального введения. Фармацевтические формы могут включать препараты, подходящие для перорального, ректального, назального, местного (в том числе защечного и подъязычного), подкожного, вагинального или парентерального (в том числе внутримышечного, подкожного и внутривенного) введения либо ингаляции или инсуффляции.

Примеры лекарственных форм для перорального введения, содержащих композиции по настоящему изобретению в качестве активного ингредиента, включают таблетки, пастилки, леденцы, водные или масляные суспензии, готовые порошки или гранулы, эмульсии, твердые или мягкие капсулы, сиропы или эликсиры. Для получения таких форм, как таблетки и капсулы, можно включать связующие вещества, такие как лактоза, сахароза, сорбит, маннит, крахмал, амилопектин, целлюлоза или желатин, эксципиенты типа дикальцийфосфата, разрыхлители типа кукурузного или картофельного крахмала, смазывающие вещества типа стеарата кальция, стеарилфумарата натрия или полиэтиленгликолевого воска, а капсульные формы могут дополнительно содержать жидкий носитель типа жирного масла, в дополнение к вышеупомянутым ингредиентам.

Примеры форм для парентерального введения, содержащих композиции настоящего изобретения в качестве активного ингредиента, включают формы для инъекций типа подкожных инъекций, внутривенных инъекций или внутримышечных инъекций, свечи или формы для распыления типа аэрозолей, вдыхаемых через дыхательный аппарат. Для получения форм для инъекций можно смешивать композиции настоящего изобретения в воде со стабилизаторами или буферами для приготовления растворов или суспензий, а растворы или суспензии можно составлять для введения на основе ампул или флаконов. Для введения в виде свечей можно составлять композиции для ректального введения типа свечей или препаратов для клизмы, содержащих стандартную основу для свечей типа масла какао или других глицеридов. Для распылительных форм типа аэрозолей можно вводить добавки типа вытеснителей с тем, чтобы диспергировался воднодисперсный концентрат или влажный порошок.

В другом аспекте настоящее изобретение направлено на способы профилактики или лечения рака, включающие введение композиций для предотвращения или лечения рака, содержащих антитела.

В настоящем изобретении термин “введение” означает введение пациентам фармацевтических композиций по настоящему изобретению любым подходящим способом. Способы введения композиций настоящего изобретения могут быть любыми, включая пероральное или парентеральное введение. В частности, фармацевтические композиции можно вводить стандартным способом типа перорального, ректального,

местного, внутривенного, внутрибрюшинного, внутримышечного, внутриартериального, трансдермального, интраназального, ингаляционного, глазного или интрадермального введения.

Способ лечения по настоящему изобретению включает введение фармацевтически эффективного количества композиции для профилактики или лечения рака по настоящему изобретению. Специалистам в данной области должно быть известно, что подходящая общая суточная доза может быть определена по суждению медицинского специалиста. Конкретное терапевтически эффективное количество для определенного пациента предпочтительно зависит от многих факторов, включая тип и степень достигаемой реакции, а также от присутствия других используемых средств, конкретной композиции и возраста, массы тела, общего состояния здоровья, пола, диеты пациента, времени введения, способа введения и скорости выведения композиции, продолжительности лечения и препаратов, используемых в сочетании или одновременно с данной композицией, и других подобных факторов, хорошо известных в области фармацевтики. Поэтому эффективное количество композиции для профилактики или лечения рака, которое подходит для цели настоящего изобретения, предпочтительно определяется с учетом вышеприведенных факторов.

Кроме того, способ лечения по настоящему изобретению может применяться к любым животным, у которых могут возникать такие заболевания, как опухоли и неоваскуляризация вследствие чрезмерной активности PD-1, причем животные включают людей и приматов, а также домашний скот типа коров, свиней, овец, лошадей, собак и кошек.

В другом аспекте настоящее изобретение касается композиций для диагностики рака, содержащих антитела к PD-1 либо их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению. Кроме того, настоящее изобретение касается способа диагностики рака путем обработки антителами к PD-1 либо их антигенсвязывающими фрагментами по настоящему изобретению.

Рак можно диагностировать путем измерения уровня экспрессии PD-1 в образцах с помощью антител к PD-1 по настоящему изобретению. Уровень экспрессии может быть измерен стандартным методом иммуноанализа, включая, без ограничения, методы радиоиммуноанализа, радиоиммунопреципитации, иммунопреципитации, иммуногистохимического окрашивания, иммуноферментного анализа (ELISA), ELISA с захватом, анализа ингибирования или конкуренции, сэндвич-анализа, проточной цитометрии, иммунофлуоресцентного окрашивания и иммуноаффинной очистки с помощью антител к PD-1.

Рак можно диагностировать путем анализа интенсивности конечного сигнала в процессе иммуноанализа. А именно, рак диагностируется тогда, когда в биологическом образце сильно экспрессируется белок маркера по настоящему изобретению, при этом сигнал от биологического образца будет более сильным, чем у нормального биологического образца (к примеру, нормальной ткани желудка, крови, плазмы или сыворотки).

В другом аспекте настоящее изобретение касается наборов для диагностики рака, содержащих композиции для диагностики рака. Наборы по настоящему изобретению содержат антитела к PD-1 по настоящему изобретению, а рак диагностируется путем анализа сигнала, возникающего при реакции между образцом и антителом. Сигналы могут включать, без ограничения, конъюгированные с антителами ферменты типа щелочной фосфатазы, β -галактозидазы, пероксидазы хрена, люциферазы или цитохрома P450. В том случае, когда в качестве фермента используется щелочная фосфатаза, в

качестве субстрата для фермента используется хромогенный субстрат реакции, как-то бромхлориндолфосфат (BCIP), нитросиний тетразолий (NBT), нафтол-AS-B1-фосфат или ECF (для усиления хемифлуоресценции), а при использовании пероксидазы хрена используется такой субстрат, как хлорнафтол, аминоэтилкарбазол, диаминобензидин, D-люциферин, люцигенин (бис-N-метилакридиния нитрат), бензиловый эфир резорфина, люминол, реагент Amplex Red (10-ацетил-3,7-дигидроксибензоксазин), HYR (п-фенилендиамин-HCl и пирокатехол), ТМВ (тетраметилбензидин), АВТС (2,2'-азин-ди[3-этилбензтиазолинсульфонат]), о-фенилендиамин (OPD) и нафтол/пиронин, глюкозооксидаза, t-NBT (нитросиний тетразолий) или m-PMS (феназин метосульфат), но настоящее изобретение этим не ограничивается.

Кроме того, набор по настоящему изобретению также может включать метку для генерирования детектируемого сигнала, а метка может означать химическое вещество (например, биотин), фермент (щелочная фосфатаза, β-галактозидаза, пероксидаза хрена или цитохром P450), радиоактивное вещество (типа ^{14}C , ^{125}I , ^{32}P и ^{35}S), флуоресцентное вещество (типа флуоресцеина), люминесцентное вещество, хемилюминесцентное вещество и FRET (флуоресцентно-резонансный перенос энергии), без ограничения.

Измерение активности фермента, используемого для диагностики рака или измерения сигнала, может проводиться различными способами, известными в данной области. Таким образом, можно качественно или количественно анализировать экспрессию PD-1.

Примеры

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно с привлечением примеров. Однако специалистам в данной области должно быть ясно, что эти примеры приводятся только для иллюстрации настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие объем настоящего изобретения.

Пример 1. Экспрессия и очистка антигена PD-1

1. Получение векторов для экспрессии белка PD-1

Для клонирования PD-1 проводили амплификацию методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью праймеров для PD1, содержащих сайты для рестрикционного фермента SfiI на 5'- и 3'-концах (таблица 1), с тем чтобы получить только внеклеточный домен, используя библиотеки кДНК в клетках Jurkat (Stratagene, USA).

Амплифицированный продукт ПЦР получали путем слияния Fc человека (SEQ ID NO: 196) и Fc мыши (SEQ ID NO: 197) с карбоксильным концом с помощью вектора N293F (фиг. 1).

Таблица 1

Название	Последовательность 5'→3'	SEQ ID NO:
PD1-F	CCAGGATGGTCTTAGACTCCCC	194
PD1-R	CACCAGGGTTTGGAACTGGC	195

2. Экспрессия и очистка антигена PD-1

Для того, чтобы экспрессировать антиген в клетках животных, клетки HEK293F трансфицировали плазмидной ДНК. Готовили реакционный раствор полиплекса для трансфекции путем смешивания 25 мкг плазмидной ДНК с 3 мл экспрессионной среды Freestyle 293, а затем в полученную смесь добавляли 2 мг/мл PЕТ (полиэтиленимин, PolyplusA-transfection, USA) и опять перемешивали. Реакционный раствор полиплекса инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин, а затем культивировали в 40 мл культуральной среды при концентрации 1×10^6 клеток/мл в течение 24 часов при 37°C и 8% CO₂ при 120 об/мин. Через 24 часа после трансфекции добавляли Soytone

(BD, USA) в качестве добавки до конечной концентрации 10 г/л. Антитела получали в системе краткосрочной экспрессии в клетках HEK293F в течение 7 дней. Для выделения антигена из культурального раствора проводили аффинную хроматографию. Получали супернатант центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 мин для удаления клеток и обломков клеток из культуральной среды, извлеченной на 7-й день. Супернатант подвергали реакции с промытой DPBS агарозной смолой с рекомбинантным белком А при 4°C в течение 16 часов.

При использовании агарозной смолы с рекомбинантным белком А для проведения первичной очистки белок элюировали 0,1 М глицином и нейтрализовали 500 мкл 1М трис-HCl. После первичной очистки белок подвергали вторичной очистке методом гель-филтрационной хроматографии на Superdex 200 (1,5 см × 100 см).

Чистоту очищенного белка определяли методом SDS-PAGE и эксклюзионной хроматографии [TSK-GEL G-3000 SWXL для эксклюзионной хроматографии (SEC) (Tosoh)].

В результате было установлено, что очищенный белок PD1 имеет чистоту в 95% или больше, как видно из фиг. 2А–2D.

Пример 2. Скрининг человеческих антител против PD-1

1. Подготовка антигенов

В качестве белковых антигенов PD1-hFc и PD1-mFc, полученные в примере 1, и PD1-his (кат. № 10377-H08H), приобретенный у Sino Biological Inc., фиксировали в дозе 50 мкг на иммуносорбционных пробирках, а затем блокировали.

2. Биопэннинг (просеивание)

Получали фаговую библиотеку человеческих антител путем инфицирования бактерий библиотекой scFv человека с разнообразием в $2,7 \times 10^{10}$, а затем культивирования при 30°C в течение 16 ч. Культуральный раствор после культивирования центрифугировали, а супернатант концентрировали с помощью PEG и затем растворяли в буфере PBS для получения библиотеки человеческих антител. Фаговую библиотеку человеческих антител вносили в иммунологическую пробирку и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. После отмытки 1 раз PBS/T и 1 раз PBS элюировались только scFv-фаги, специфически связавшиеся с антигеном.

Элюированными фагами опять инфицировали *E. coli* и проводили амплификацию (процесс пэннинга), получая пул положительных фагов. Проводили второй и третий раунд пэннинга, используя фаги, амплифицированные в первом раунде пэннинга, таким же образом, как описано выше, за исключением того, что увеличилось только количество стадий промывки PBST.

В результате, как видно из таблицы 2, оказалось, что количество фагов, связавшихся с антигеном (на выходе) при третьем раунде пэннинга, намного повысилось по сравнению с количеством фагов на входе.

Таблица 2

Раунд пэннинга	Количество фагов на входе	Количество фагов на выходе
1	$2,0 \times 10^{13}$	$3,6 \times 10^7$
2	$1,2 \times 10^{13}$	$7,0 \times 10^7$
3	$2,0 \times 10^{13}$	$2,0 \times 10^9$

3. Полифаговый ELISA

Проводили полифаговый ELISA (иммуноферментный анализ) для изучения специфичности к антигенам у пула положительных к поли-scFv-фагам антител, полученных при каждом раунде процесса пэннинга в Примере 2.

Исходные клетки, замороженные после каждого из трех раундов пэннинга, вносили в среду, содержащую 5 мл 2×YTCM, 2% глюкозы и 5 мМ MgCl₂, до значения OD₆₀₀ = 0,1, а затем культивировали при 37°C в течение 2-3 часов (OD₆₀₀ = 0,5-0,7). Клетки инфицировали фагом-помощником M1 и культивировали в среде, содержащей 2×YTCMK, 5 мМ MgCl₂ и 1 мМ IPTG при 30°C в течение 16 ч. Культивируемые клетки центрифугировали (4500 об/мин, 15 мин, 4°C), а супернатанты переносили в новые пробирки (поли-scFv-фаги от каждого из трех пэннингов). На 96-луночных иммунопланшетах (NUNC 439454) фиксировали по два вида антигенов при плотности 100 нг на лунку в буфере для покрытия при 4°C в течение 16 часов, а затем каждую лунку блокировали раствором PBS с 4% обезжиренного молока.

Лунки промывали 0,2 мл PBS/T, в каждую лунку добавляли по 100 мкл поли-scFv-фагов от каждого из трех пэннингов и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. Каждую лунку снова промывали 4 раза по 0,2 мл PBS/T, добавляли вторичное антитело против M13-HRP (Amersham, 27-9421-01) в разведении 1:2000 и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После промывки PBS/T растворяли таблетки OPD (Sigma, 8787-TAB) в буфере PC и полученный раствор добавляли в лунки по 100 мкл на лунку, индуцируя развитие окраски в течение 10 мин. Затем измеряли поглощение при 490 нм на спектрофотометре (Molecular Devices).

Результаты представлены на фиг. 3. Как видно из фиг. 3, анализ по ELISA показал, что у третьих поли-scFv-фагов повышается способность к связыванию с двумя антигенами PD-1.

4. Скрининг положительных фагов

Колонии, полученные из группы поликлональных фаговых антител (из третьего пэннинга) с высокой способностью к связыванию, культивировали в 96-луночном планшете с глубокими лунками на 1 мл (Bioneer, 90030) при 37°C в течение 16 часов. По 100-200 мкл выращенных при этом клеток вносили в среду, содержащую 2×YTCM, 2% глюкозы и 5 мМ MgCl₂, до значения OD₆₀₀ = 0,1, и добавляли в среду, содержащую 1 мл 2 х YTCM, 2% глюкозы и 5 мМ MgCl₂, а затем культивировали в глубоком 96-луночном планшете при 37°C в течение 2-3 часов до OD₆₀₀ = 0,5-0,7. Клетки инфицировали фагом-помощником M1 при MOI 1:20 и культивировали в среде, содержащей 2×YTCMK, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ IPTG при 30°C в течение 16 часов.

На 96-луночных иммунопланшетах фиксировали антиген PD1 при плотности 100 нг на лунку при 4°C в течение 16 ч, а затем каждую лунку блокировали раствором PBS с 4% обезжиренного молока. В каждую лунку вносили по 100 мкл моноклонального scFv-фага (100 scFv-фагов) после промывки 0,2 мл PBS/T и культивирования в течение 16 часов и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. Лунки опять промывали 4 раза по 0,2 мл PBS/T, добавляли вторичное антитело против M13-HRP в разведении 1:2000 и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После промывки 0,2 мл PBS/T проводили развитие окраски и измеряли поглощение при 490 нм.

В результате, как видно из фиг. 4, было получено в общей сложности несколько десятков одиночных фаговых клонов для PD1 в виде моноклонов с высокой способностью к связыванию с каждым антигеном.

5. Анализ нуклеотидных последовательностей положительных фаговых антител

Из отобранных одиночных клонов выделяли ДНК с помощью набора для очистки ДНК (Qiagen, Germany) и заказывали анализ последовательностей этих ДНК (Solgent). Исходя из результатов анализа последовательностей, идентифицировали участки CDR

из V_H и V_L у выбранных антител и исследовали сходство (идентичность) между этими антителами и группами гаметных антител с помощью программы Ig BLAST на веб-сайте NCBI по адресу <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>. В результате было получено 15 видов фаговых антител, специфичных к PD1, которые приведены ниже в таблице 3.

Таблица 3. Характеристики моноклонов PD1

Название клона	V_H	Идентичность	V_L	Идентичность	Группа
Ниволумаб	VH3-33	91,80%	L6	98,90%	
Пембролизумаб	VH1-2	79,60%	L25	80,80%	
PD1-29A2	VH3-9	91,80%	V2-17	86,50%	1
PD1-29H3	VH3-9	90,80%	V1-11	88,50%	2
PD1-31F3	VH1-69	92,90%	V1-13	93,90%	3
PD1-32A6	VH1-69	87,80%	L5	91,60%	4
PD1-41C9	VH3-30	95,80%	O1	92,10%	5
PD1-42G4	VH3-11	93,80%	O2	93,80%	6
PD1-44B5	VH3-30	99,00%	V1-16	85,60%	7
PD1-45D6	VH3-30	95,80%	O1	93,10%	8
PD1-45F1	VH1-46	91,80%	V2-13	93,80%	9
PD1-45F4	VH3-9	90,80%	V2-1	77,70%	10
PD1-48A9	VH1-69	79,60%	O1	96,00%	11
PD1-49B9	VH3-9	88,70%	V1-2	93,90%	12
PD1-49A2	VH3-30	97,90%	O1	93,10%	13
PD1-51D9	VH1-3	82,70%	A3	94,00%	14
PD1-52E8	VH3-9	91,80%	V2-17	90,50%	15

Антитела, включая последовательности участков CDR и FR тяжелой и легкой цепи выбранных антител, а также содержащие их вариабельные области тяжелой цепи и вариабельные области легкой цепи, представлены ниже в таблицах 4 и 5.

Таблица 4. Вариабельные области тяжелой цепи у клонов PD1

Название	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
PD1-45D6	QVQLVESG GGVVQPGRS LRLSCAAS	GFTFSSYA	MHWVRQ VPGKGLE WVAV	ISYDGN DK	YYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VPTTFEY	WGQGSQ VTVSS
SEQ ID NO:	80	1	96	31	114	57	135
PD1-49A2	QVQLVESG GGVVQPGRS LRLSCAAS	GFTFSSYA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISYDGSNK	YYADSVKGRFTISR NPKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	TTTTFDS	WGRGTL VTVSS
SEQ ID NO:	80	1	97	32	115	58	136
PD1-27A12	QVQLVESG GGLVQPGRS LRLSCAAS	GFTFNDYA	MHWVRQ VPGKGLE WVSG	ISWNSGRI	VYADSMKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYC	ARSQQQ ILDY	WGQGTL VTVSS
SEQ ID NO:	81	2	98	33	116	59	137
PD1-27B1	QVQLVESG GGLVQPGRS LRLSCAAS	GFTFNDYA	MHWVRQ VPGKGLE WVSG	ISWNSGRI	VYADSMKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYC	ARSIRQI LDY	WGQGTL VTVSS
SEQ ID NO:	82	2	98	33	116	60	137
PD1-28D12	QVQLVESG GGLVQPGRS LRLSCAAS	GFTFNDYA	MHWVRQ VPGKGLE WVSG	ISWNSGRI	VYADSMKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYC	ARSLPXS RSRLDV	WGQGTL VTVSS
SEQ ID NO:	81	2	98	33	116	61	137
PD1-29A2	QVQLVESG GGLVQPGRS LRLSCAAS	GFTFNDYA	MHWVRQ VPGKGLE WVSG	ISWNSGRI	VYADSMKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLR AEDTAVYYC	ARAXTS PLDMSLDY	WGQGTL VTVSS
SEQ ID NO:	81	2	98	33	116	62	137
PD1-29H3	QMQLVESG GNLVQPGRS LRLSCAAS	GFTFDDYG	MHWVRQ APGKGLE WVSS	ISWNSGTI	GYADSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNSLR SEDTAVYYC	ARLLHQ MNEHEF MDV	WGQGTT VTVSS
SEQ ID NO:	83	3	99	34	117	63	138

	PD1-31F3	QVQLVQSG AEVKKPGSS VKVSCKAS	GGTFSSYA	ISWVRQA PGQGLEW MGG	IIPLFSTA	HSAQKFQGRVTITAD ESSSTAYMELSSLRSE DTAVYYC	AKHKGL PFDWSP DGFDT	WGQGT MVTVSS
	SEQ ID NO:	84	4	100	35	118	64	139
5	PD1-32A6	QVQLVQSG AEVKKPGSS VKVSCKAS	GDTFTRNA	VSWVRQA PGEGLEW MAD	IIPIFGSA	NYAQKFQGRLLTLA DVSISIAVMELSSLRSEDTAVYYC	ARTIEGA FDI	WGQGT MVTVSS
	SEQ ID NO:	84	5	101	36	119	65	139
	PD1-41C9	QMQLVESG GGVVQPGRS LRLSCAAS	GFTFSSYA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISYDGSNK	YYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNRLR SEDTAVYYC	TTTTFDS	WGQGT ITVSS
	SEQ ID NO:	85	1	97	32	120	58	140
10	PD1-42G4	QVQLVESG GGLVKPGGS LRLSCAAS	GFTFSDYY	MSWIRQA PGKGLEW VSD	ISASGNSI	YYADSVKRRFTISR NSKNSLYLQMNLSR AEDTAVYYC	VTSQPFGEFRN	WGLGTL VTVSS
	SEQ ID NO:	82	6	102	37	121	66	141
	PD1-44B5	QVQLVESG GGVVQPGRS LRLSCAAS	GFTFSSYA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISYDGSNK	YYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNLSR AEDTAVYYC	ARLMHT FSVQYF LDV	WGQGT VTVSS
	SEQ ID NO:	80	1	97	32	114	67	138
15	PD1-45D6	QVQLVESG GGVVQPGRS LRLSCAAS	GFTFSSYA	MHWVRQ VPGKGLE WVAV	ISYDGNDK	YYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYC	VPTTFEY	WGQGSQ VTVSS
	SEQ ID NO:	80	1	96	31	114	57	135
	PD1-45F1	QVQLVQSG AEVKKPGAS VKLSCKAS	GYTFNSYY	VHWVRQ APGQGLE WMGI	INPSDGSA	TYAQKFQGRVTMTS DTSTSSVYMELSSLR SEDTAVYYC	ARDGNY YDSRGY YYDTFDM	WGQGT ITVSS
20	SEQ ID NO:	86	7	103	38	122	68	140
	PD1-45F4	QMQLVESG GGLVQPGRS LRLSCAAS	GFTFDDYA	MHWVRQ APGQGLE WVSG	ISWNSNNI	KYADSVKGRFTISR NSKNSLYLQMNLSR AEDTAVYYC	ARGALPLDV	WGQGT VTVSS
	SEQ ID NO:	87	8	104	39	123	69	142
	PD1-47B8	QMQLVQSG AEVKKPGAS VKVSCKAS	GYTFTSYD	INWVRQA SQQAPEW MGW	LHADSGKT	GYAQTFQGRVTMT DTSIDTAYLELSSLRS EDTAVYYC	ARGTHWLD	WGQGT VTVSS
25	SEQ ID NO:	88	9	105	40	124	70	137
	PD1-48A6	QVQLVQSG GGLIQPGGSL RLSCAAS	GFTVSRNS	MNWVRQ TPGKGPE WVSL	IFSGGTK	YKDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNLSRAE DTAVYYCA	AREEQF LIALAGR YFDY	WGQGT VTVSS
	SEQ ID NO:	89	10	106	41	125	71	138
30	PD1-48A9	QMQLVQSG AEVKKPGSS VKVSCKAS	GDTFTRYI	INWVRQA PGQGLEW MGR	VIPTLGLT	TYAQNFDQDTVTIAD KSTNTAYMELKNLRS EDTAVYYC	ARGYGS GAFDI	WGQGT MITVSS
	SEQ ID NO:	90	11	107	42	126	72	143
	PD1-48G6	QMQLVESG GGVVQPGRS LRLSCAAS	GFTFSHYA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISYDGSKI	YYADSVKGRFTVSR DNSKNTLYLQMNLSL RAEDTAVYYC	ARIGYK DAFDI	WGQGT MVTVSS
35	SEQ ID NO:	85	12	97	43	127	73	139
	PD1-49A2	QVQLVESG GGVVQPGRS LRLSCAAS	GFTFSSYA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISYDGSNK	YYADSVKGRFTISR NPKNTLYLQMNLSR AEDTAVYYC	TTTTFDS	WGRGTL VTVSS
	SEQ ID NO:	80	1	97	32	115	58	136
	PD1-49B9	QMQLVESG GGLVQPGRS LRLSCAAS	GFTFEDYA	MHWVRQ PPGKGLE WVSS	ISWNSHNI	AYADSVKGRFTISR NSKNSLYLQMNLSR AEDTAVYYC	STSGLGVHA	WGQGT MVTVSS
40	SEQ ID NO:	87	13	108	44	128	74	139
	PD1-51A6	QVQLVESG GGLVQPGRS LRLSCAAS	GLSFSSYW	MTWVRQ APGKGLE WVAN	IKQDGSEK	YYVDSVKGRFTISR NAKNSLYLQMNLSR AEDTAVYYC	ARDSFG GHLDL	WGQGT VTVSS
	SEQ ID NO:	91	14	109	45	129	75	137
	PD1-51D9	QVQLVESG AEVKKPGAS VKLSCKAS	GYTFSSYW	MHWVRQ APGQRLE WMGE	INPNGHT	NYNEKFKSRVTITVD KSASTAYMELSSLRS EDTAVYYC	AREGDG SYWGYFDS	WGQGT ITVSS
45	SEQ ID NO:	92	15	110	46	130	76	144
	PD1-52E8	QVQLVQSG GNLVQPGRS LRLSCAAS	GFTFDDYA	MHWVRQ APGKGLE WVSG	ISWNSGTP	GYADSVQGRFTISR NAKNSLYLQMNLSR AEDTAVYYC	ARGHNY LDSSYYDY	WGQGT VTVSS
	SEQ ID NO:	93	8	111	47	131	77	137

	PD1-62E1	QVQLVESG GDLVKPGRS LRLSCTGS	GFTFGDHP	LTWVRQI PGKGLEW VGF	IRSKAYGE	TTEYAASVKGRFTIS RDDSLSIAYLQMNSL RAEDTAVY	ASVSYC SGGSCY QGTDFY	WGQGTL VTVSS
	SEQ ID NO:	94	16	112	48	132	78	137
5	PD1-72D10	QVQLVESG GGVVQPGRS LRLSCAAS	GFTFSSYA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISYDGSNK	YYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	TTTTFDS	WGQGTL VTVSS
	SEQ ID NO:	80	1	97	32	114	58	137
	PD1-74A11	QVQLVQSG GGVVQPGRS LRLSCAAS	GFTFSSYA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISYDGSNK	YYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	ARTTFDY	WGQGTL ITVSS
	SEQ ID NO:	95	1	97	32	114	79	140
10	PD1-75C10	QVQLVESG GGVVQPGRS LRLSCAAS	GFTFSSYA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISYDGSNK	YYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VPTTFEY	WGQGSQ VTVSS
	SEQ ID NO:	80	1	97	32	114	57	135
	PD1-74A01	QVQLVESG GGVVQPGRS LRLSCAAS	GFTFSSYA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISYDGSNK	YYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLR EDTAVYYC	VPTTFEY	WGQGSQ VTVSS
	SEQ ID NO:	80	1	97	32	133	57	135
15	PD1-74H12	QVQLVESG GGVVQPGRS LRLSCAAS	GFTFSSYA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISYDGSNK	YYADSVKGRFTISR NSKNMPLYLEMNSLR AEDTAVYYC	VPTTFEY	WGQGSQ VTVSS
	SEQ ID NO:	80	1	97	32	134	57	135

Таблица 5. Варибельные области легкой цепи у клонов PD1

Название	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
PD1-27A12	DIQMTQSPSS VSASVGDRV TITCRAS	RDISRW	LAWYQQKP GEAPKLLIY	GAS	SLRSGVSSRFSGSGS GTDFTLTISLQPED FATYFC	QQGKSF PYT	FGQGTK VDIK
SEQ ID NO:	270	198	295	223	316	242	356
PD1-27B1	DIVMTQTPLS SPVTLGQPAS ISCRSS	QSLVH	LNWFHQR GQPRLLIH	KIS	NRVSGVPDRFSGSG AGDFTLKISRVEA EDVGVYYC	MQSTQF PYT	FGQGTK VDIK
SEQ ID NO:	271	199	296	224	317	243	356
PD1-28D12	DIQMTQSPSS VSASLGDRV TITCRAS	QAISNW	LTWYQQKP GKAPKLLIY	ATS	SLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPED VATYYC	QQTDSF PLT	FGGGTK VDIK
SEQ ID NO:	272	200	297	225	318	244	357
PD1-29A2	SYELTQSPSV SMSPQTARI TCSGD	ALSKQY	ASWYQLKP GQAPVVVMY	KDT	ERPSGIPDRFSGSSS GTTVTLTISGVQAE DGADYYC	QSITDKS GTDVI	FGGGTK LTVL
SEQ ID NO:	273	201	298	226	319	245	358
PD1-29H3	QLVLTQPS MSEAPGQRV TISCSGG	TSNIGTNA	VNWYQQPP GKAPTLIIY	YDD	RLTSGVSDRFSGSK SGTSASLAISRLQSE DEADYYC	AAWDDS LNGWV	FGGGTK LTVL
SEQ ID NO:	274	202	299	227	320	246	358
PD1-31F3	QFVLTQPPSV SGAPQQRVII SCTGS	SSNIGAGYD	VHWHYQQLP GTAPKVLIIY	GNS	DRPSGVPDRFASAK SATSASLAITGLQA EDEADYYC	QSYDSS LSGYV	FGTGTK VTVL
SEQ ID NO:	275	203	300	228	321	247	359
PD1-32A6	DIQMTQSPSS VSASVGDRV TITCRAS	QGIVSW	LAWYQQKP GKAPRLLIY	RAS	DLETGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPE DVATYYC	QQADSF PLT	FGGGTK VEIK
SEQ ID NO:	270	204	301	229	322	248	360
PD1-41C9	DIVMTQTPLS LPVTPGEAAS ISCRSS	QSLDSE DGNTY	LDWYLQKP GQSPQLIIY	TLS	HRASGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVA EDVGLYYC	LQRMGF PYT	FGQGTK LDIK
SEQ ID NO:	276	205	302	230	323	249	361
PD1-42G4	DIQMTQSPSS LSASVGDRV TITCRAS	QGISSY	LAWYQQKP GKAPKLLIY	AAS	TLQSGVPSRFSGSG SGTDFTLTISLQPE DFATYFC	QQSYTSPRT	FGQGTK LDIK
SEQ ID NO:	277	206	303	231	324	250	361
PD1-44B5	QFVLTQSPSA SGTPGQNI VIVISCSAS	TFNIGTTT	VNWHYQRLP GTAPKLLIY	NYD	QRPSGVPDRFSGSK SGTSASLAISGLQSE DEADYYC	AAWDDS LNAWL	FGGGTK LTVL

	SEQ ID NO:	278	207	304	232	325	251	358
	PD1-45D6	DIVMTQTPLS LPVTPGEAAS ISCRSS	QSLDSD DGKTY	LDWYLQKP GQSPQLLIY	TLS	YRASGVDRFSGSG SGTEFNLRISRVEAE DVGIIYYC	MQRVEF PFT	FGQGTK LDIK
5	SEQ ID NO:	276	208	302	230	326	252	361
	PD1-45F1	SYELTQDPA VSVALGQTV RITCQGD	SLRTHY	ASWYQQKP GQAPILVIY	GKN	NRPSGIPDRFSGSS GNTASLTITAAQAE DEADYYC	NSRDSS GKSLV	FGGGTK LTVL
	SEQ ID NO:	279	209	305	233	327	253	358
	PD1-45F4	SYELTQAPSL SVSPGQTANI ICSGD	NLRTHY	VSWYQQKP GQSPLLVIY	QDT	RRPSGIPARFSGSNS GNTATLISGTQTR DESTYYC	MTWDV DTTSMI	FGGGTK LTVL
10	SEQ ID NO:	280	210	306	234	328	254	358
	PD1-47B8	QSALTQPASV SGSPGQSITIS CTGT	SSDVGG YNY	VSWYQQHP GKAPKLMY	DVS	KRPSGVSNRFGSGK SGNTASLTISGLQA EDEADYYC	SSFTSSSTVV	FGGGTK LTVL
	SEQ ID NO:	281	211	307	235	329	255	358
	PD1-48A6	QFVLTQPPSV SGAPGQRTI SCTGS	RSNFGA GHD	VHWCQQLP GTAPKLLIY	GNN	NRPSGVDRFSGSGK SGTSASLAITGLQA EDEAEYYC	QSYDSSLSAWG	VRRRDQ ADRP
15	SEQ ID NO:	282	212	308	236	330	256	362
	PD1-48A9	DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSS	QSLDSD HDGNTY	LDWYLQKP GQSPQLLIY	TLS	HRASGVDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAE DVGIIYYC	MQRIDFPYT	FGQGTK VEIK
	SEQ ID NO:	283	213	302	230	331	257	363
	PD1-48G6	NFMLTQPPST SGTPGQRTI SCSGR	SSNIGINT	VTWYQQLP GTAPKVLMIY	RDD	QRPSGVDRFSGSR SGISASLAISGLQSE DEADYYC	ASWDDILNGWV	FGGGTKLTVL
20	SEQ ID NO:	284	214	309	237	332	258	358
	PD1-49A2	DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSS	QSLFSD DGNTY	LDWYLQKP GQSPQLLIY	TLS	HRASGVDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAE DVGIIYYC	LQRMGFPHYT	FGQGTKVEIK
	SEQ ID NO:	285	215	302	230	333	249	363
	PD1-49B9	QSALTQPPSA SGSPGQSVTI SCTGT	SSDVGG YNY	VSWYQQHP GKAPKLMY	EVS	KRPSGVDRFSGSGK SGNTASLTVSGLQP EDEADYYC	SSFARNSNYV	FGIGIKVTVL
25	SEQ ID NO:	286	211	307	238	334	259	359
	PD1-51A6	DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCKSS	QSLLYIDGETY	LFWYLQKP GQSPQLLIY	EVS	SRFSGVDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAE DVGVIYYC	MQGIHLPLT	FGQGTIRLEIK
30	SEQ ID NO:	287	216	310	238	335	260	364
	PD1-51D9	DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSS	QSLLHS NGNNY	LDWYLQKP GQSPQLLIY	LGS	YRASGVDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAE DVGIIYYC	MQGLQIPST	FGPGIKVDIK
	SEQ ID NO:	283	217	302	239	336	261	365
	PD1-52E8	SYELTQPLSL SVAPGQTARI TCSGD	ALSKEY	SYWYQQKP GQAPVLMIY	KDS	ERPSGIPERFSGSS GTTVTLTISGVQAE DEADYYC	QSVDDSDISVV	FGGGTKLTVL
35	SEQ ID NO:	288	218	311	240	337	262	358
	PD1-62E1	DIQMTQSPAI LSLSPGERAT LSCRAS	QSVTSD	VAWYQHIR GQAPRLLIY	DAS	NRASGIPARFSGGG SGTEFTLTISSEPE DFAVYYC	QQYNNWPLT	FGGGTKVEIK
	SEQ ID NO:	289	219	312	241	338	263	360
	PD1-72D10	DIVMTQTPLS LPVTPGEAAS ISCRSS	QSLDSD EDGNTY	LDWYLQKP GQSPQLLIY	TLS	HRASGVDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAE DVGIIYYC	MQRVEFPFT	FGQGTKLEIK
40	SEQ ID NO:	276	205	302	230	333	252	366
	PD1-74A11	DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSS	QSLFSDDGNTY	LDWYLQKP GQSPQLLIY	TLS	YRASGVDRFSGSG SGIDFILKISRVAEADVGIIYYC	MQRVEFPFT	FGQGTKVDIK
	SEQ ID NO:	283	215	302	230	353	252	356
	PD1-75C10	DIVMTQTPLS LPVTPGEAAS ISCRSS	QSLDSD EDGNTY	LDWYLQKP GQSPQLLIY	TLS	HRASGVDRFSGSG SGTDFTLKITRVEAE EDVGVIYYC	MQRIEFPYT	FGQGTKLEIK
45	SEQ ID NO:	276	205	302	230	354	264	366
	PD1-74A01	DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSS	QSLDR GGHTY	LDWYLQKP GQSPQLLIY	TLS	HRASGVDRFSGSG SGIDFILKISRVAEADVGIIYYC	MQRKEFPPT	FGPGTKLEIK

SEQ ID NO:	283	222	302	230	333	268	367
PD1-74H12	DIVMTQTPLS LSVTPGEPAS ISCRSS	QSLDSD DGNTY	LDWYLQKP GQSPQLLIY	TLS	HRASGVPDRFSGRG SHTDFLTLISSVEAE DVGVIYC	MQRHFPLT	FGQGITRLEIK
SEQ ID NO:	294	220	302	230	355	269	364

5 Пример 3. Получение человеческих антител к PD-1

1. Преобразование из формата scFv в формат IgG

Для перевода выбранных 15 видов моноклональных фаговых антител к PD1 из фагов в целый IgG-вектор проводили ПЦР (iCycler iQ, BioRad) на тяжелых и легких цепях. В результате получали тяжелые и легкие цепи, а векторы и тяжелые и легкие цепи каждого

10 из клонов разрезали (расщепляли) рестрикционными ферментами. Из каждого вектора и тяжелой цепи выделяли ДНК с помощью набора для экстракции ДНК из геля (Qiagen). Проводили лигирование путем смешивания 1 мкл (10 нг) вектора, 15 мкл (100-200 нг) тяжелой цепи, 2 мкл 10-кратного буфера, 1 мкл лигазы (1 ед./мкл) и дистиллированной воды, а затем инкубации смеси при комнатной температуре в течение 1-2 часов.

15 Полученную смесь вводили в трансформируемые клетки (компетентные клетки, XL1-blue), помещали клетки на лед на 5 мин и подвергали их тепловому шоку при 42°C в течение 90 сек.

После теплового шока к клеткам добавляли 1 мл среды, а затем культивировали клетки при 37°C в течение 1 часа, рассеивали шпателем по чашке с LB Amp и

20 инкубировали при 37°C в течение 16 часов. Полученные при этом колонии инокулировали в 5 мл среды LB Amp, культивировали при 37°C в течение 16 часов и проводили выделение ДНК с помощью набора DNA-prep (Nuclogen). Заказывали анализ последовательностей полученных ДНК (Solgent).

В результате было подтверждено, что последовательности тяжелых цепей и легких

25 цепей у 15 клонов для PD1, переведенных в целые IgG, соответствуют последовательностям фаговых антител 15 клонов, приведенных в таблице 3. Для трансфекции в клетки НЕК293F тяжелые и легкие цепи соответствующих клонов, переведенных в целые IgG, культивировали в 100 мл среды LB Amp и выделяли ДНК с помощью набора Midi-prep (QIAGEN).

30 2. Получение человеческих антител

Клонированные векторы pNATVH и pNATVL в соотношении 6:4 совместно трансфецировали в клетки НЕК293F, на 7-й день собирали супернатанты, удаляли клетки и обломки клеток центрифугированием и через фильтры на 0,22 мкм, а супернатанты собирали и подвергали аффинной хроматографии на белке А для очистки IgG-антител.

35 Антитела после очистки проводили через глициновый буфер и заменяли буфер таким образом, чтобы конечным буфером при ресуспендировании был PBS. Проводили количественное определение очищенных антител методом BCA и Nanodrop, а затем каждое из 15 видов антител наносили в дозе 5 мкг в восстановительных и

40 невосстановительных условиях и анализировали методом SDS-PAGE для определения чистоты и подвижности очищенного белка (фиг. 5).

В результате, как видно из фиг. 5, в невосстановительных условиях все 15 антител детектировались при молекулярной массе 150 кДа и больше, а в качестве контрольного антитела был получен ниволумаб.

Пример 4. Характеристики моноклональных антител к PD-1

45 1. Оценка активности антител

Проводили тестирование выбранных антител на активность с помощью набора для биоанализа блокировки PD1/PD-L1 (Promega, J1250). В 96-луночный планшет высевали клетки линии CHO с высокой экспрессией PD-L1, культивировали в течение 16 часов

или дольше, обрабатывали каждым антителом в серийном разведении при постоянной концентрации, а затем культивировали вместе с клетками линии Jurkat с высокой экспрессией PD-1 человека в течение 6 часов. Определяли степень восстановления ингибирования у антител на спектрофотометре (SpectraMax M5, Molecular Devices, USA) по интенсивности люминесценции, возникающей при расщеплении субстрата люциферазой. Активность 16 видов антител к PD-1, включая контрольное антитело, определяли по значениям для восстановления пониженного сигнала при образовании комплекса PD-1/PD-L1, причем 41C9, 45D6 и 49A2 проявляли активность, близкую контрольному антителу (фиг. 6).

Для измерения активности антител 41C9, 45D6 и 49A2 к PD-1 в зависимости от концентрации делали серийные разведения и опять проводили биоанализ блокирования PD1/PD-L1 по восстановлению пониженного сигнала зависимым от концентрации образом. Степень восстановления выражали в виде EC₅₀ (эффективная концентрация mAb при 50%-м уровне восстановления сигнала) при анализе с помощью Graphpad Prism6, а значения EC₅₀ по способности к восстановлению ингибирования *in vitro* представлены на фиг. 7.

2. Сродство антител к PD1 к гиперэкспрессированным клеткам

Обращаясь к пулам трансформированных клеток с высокой экспрессией PD-1, клетки НЕК293Е трансформировали плазмидой pcDNA3.1, содержащей PD-1 человека (NM_005018.2), и проводили скрининг в селективной среде, содержащей 150 мкг/мл зецина (#R25001, Thermo Fisher). Каждый пул клеток идентифицировали и отбирали методом активируемой флуоресценцией сортировки клеток (FACS) с помощью антитела против PD-1 (#557860, BD) и использовали для таких функциональных анализов, как анализ связывания по FACS или анализ конкуренции по FACS.

Из пулов трансформированных клеток с высокой экспрессией PD-1 человека отбирали образцы по $0,5-1 \times 10^6$ клеток, готовили серийные разведения антител при постоянной степени разведения и проводили реакцию с полученными клетками при 4°C в течение 20 мин. Затем клетки трижды промывали PBS (#LB001-02, Welgene), содержащим 2% фетальной телячьей сыворотки, и проводили реакцию при 4°C в течение 20 мин с антителом против IgG человека (#FI-3000, Vectorlabs), конъюгированным с флуоресцентным веществом FITC (флуоресцеин-изотиоцианат). Клетки опять промывали так же, как описано выше, а затем суспендировали в 0,5 мл PBS, содержащем 2% FBS (#26140-079, Thermo Fisher), и проводили проточную цитометрию на проточном цитометре FACSCanto II (BD Biosciences, USA). При этом все три антитела к PD-1 специфически связывались, а их способность к связыванию определяли по константе равновесной диссоциации (K_d), полученной через функцию анализа Graphpad Prism6.

В результате, как видно из фиг. 8, способность к связыванию у антител при зависимом от концентрации связывании с PD-1 человека, гиперэкспрессированным на клеточной поверхности, можно определять по MFI (средней интенсивности флуоресценции).

3. Скрининг положительных фаговых антител со сходной последовательностью с PD1-45D6 и 49A2

Проводили дополнительный скрининг антител на близость к 45D6 и 49A2, наряду с 41C9, которые проявляли отличную активность и способность к связыванию при анализе методом FACS.

Антитела со сходной последовательностью с PD1-45D6 и 49A2 подвергали дальнейшему скринингу по той же методике, что и в Примере 2. Их характеристики приведены ниже в таблице 6.

Таблица 6. Характеристики проходивших дополнительный скрининг клонов антител, близких к 45D6 и 49A2

Название клона	V _H	Идентичность	V _L	Идентичность	Группа
PD1-72D10	VH3-30	96,90%	O1	94,10%	1
PD1-74A11	VH3-30	97,96%	O1	95,05%	2
PD1-75C10	VH3-30	96,94%	O1	95,05%	3
PD1-74A01	VH3-30	95,92%	O1	92,08%	4
PD1-74H12	VH3-30	94,90%	O1	92,08%	5

4. Сродство антител к PD1 на приборе ProteOn XPR36

Использовали прибор ProteOn XPR36 (BioRad). На приборе устанавливали сенсорный чип GLC (BioRad) и промывали его буфером PBST, а поверхность карбоксиметилдекстрана активировали смесью растворов EDC и сульфо-NHS. На сенсорный чип GLC наносили и иммобилизировали PD1-hFc, растворенный при концентрации 5 мкг/мл в буферном растворе 10 мМ ацетата натрия (pH 5,0).

Для того, чтобы дезактивировать активированные карбоксильные группы, не прореагировавшие с белком PD1, пропускали 1М этаноламин и вводили 10 мМ глицина (pH 2,0) с тем, чтобы смыть белки, не связавшиеся с сенсорным чипом. Затем регистрировали данные для сенсограммы при связывании и диссоциации по времени, пропуская антитела со скоростью подачи 30 мкл/мин (от 30 нМ до 0,123 нМ) в течение 10 мин с помощью буфера PBST.

Рассчитывали равновесные константы диссоциации (K_D) путем нанесения на график и аппроксимации данных по сенсограмме в состоянии равновесия в зависимости от концентрации. При этом 45D6 и 49A2 проявляли значения K_D 0,001 нМ и 0,019 нМ, соответственно, что указывает на высокое сродство к антигену PD1 (фиг. 9).

Пример 5. Оптимизация антител PD1-45D6 и 49A2

1. Получение библиотек для оптимизации антител PD1-45D6 и 49A2

Для оптимизации антител получали новые библиотеки с перетасовкой LC путем иммобилизации тяжелой цепи и введения пула 10^5 - 10^6 легких цепей (LC) от фирмы Ybiologics, Inc. Также проводили оптимизацию антител следующими тремя способами: перетасовки LC; базовой упаковки + перетасовки LC, включая сравнительный анализ остатков в структурно важных сайтах типа гидрофобной сердцевины тяжелых цепей, открытых остатков, кластеров зарядов, солевых мостиков, мутационное превращение их в консервативные остатки, а затем проведение перетасовки LC; и горячих точек CDR + перетасовки LC в случае ДНК переменных областей антител, включая случайный мутагенез мутационных горячих точек, которые часто могут мутировать в процессе созревания сродства *in vivo*, а затем проведение перетасовки LC.

Для получения библиотек с перетасовкой LC расщепляли гены LC антител 45D6 и 49A2 с помощью BstXI и затем использовали их в качестве векторов, а библиотечные пулы фирмы Ybiologics, Inc. расщепляли с помощью BstXI и использовали в качестве вставок. После лигирования с помощью лигазы проводили трансформацию клеток методом электропорации. Библиотеки антител получали, собирая трансформированные клетки на квадратной пластине. При этом получали библиотеки с разнообразием в $1,5 \times 10^7$. Результаты анализа последовательностей показали, что все последовательности HC были идентичными, а последовательности LC отличались друг от друга.

Чтобы получить библиотеки упаковки ядра + перестановки LC, сайты каркаса (FR) антител 45D6 и 49A2 были заменены консервативными аминокислотными последовательностями, гены LC были разрезаны BstX I и затем использованы в качестве

векторов, а пулы библиотеки принадлежащие Ybiologics, Inc. были вырезаны с помощью BstX I, а затем использованы в качестве вставок. После лигирования с лигазой трансформацию осуществляли с использованием клеток для электропорационной трансформации. Библиотеки антител были получены путем сбора трансформированных клеток на квадратной пластине. В результате были получены библиотеки с разнообразием $8,4 \times 10^6$. Результат анализа последовательностей показал, что сайты FR HC были заменены консервативными аминокислотными последовательностями, а последовательности LC отличались друг от друга.

Для получения библиотек ядра горячей точки + тасования LC сайты каркаса (FR) антител 45D6 были заменены консервативными аминокислотными последовательностями, библиотеки с горячими точками в CDR1 были вырезаны с помощью Sfi I и использованы в качестве вставок, а пулы библиотек, принадлежащие Ybiologics, Inc., разрезали с помощью Sfi I и затем использовали в качестве векторов. После лигирования с лигазой трансформацию осуществляли с использованием клеток для электропорационной трансформации. Библиотеки антител были получены путем сбора трансформированных клеток на квадратной пластине. В результате было получено около $5,6 \times 10^6$ различных библиотек. Результат анализа последовательностей показал, что сайты FR HC были заменены консервативными аминокислотными последовательностями, последовательности горячих точек CDR1 были мутированы случайным образом, а последовательности LC отличались друг от друга.

Пример 6. Скрининг человеческих антител к PD-1

1. Подготовка антигенов

В качестве белковых антигенов PD1-hFc и PD1-mFc, полученные на фирме Ybiologics, Inc, и PD1-his (кат. № 10377-H08H), приобретенный у Sino Biological Inc., фиксировали в дозе 50 мкг на иммуносорбционных пробирках, а затем блокировали.

2. Биопэннинг (просеивание)

Получали фаговую библиотеку человеческих антител путем инфицирования бактерий библиотекой scFv человека с разнообразием в $2,7 \times 10^{10}$, а затем культивирования при 30°C в течение 16 ч. Культуральный раствор после культивирования центрифугировали, а супернатант концентрировали с помощью PEG и затем растворяли в буфере PBS для получения библиотеки человеческих антител. Фаговую библиотеку человеческих антител вносили в иммунологическую пробирку и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. После отмывки 1 раз PBS/T и 1 раз PBS элюировались только scFv-фаги, специфически связавшиеся с антигеном.

Элюированными фагами опять инфицировали E. coli и проводили амплификацию (процесс пэннинга), получая пул положительных фагов. Для оптимизации антител проводили только первый раунд пэннинга. В результате, как видно из таблицы 7, оказалось, что количество фагов, связавшихся с антигеном (на выходе) при первом раунде пэннинга, немного повысилось по сравнению с количеством фагов на входе.

Таблица 7. Сравнение титра антител при оптимизационном пэннинге

Образец	Количество фагов на входе	Количество фагов на выходе
45D6 (LS)	$1,3 \times 10^{13}$	$2,8 \times 10^7$
45D6 (базовая упаковка + LS)	$1,1 \times 10^{13}$	$4,8 \times 10^7$
45D6 (горячие точки в CDR + LS)	$1,1 \times 10^{13}$	$3,6 \times 10^6$
49A2 (LS)	$1,3 \times 10^{13}$	$1,8 \times 10^7$
49A2 (горячие точки в CDR + LS)	$1,1 \times 10^{13}$	$1,6 \times 10^6$

3. Скрининг положительных фагов

Колонии, полученные при пэннинге, культивировали в 96-луночном планшете с глубокими лунками на 1 мл (Bioneer, 90030) при 37°C в течение 16 часов. По 100-200 мкл выращенных при этом клеток вносили в среду, содержащую 1 мл 2×YTСМ, 2% глюкозы и 5 мМ MgCl₂, до значения OD₆₀₀ = 0,1, а затем культивировали в глубоком 96-луночном планшете при 37°C в течение 2-3 часов до OD₆₀₀ = 0,5-0,7. Клетки инфицировали фагом-помощником M1 при MOI 1:20 и культивировали в среде, содержащей 2×YTСМК, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ IPTG при 30°C в течение 16 часов.

На 96-луночных иммунопланшетах фиксировали антиген PD1 при плотности 100 нг на лунку при 4°C в течение 16 ч, а затем каждую лунку блокировали раствором PBS с 4% обезжиренного молока. В каждую лунку вносили по 1 мкл моноклонального scFv-фага (100 scFv-фагов) после промывки 0,2 мл PBS/Т и культивирования в течение 16 часов и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч. Лунки опять промывали 4 раза по 0,2 мл PBS/Т, добавляли вторичное антитело против M13-HRP в разведении 1:2000 и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После промывки 0,2 мл PBS/Т проводили развитие окраски и измеряли поглощение при 490 нм.

В результате были получены одиночные фаговые клоны с более высокой способностью к связыванию с каждым антигеном, чем у исходных антител (49A2 или 45D6), а результаты представлены на фиг. 10.

4. Анализ нуклеотидных последовательностей положительных фаговых антител

Из отобранных одиночных клонов выделяли ДНК с помощью набора для очистки ДНК (Qiagen, Germany) и заказывали анализ последовательностей этих ДНК (Solgent). Исходя из результатов анализа последовательностей, идентифицировали участки CDR из V_H и V_L у выбранных антител, и исследовали сходство (идентичность) между этими антителами и группами гаметных антител с помощью программы Ig BLAST на веб-сайте NCBI по адресу <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>. В результате было получено 25 видов фаговых антител (49A2: 10 видов, 45D6: 15 видов) с более высокой способностью к связыванию, чем у исходных антител, а результаты приведены ниже в таблице 8.

Таблица 8. Характеристики моноклонов PD1 от вариантов антител, отобранных при оптимизации

Название клона	V _H	Идентичность	V _L	Идентичность	Группа
PD1-49A2(A/1B2)	VH3-30	92,86%	O1	93,07%	1
PD1-49A2(A/1D11)	VH3-30	91,84%	O1	97,03%	2
PD1-49A2(A/1F12)	VH3-30	92,86%	O1	93,07%	3
PD1-49A2(A/1H4)	VH3-30	92,86%	O1	92,08%	4
PD1-49A2(A/1H8)	VH3-30	92,86%	O1	90,10%	5
PD1-49A2(A/2A6)	VH3-30	91,84%	O1	89,11%	6
PD1-49A2(A/2A11)	VH3-30	93,88%	O1	90,10%	7
PD1-49A2(A/2B9)	VH3-30	92,86%	O1	93,07%	8
PD1-49A2(A/2B10)	VH3-30	93,88%	O1	95,05%	9
PD1-45D6(A/3D2)	VH3-30	93,88%	O1	94,06%	10
PD1-45D6(A/3G1)	VH3-30	93,88%	O1	95,05%	11
PD1-45D6(A/3H4)	VH3-30	93,88%	O1	93,07%	12
PD1-45D6(A/3H6)	VH3-30	93,88%	O1	95,05%	13
PD1-45D6(A/3H7)	VH3-30	93,88%	O1	92,08%	14
PD1-45D6(A/4C1)	VH3-30	94,90%	O1	96,04%	15
PD1-45D6(A/4C9)	VH3-30	94,90%	O1	93,07%	16
PD1-45D6(A/4D4)	VH3-30	94,90%	O1	92,08%	17

	PD1-45D6(A/4H6)	VH3-30	94,90%	O1	95,05%	18
	PD1-49A2(A/2D7)	VH3-30	92,86%	O1	95,05%	19
	PD1-45D6(A/5A6)	VH3-30	91,84%	O1	96,04%	20
	PD1-45D6(A/5B2)	VH3-30	93,88%	O1	94,06%	21
5	PD1-45D6(A/5B5)	VH3-30	92,86%	O1	92,08%	22
	PD1-45D6(A/5B12)	VH3-30	93,88%	O1	94,06%	23
	PD1-45D6(A/5C8)	VH3-30	92,86%	O1	95,05%	24
	PD1-45D6(A/5H9)	VH3-30	92,86%	O1	94,06%	25

Антитела, включая последовательности участков CDR и FR тяжелой и легкой цепи выбранных антител, а также содержащие их переменные области тяжелой цепи и переменные области легкой цепи, представлены ниже в таблицах 9 и 10.

Таблица 9. Переменные области тяжелой цепи у человеческих антител PD1

Название	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
15 PD1-49A2 (A/1B2)	QVQLVESG GGVVQPGRSL RLSCAAS	GF HL RYA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISYDGQDK	YYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	TTTTFDS	WGRGTL VTVSS
SEQ ID NO:	80	17	97	49	114	58	136
PD1-49A2 (A/1D11)	QVQLVESG GGVVQPGRSL RLSCAAS	GF IK NNA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISYDGRHK	YYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	TTTTFDS	WGQGTL VTVSS
SEQ ID NO:	80	18	97	50	114	58	137
20 PD1-49A2 (A/1F12)	QVQLVESG GGVVQPGRSL RLSCAAS	GF IR NYA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISYDGQHK	YYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	TTTTFDS	WSQGTL VTVSS
SEQ ID NO:	80	19	97	51	114	58	145
PD1-49A2 (A/1H4)	QVQLVESG GGVVQPGRSL RLSCAAS	GF IF PIYA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISYDGAHK	YYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	TTTTFDS	WGQGTL VTVSS
SEQ ID NO:	80	20	97	52	114	58	137
25 PD1-49A2 (A/1H8)	QVQLVESG GGVVQPGRSL RLSCAAS	GF IK KIYA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISYDGQHK	YYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	TTTTFDS	WGQGTL VTVSS
SEQ ID NO:	80	21	97	51	114	58	137
PD1-49A2 (A/2A6)	QVQLVESG GGVVQPGRSL RLSCAAS	GF IK KYYA	MHWVRQ APGKGLE WVTV	ISYDGQYK	YYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	TTTTFDS	WGQGTL VTVSS
SEQ ID NO:	80	22	113	53	114	58	137
PD1-49A2 (A/2A11)	QVQLVESG GGVVQPGRSL RLSCAAS	GF IR RSYA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISYDGQDK	YYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	TTTTFDS	WGQGTL VTVSS
SEQ ID NO:	80	23	97	49	114	58	137
35 PD1-49A2 (A/2B9)	QVQLVESG GGVVQPGRSL RLSCAAS	GF HL RYA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISYDGRYK	YYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	TTTTFDS	WGQGTL VTVSS
SEQ ID NO:	80	17	97	54	114	58	137
PD1-49A2 (A/2B10)	QVQLVESG GGVVQPGRSL RLSCAAS	GF IH VYA	MHWVRQ APGKGLEWVAV	ISYDGSHK	YYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	TTTTFDS	WGQGTL VTVSS
SEQ ID NO:	80	24	97	55	114	58	137
40 PD1-49A2 (A/2D7)	QVQLVESG GGVVQPGRSL RLSCAAS	GF IK KIYA	MHWVRQ APGKGLEWVAV	ISYDGQHK	YYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	TTTTFDS	WGQGTL VTVSS
SEQ ID NO:	80	21	97	51	114	58	137
PD1-45D6 (A/3D2)	QVQLVESG GGVVQPGRSL RLSCAAS	GF IF SSYA	MHWVRQ VPGKGLEWVAV	ISYDGNDK	YYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VPTTFEY	WGQGSQ VTVSS
SEQ ID NO:	80	1	96	31	114	57	135
45 PD1-45D6 (A/3G1)	QVQLVESG GGVVQPGRSLRLSCAAS	GF IF SSYA	MHWVRQ VPGKGLEWVAV	ISYDGNDK	YYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VPTTFEY	WGQGSQ VTVSS
SEQ ID NO:	80	1	96	31	114	57	135
PD1-45D6 (A/3H4)	QVQLVESG GGVVQPGRSL	GF IF SSYA	MHWVRQ VPGKGLE	ISYDGNDK	YYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLR	VPTTFEY	WGQGSQ VTVSS

	RLSCAAS		WVAV		AEDTAVYYC		
SEQ ID NO:	80	1	96	31	114	57	135
5	PD1-45D6 (A/3H6)	QVQLVESG GGVVQPGRSL RLSCAAS	GFIFSSYA	MHWVRQ VPGKGLE WVAV	ISYDGNDK	YYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VPTTFEY WGQGSQ VTVSS
SEQ ID NO:	80	1	96	31	114	57	135
10	PD1-45D6 (A/3H7)	QVQLVESG GGVVQPGRSL RLSCAAS	GFIFSSYA	MHWVRQ VPGKGLE WVAV	ISYDGNDK	YYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VPTTFEY WGQGSQ VTVSS
SEQ ID NO:	80	1	96	31	114	57	135
10	PD1-45D6 (A/4C1)	QVQLVESG GGVVQPGRSL RLSCAAS	GFIFSSYA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISYDGNDK	YYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VPTTFEY WGQGT VTVSS
SEQ ID NO:	80	1	97	31	114	57	137
15	PD1-45D6 (A/4C9)	QVQLVESG GGVVQPGRSL RLSCAAS	GFIFSSYA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISYDGNDK	YYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VPTTFEY WGQGT VTVSS
SEQ ID NO:	80	1	97	31	114	57	137
15	PD1-45D6 (A/4D4)	QVQLVESG GGVVQPGRSL RLSCAAS	GFIFSSYA	MHWVRQ APGKGLEWVAV	ISYDGNDK	YYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VPTTFEY WGQGT VTVSS
SEQ ID NO:	80	1	97	31	114	57	137
20	PD1-45D6 (A/4H6)	QVQLVESG GGVVQPGRSL RLSCAAS	GFIFSSYA	MHWVRQ APGKGLEWVAV	ISYDGNDK	YYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VPTTFEY WGQGT VTVSS
SEQ ID NO:	80	1	97	31	114	57	137
20	PD1-45D6 (A/5A6)	QVQLVESG GGVVQPGRSL RLSCAAS	GFIFRLYA	MHWVRQ APGKGLEWVAV	ISHDGNDK	YYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VPTTFEY WGQGT VTVSS
SEQ ID NO:	80	25	97	56	114	57	137
25	PD1-45D6 (A/5B2)	QVQLVESG GGVVQPGRSL RLSCAAS	GFIFSFYA	MHWVRQ APGKGLEWVAV	ISYDGNDK	YYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VPTTFEY WGQGT VTVSS
SEQ ID NO:	80	26	97	31	114	57	137
25	PD1-45D6 (A/5B5)	QVQLVESG GGVVQPGRSL RLSCAAS	GFIFRIYA	MHWVRQ APGKGLEWVAV	ISYDGNDK	YYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VPTTFEY WGQGT VTVSS
SEQ ID NO:	80	27	97	31	114	57	137
30	PD1-45D6 (A/5B12)	QVQLVESG GGVVQPGRSL RLSCAAS	GFIFSVYA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISYDGNDK	YYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VPTTFEY WGQGT VTVSS
SEQ ID NO:	80	28	97	31	114	57	137
30	PD1-45D6 (A/5C8)	QVQLVESG GGVVQPGRSL RLSCAAS	GFIFMRYA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISYDGNDK	YYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VPTTFEY WGQGT VTVSS
SEQ ID NO:	80	29	97	31	114	57	137
35	PD1-45D6 (A/5H9)	QVQLVESG GGVVQPGRSL RLSCAAS	GFIFWIYA	MHWVRQ APGKGLE WVAV	ISYDGNDK	YYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYC	VPTTFEY WGQGT VTVSS
SEQ ID NO:	80	30	97	31	114	57	137

Таблица 10. Вариабельные области легкой цепи у человеческих антител PD1

Название	FR1	CDR1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
40	PD1-49A2 (A/1B2)	DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSS	QSL LDS DDGNTY	LDWYLQKPG QSPQLLIY	TLS	HRASGVPDRFSGSG SGTEFNLRISRVEAE DVGIIYC	MQRVEFPFT FGQGTK LEIK
SEQ ID NO:	283	220	302	230	339	252	366
45	PD1-49A2 (A/1D11)	DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSS	QSLFDS DDGNTY	LDWYLQKPG QSPQLLIY	TLS	YRASGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAE DVGVIYC	MQRVEFPFT FGQGTK VEIK
SEQ ID NO:	283	215	302	230	340	252	366
45	PD1-49A2 (A/1F12)	DIVMTQTPLS LPVTPGEPASISCRSS	QSL LDS EDGNTY	LDWYLQKPG QSPQLLIY	TLS	HRALGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAE DSGIYC	MQRIEFPYT FGQGTK LEIK
SEQ ID NO:	290	205	302	230	341	264	366

	PD1-49A2 (A/ 1H4)	DIVMTQSPPLS LPVTPGEAAS ISCRSS	QSL LDS EDGNTY	LDWYLQKPG QSPQLLIY	TLS	HRASGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAE DSGIYYC	MQRVEFPYT	FGQGTK LDIK
	SEQ ID NO:	291	205	302	230	342	265	361
5	PD1-49A2 (A/ 1H8)	DIVMTQTPLS LPVTPGEAAS ISCRSS	QSL LD RDGGHTY	VDWYLQKPG QSPRLLIY	TLS	HRALGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEA DDVGLYYC	MQRIEFPFT	FGQGTK VEIK
	SEQ ID NO:	283	221	313	230	343	266	363
	PD1-49A2 (A/ 2A6)	DIVMTQTPPLS LPVTPGEAAS ISCRSS	QSL LDS EDGNTY	LDWYLQKPG QSPQLLIY	TLS	HRASGVPGRFSGSG SGTEFNLRISRVEAE DVGIYYC	MQRVEFPFT	FGQGTK VEIK
	SEQ ID NO:	276	205	314	230	344	252	363
10	PD1-49A2 (A/ 2A11)	DIVMTQTPLS LPVTPGEAAS ISCRSS	QSL FDS DDGNTY	LDWYLQKPG QSPRLLIY	TLS	HRALGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVA EDVGLYYC	LQRMGFPYT	FGQGTK LEIK
	SEQ ID NO:	283	215	315	230	345	249	366
	PD1-49A2 (A/ 2B9)	DIVMTQTPLS LPVTPGEAASISCRSS	QSL LDS EDGNTY	LDWYLQKPG QSPQLLIY	TLS	HRASGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAE DVGVIYYC	MQRRDFPFT	FGQGTK VDIK
	SEQ ID NO:	276	205	302	230	346	267	356
15	PD1-49A2 (A/ 2B10)	DIVMTQTPLS LPVTPGEAAS ISCRSS	QSL LDS DDGNTY	LDWYLQKPG QSPQLLIY	TLS	HRASGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVA EDVGLYYC	MQRVEFPFT	FGQGTK LDIK
	SEQ ID NO:	283	220	302	230	323	252	361
	PD1-49A2 (A/ 2D7)	DIVMTQTPLS LPVTPGEAAS ISCRSS	QSL LD RDGGHTY	VDWYLQKPG QSPRLLIY	TLS	HRALGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEA DNVGLYYC	MQRIEFPFT	FGQGTK VEIK
20	SEQ ID NO:	283	221	313	230	347	266	363
	PD1-45D6 (A/ 3D2)	DIVMTQTPLS LPVTPGEAAS ISCRSS	QSL LDS EDGNTY	LDWYLQKPG QSPQLLIY	TLS	HRASGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAE DVGIYYC	MQRVEFPFT	FGQGTK VEIK
	SEQ ID NO:	276	205	302	230	333	252	363
	PD1-45D6 (A/ 3G1)	DIVMTQTPLS LPVTPGEAAS ISCRSS	QSL LDS EDGNTY	LDWYLQKPG QSPQLLIY	TLS	HRASGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAE DVGVIYYC	MQRVEFPFT	FGQGTK LDIK
25	SEQ ID NO:	283	205	302	230	346	252	361
	PD1-45D6 (A/ 3H4)	DIVMTQTPLS LPVTPGEAAS ISCRSS	QSL FDS DDGNTY	LDWYLQKPG QSPQLLIY	TLS	HRASGVSDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAE DSGIYYC	MQRVEFPFT	FGQGTK LDIK
	SEQ ID NO:	283	215	302	230	348	252	361
30	PD1-45D6 (A/ 3H6)	DIVMTQTPLS LPVTPGEAAS ISCRSS	QSL LDS EDGNTY	LDWYLQKPG QSPQLLIY	TLS	HRASGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAE DVGVIYYC	MQRVEFPFT	FGQGTK LEIK
	SEQ ID NO:	276	205	302	230	349	252	366
	PD1-45D6 (A/ 3H7)	DIVMTQTPLS LPVTPGEAAS ISCRSS	QSL LDS DDGNTY	LDWYLQKPG QSPQLLIY	TLS	HRASGVPGRFSGSG SGTEFNLRISRVEAE DVGIYYC	MQRVEFPFT	FGQGTK LEIK
	SEQ ID NO:	283	220	302	230	344	252	366
35	PD1-45D6 (A/ 4C1)	DIVMTQTPLS LPVTPGEAAS ISCRSS	QSL LDS DDGNTY	LDWYLQKPG QSPQLLIY	TLS	HRASGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAE DVGIYYC	MQRVEFPFT	FGQGTK LDIK
	SEQ ID NO:	283	220	302	230	333	252	361
	PD1-45D6 (A/ 4C9)	DIVMTQTPLS LPVTPGEAAS ISCRSS	QSL LDS EDGNTY	LDWYLQKPG QSPQLLIY	TLS	HRASGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVA EDVGIYYC	MQRVEFPFT	FGQGTK LEIK
40	SEQ ID NO:	276	205	302	230	350	252	366
	PD1-45D6 (A/ 4D4)	DIVMTQTPLS LPVTPGEAAS ISCRSS	QSL LDS EDGNTY	LDWYLQKPG QSPQLLIY	TLS	HRASGVPDRFSGSG SGTEFNLRISRVEAE DVGIYYC	MQRVEFPFT	FGQGTK VDIK
	SEQ ID NO:	283	205	302	230	339	252	356
	PD1-45D6 (A/ 4H6)	DIVMTQTPLS LPVTPGEAAS ISCRSS	QSL FDS DDGNTY	LDWYLQKPG QSPQLLIY	TLS	HRASGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAE DVGLYYC	MQRVEFPFT	FGQGTK LEIK
45	SEQ ID NO:	283	215	302	230	331	252	366
	PD1-45D6 (A/ 5A6)	DIVMTQTPLS LPVTPGEAAS ISCRSS	QSL LDS EDGNTY	LDWYLQKPG QSPQLLIY	TLS	HRASGVPDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAE DVGVIYYC	MQRIDFPYT	FGQGTK LDIK
	SEQ ID NO:	283	205	302	230	349	257	361

	PD1-45D6 (A/5B2)	DIVMTQTPLS PPVTPGEPASI SCRSS	QSL LDS DDGNTY	LDWYLQKPG QSPQLLIY	TLS	HRASGV PDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAE DVGVIYYC	MQR RDFPFT	FGOGTK LDIK
	SEQ ID NO:	292	220	302	230	346	267	361
5	PD1-45D6 (A/5B5)	DIVMTQTPLS LPVMPGEAAA SISCRSS	QSL LDS EDGNTY	LDWYLQKPG QSPQLLIY	TLS	HRASGV PDRFSGSG SGTDFTLKISRVEA DDVGIYYC	MQR VEPFPT	FGOGTK VEIK
	SEQ ID NO:	293	205	302	230	351	252	363
	PD1-45D6 (A/5B12)	DIVMTQTPLS LPVTPGEAAS ISCRSS	QSL LDS EDGNTY	LDWYLQKPG QSPQLLIY	TLS	HRASGV PDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAE DVGVIYYC	MQR VEPFPT	FGOGTK VEIK
	SEQ ID NO:	276	205	302	230	333	252	363
10	PD1-45D6 (A/5C8)	DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSS	QSL LDS EDGNTY	LDWYLQKPG QSPQLLIY	TLS	HRASGV PDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAE DVGVIYYC	MQR VEPFPT	FGOGTK LDIK
	SEQ ID NO:	285	205	302	230	349	252	361
	PD1-45D6 (A/5H9)	DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSS	QSL LDS DDGNTY	LDWYLQKPG QSPQLLIY	TLS	HRASGV SDRFSGSG SGTDFTLKISRVEAE DVGVIYYC	MQR RDFPFT	FGOGTK VEIK
15	SEQ ID NO:	283	220	302	230	352	267	363

Пример 7. Получение человеческих антител к PD-1

1. Преобразование из формата scFv в формат IgG

Для перевода выбранных 25 видов моноклональных фаговых антител к PD1 из фагов в целый IgG-вектор проводили ПЦР (iCycler iQ, BioRad) на тяжелых и легких цепях. В результате получали тяжелые и легкие цепи, а векторы и тяжелые и легкие цепи каждого из клонов разрезали (расщепляли) рестрикционными ферментами. Из каждого вектора и тяжелой цепи выделяли ДНК с помощью набора для экстракции ДНК из геля (Qiagen). Проводили лигирование путем смешивания 1 мкл (10 нг) вектора, 15 мкл (100-200 нг) тяжелой цепи, 2 мкл 10-кратного буфера, 1 мкл лигазы (1 ед./мкл) и дистиллированной воды, а затем инкубации смеси при комнатной температуре в течение 1-2 часов. Полученную смесь вводили в трансформируемые клетки (компетентные клетки, XL1-blue), помещали клетки на лед на 5 мин и подвергали их тепловому шоку при 42°C в течение 90 сек.

После теплового шока к клеткам добавляли 1 мл среды, а затем культивировали клетки при 37°C в течение 1 часа, рассеивали шпателем по чашке с LB Amp и инкубировали при 37°C в течение 16 часов. Полученные при этом колонии инокулировали в 5 мл среды LB Amp, культивировали при 37°C в течение 16 часов и проводили выделение ДНК с помощью набора DNA-prep (Nuclogen). Заказывали анализ последовательностей полученных ДНК (Solgent).

В результате было подтверждено, что последовательности тяжелых цепей и легких цепей у 25 клонов для PD1, переведенных в целые IgG, соответствуют последовательностям фаговых антител. Для трансфекции в клетки НЕК293F тяжелые и легкие цепи соответствующих клонов, переведенных в целые IgG, культивировали в 100 мл среды LB Amp и выделяли ДНК с помощью набора Midi-prep (QIAGEN).

2. Получение человеческих антител

Клонированные векторы rNATVH и rNATVL в соотношении 6:4 совместно трансфецировали в клетки НЕК293F, на 7-й день собирали супернатанты, удаляли клетки и обломки клеток центрифугированием и через фильтры на 0,22 мкм, а супернатанты собирали и подвергали аффинной хроматографии на белке А для очистки IgG-антител. Антитела после очистки проводили через глициновый буфер и заменяли буфер таким образом, чтобы конечным буфером при ресуспендировании был PBS. Проводили количественное определение очищенных антител методом BSA и Nanodrop, а затем каждое из 25 видов антител наносили в дозе 5 мкг в восстановительных и

невосстановительных условиях и анализировали методом SDS-PAGE для определения чистоты и подвижности очищенного белка. Кроме того, некоторые из супернатантов наносили на SDS-PAGE для сравнения скорости экспрессии с исходным антителом, причем большинство антител экспрессировались сильнее, чем исходное антитело, а результаты представлены на фиг. 11.

Пример 8. Характеристики моноклональных антител к PD-1

1. Оценка активности антител

Проводили тестирование выбранных антител на активность с помощью набора для биоанализа блокировки PD1/PD-L1 (Promega, J1250). В 96-луночный планшет высевали клетки линии CHO с высокой экспрессией PD-L1, культивировали в течение 16 часов или дольше, обрабатывали каждым антителом в серийном разведении при постоянной концентрации, а затем культивировали вместе с клетками линии Jurkat с высокой экспрессией PD-1 человека в течение 6 часов. Определяли степень восстановления ингибирования у антител на спектрофотометре (SpectraMax M5, Molecular Devices, USA) по интенсивности люминесценции, возникающей при расщеплении субстрата люциферазой. Активность 24 видов антител к PD-1 определяли по значениям для восстановления пониженного сигнала при образовании комплекса PD-1/PD-L1, причем 45D6-3D2, 45D6-3H7, 45D6-5B2 и 45D6-5B5 из числа антител 45D6 и 49A2-1B2, 49A2-1H8, 49A2-2A6 и 49A2-2B9 из числа антител 49A2 проявляли большую активность, чем исходное антитело, близкую к активности контрольного антитела (фиг. 12).

Для измерения активности 8 видов антител к PD-1 (45D6-3D2, 45D6-3H7, 45D6-5B2, 45D6-5B5, 49A2-1B2, 49A2-1H8, 49A2-2A6, 49A2-2B9) в зависимости от концентрации делали серийные разведения и опять проводили биоанализ блокирования PD1/PD-L1 по восстановлению пониженного сигнала зависимым от концентрации образом. Степень восстановления выражали в виде EC₅₀ (эффektivная концентрация mAb при 50%-м уровне восстановления сигнала) при анализе с помощью Graphpad Prism6, причем 49A2-1B2 проявляло наибольшую способность к восстановлению ингибирования *in vitro* по значению EC₅₀ (фиг. 13, таблица 11).

Таблица 11. Активность моноклонов PD1 от выбранных вариантов антител

Антитело	EC ₅₀ [нМ]	Антитело	EC ₅₀ [нМ]
PD-1-41C9	3,91	PD-1-49A2	3,78
PD-1-45D6	2,00	PD-1-49A2-A-1B2	1,30
PD-1-45D6-A-3D2	2,16	PD-1-49A2-A-1D11	2,89
PD-1-45D6-A-3G1	0,98	PD-1-49A2-A-1F12	1,03
PD-1-45D6-A-3H4	1,67	PD-1-49A2-A-1H4	0,84
PD-1-45D6-A-3H6	1,49	PD-1-49A2-A-1H8	1,21
PD-1-45D6-A-3H7	1,98	PD-1-49A2-A-2A11	0,79
PD-1-45D6-A-4C1	1,76	PD-1-49A2-A-2A6	1,51
PD-1-45D6-A-4C9	2,72	PD-1-49A2-A-2B10	0,65
PD-1-45D6-A-4D4	1,74	PD-1-49A2-A-2B9	1,23
PD-1-45D6-A-4H6	1,19	PD-1-51D9	~4,695
PD-1-45D6-A-5A6	0,92	PD-1-52E8	8,43
PD-1-45D6-A-5B12	0,80	PD-1-62E1	2,73
PD-1-45D6-A-5B2	1,48	PD1-72D10	1,21
PD-1-45D6-A-5B5	1,68	PD1-74A11	1,31
PD-1-45D6-A-5C8	1,44	PD1-75C10	0,81
PD-1-45D6-A-5H9	2,00	PD1-74A01	1,01
PD-1-48A9	8,64	PD1-74H12	0,98

2. Средство антител к PD1 к гиперэкспрессированным клеткам

Обращаясь к пулам трансформированных клеток с высокой экспрессией PD-1, клетки НЕК293Е трансформировали плазмидой pcDNA3.1, содержащей PD-1 человека (NM_005018.2) или PD-L1 человека (NM_014143.2), и проводили скрининг в селективной среде, содержащей 400 мкг/мл зеоцина (#R25001, Thermo Fisher). Каждый пул клеток идентифицировали и отбирали методом активируемой флуоресценцией сортировки клеток (FACS) с помощью антитела против PD-1 (#557860, BD) и использовали для таких функциональных анализов, как анализ связывания по FACS или анализ конкуренции по FACS. Из пулов трансформированных клеток с высокой экспрессией PD-1 человека отбирали образцы по $0,5-1 \times 10^6$ клеток, готовили серийные разведения антител при постоянной степени разведения и проводили реакцию с полученными клетками при 4°C в течение 20 мин. Затем клетки трижды промывали PBS (#LB001-02, Welgene), содержащим 2% фетальной телячьей сыворотки, и проводили реакцию при 4°C в течение 20 мин с антителом против IgG человека (#FI-3000, Vectorlabs), конъюгированным с флуоресцентным веществом FITC (флуоресцеин-изотиоцианат). Клетки опять промывали так же, как описано выше, а затем суспендировали в 0,5 мл PBS, содержащем 2% FBS (#26140-079, Thermo Fisher), и проводили проточную цитометрию на проточном цитометре FACSCanto II (BD Biosciences, USA).

От 0,5 до 1×10^6 клеток на каждый образец получали из пулов трансформированных клеток с высокой экспрессией человеческого PD-1, и антитела серийно разводили с постоянной скоростью разведения и реагировали с полученными клетками при 4°C в течение 20 минут. Затем клетки трижды промывали PBS (#LB001-02, Welgene), содержащим 2% фетальной бычьей сыворотки, и подвергали реакции при 4°C в течение 20 минут с антителом против человеческого IgG (#FI-3000, Vectorlabs), конъюгированным с флуоресцентным веществом FITC (флуоресцеин изотиоцианат). Затем клетки подвергали тому же процессу промывания, что и выше, и затем суспендировали в 0,5 мл PBS, содержащий 2% FBS (#26140-079, Thermo Fisher), с помощью проточного цитометра FACSCanto II (BD Biosciences, США) в качестве проточного цитометра. Определяли способность к связыванию по константе равновесной диссоциации (K_d), полученной через функцию анализа Graphpad Prism6. При этом, как видно из фиг. 15, способность к связыванию у антител при зависимом от концентрации связывании с PD-1 человека, гиперэкспрессированным на клеточной поверхности, можно определять по MFI (средней интенсивности флуоресценции). Как видно из фиг. 14 и 15, антитела, за исключением 49A2 (исходное 49A2), проявляли близкие способности к связыванию.

3. Способность антител ингибировать образование комплекса PD-1/PD-L1 или PD-1/PD-L2 при иммуноадсорбции фермента

В лунки 96-луночного иммунопланшета (#439454, Thermo) вносили PD-1-Fc (S1420, Y-Biologics) или PD-L2-Fc (#10292-H02H, Sino) человека, а затем трижды промывали PBS, содержащим 0,05% Tween-20 (#P9416, Sigma-Aldrich), после чего оставляли на 1 час при комнатной температуре в чистящем растворе, содержащем 4% обезжиренного молока (#232120, Vестon, Dickinson and Company), для блокировки неспецифического связывания. В то же время проводили реакции человеческих PD-L1-His (S1479, Y-Biologics) или PD-1-His (S1352, Y-Biologics) с серийными разведениями антител при постоянной степени разведения при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего оставляли в том же микропланшете при комнатной температуре на 1 час. Затем полученные продукты промывали так же, как и выше, в лунки микропланшета добавляли антитело против биотина-His (#MA1-21315-BTIN, Thermo) в разведении 1:2000 и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа, затем добавляли

антитело против стрептавидина с поли-HRP (#21140, Pierce) в разведении 1:5000 и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа, а затем промывали таким же образом. К продуктам реакции добавляли 100 мкл раствора субстрата TMB (#T0440, Sigma-Aldrich), заслоняли от света и инкубировали при комнатной температуре в течение 3 мин. Добавляли 50 мкл 2,5 М серной кислоты (#S1478, Samchun) для остановки реакции и измеряли поглощение при 450 нм на спектрофотометре GM3000 (Glomax® Discover System, Promega). Результаты представлены на фиг. 16.

4. Сродство антител к PD1 на приборе ProteOn XPR36

Использовали прибор ProteOn XPR36 (BioRad). На приборе устанавливали сенсорный чип GLC (BioRad) и промывали буфером PBST, а поверхность карбоксиметилдекстрана активировали смесью растворов EDC и сульфо-NHS. На сенсорный чип GLC наносили и иммобилизировали PD1-hFc, растворенный при концентрации 5 мкг/мл в буферном растворе 10 мМ ацетата натрия (рН 5,0).

Для того, чтобы дезактивировать активированные карбоксильные группы, не прореагировавшие с белком PD1, пропускали 1М этаноламин и вводили 10 мМ глицина (рН 2,0) с тем, чтобы смыть белки, не связавшиеся с сенсорным чипом. Затем регистрировали данные для сенсограммы при связывании и диссоциации по времени, пропуская антитела со скоростью подачи 30 мкл/мин (от 30 нМ до 0,123 нМ) в течение 10 мин с помощью буфера PBST.

Рассчитывали равновесные константы диссоциации (K_D) путем нанесения на график и аппроксимации данных по сенсограмме в состоянии равновесия в зависимости от концентрации. При этом 49A2 (2B9) проявляло значение K_D 0,001 нМ, что указывает на высокое сродство к антигену PD1 (фиг. 17).

Сродство других антител к белку PD-1 человека, сродство к белку PD-1 обезьян и сродство к белку PD-1 крыс представлены в таблице 12-14.

Таблица 12. Кинетика связывания между белком PD-1 человека и выбранными антителами

Антитело	K_D (М)	K_a (1/Мс)	K_d (1/с)
PD1-49A2	$2,371 \times 10^{-10}$	$3,953 \times 10^5$	$9,372 \times 10^{-5}$
PD1-49A2-1H8	$1,245 \times 10^{-11}$	$2,201 \times 10^5$	$2,741 \times 10^{-6}$
PD1-49A2-1B2	$1,659 \times 10^{-10}$	$3,853 \times 10^5$	$6,390 \times 10^{-5}$
PD1-49A2-2A6	$6,907 \times 10^{-11}$	$3,101 \times 10^5$	$2,142 \times 10^{-5}$
PD1-49A2-2B9	$1,0 \times 10^{-12}$	$3,774 \times 10^5$	$1,00 \times 10^{-7}$
PD1-45D6	$1,0 \times 10^{-12}$	$2,701 \times 10^5$	$1,07 \times 10^{-7}$
PD1-45D6-3D2	$1,0 \times 10^{-12}$	$1,810 \times 10^5$	$1,00 \times 10^{-7}$
PD1-45D6-3H7	$2,530 \times 10^{-11}$	$3,076 \times 10^5$	$7,781 \times 10^{-6}$
PD1-45D6-5B2	$5,818 \times 10^{-11}$	$3,315 \times 10^5$	$1,928 \times 10^{-5}$
PD1-45D6-5B5	$4,773 \times 10^{-11}$	$2,960 \times 10^5$	$1,413 \times 10^{-5}$

Таблица 13. Кинетика связывания между белком PD-1 обезьяны и выбранными антителами

Антитело	K_D (М)	K_a (1/Мс)	K_d (1/с)
PD-1-49A2	$1,0 \times 10^{-12}$	$1,683 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{-7}$
PD-1-49A2-2B9	$1,0 \times 10^{-12}$	$1,853 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{-7}$
PD-1-45D6	$1,0 \times 10^{-12}$	$1,535 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{-7}$

PD-1-45D6-5B2	$1,0 \times 10^{-12}$	$2,078 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{-7}$
---------------	-----------------------	---------------------	----------------------

Таблица 14. Кинетика связывания между белком PD-1 крысы и выбранными антителами

Антитело	K_D (M)	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)
PD-1-49A2-2B9	$4,231 \times 10^{-9}$	$1,478 \times 10^5$	$6,252 \times 10^{-4}$
PD-1-45D6	$2,391 \times 10^{-9}$	$5,544 \times 10^4$	$1,326 \times 10^{-4}$
PD-1-45D6-5B2	$4,590 \times 10^{-9}$	$1,879 \times 10^5$	$8,626 \times 10^{-4}$

10 Пример 9. Определение эпитопов у моноклональных антител к PD-1

Моноклональные scFv-фаги, связывающиеся с антигеном PD1, культивировали в среде, содержащей 2×YTCM, 2% глюкозы и 5 mM MgCl₂, при 37°C в течение 16 часов. Полученные при этом клетки вносили в среду, содержащую 2×YTCM, 2% глюкозы и 5 mM MgCl₂, при OD₆₀₀ = 0,1, а затем культивировали при 37°C в течение 2-3 часов до 15 OD₆₀₀ = 0,5-0,7. Клетки инфицировали фагом-помощником M1 при MOI 1:20 и культивировали в среде, содержащей 2×YTCMK, 5 mM MgCl₂ и 1 mM IPTG, при 30°C в течение 16 часов.

На 96-луночных иммунопланшетах фиксировали антиген PD1 дикого типа (WT) или 20 некоторые варианты (фиг. 18) при плотности 100 нг на лунку при 4°C в течение 16 ч, а затем блокировали лунки раствором PBS с 4% обезжиренного молока. Каждую лунку промывали 0,2 мл PBS/Т, а затем вносили одиночный клон scFv-фага (по 100 scFv-фагов) после культивирования в течение 16 часов, в дозе 100 мкл и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. Лунки опять промывали 4 раза по 0,2 мл PBS/Т, 25 добавляли вторичное антитело против M13-HRP в разведении 1:2000 и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. После промывки 0,2 мл PBS/Т проводили развитие окраски и измеряли поглощение при 490 нм.

В результате оказалось, что выбранные одиночные клоны scFv-фагов, контрольный scFv-фаг и варианты PD-1 проявляли разные характеристики связывания, следовательно, 30 они содержат разные эпитопы (фиг. 19).

На 96-луночных иммунопланшетах фиксировали антиген PD1 дикого типа (WT) или 35 некоторые варианты (фиг. 18) при плотности 100 нг на лунку при 4°C в течение 16 ч, а затем блокировали лунки раствором PBS с 4% обезжиренного молока. Каждую лунку промывали 0,2 мл PBS/Т, а затем вносили одиночный клон scFv-фага после культивирования в течение 16 ч в дозе 100 мкл (1 мкг/мл) и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. Лунки опять промывали 4 раза по 0,2 мл PBS/Т, добавляли вторичное антитело против Fab в разведении 1:2000 и инкубировали при 40 комнатной температуре в течение 1 часа. После промывки 0,2 мл PBS/Т проводили развитие окраски и измеряли поглощение при 490 нм.

В результате оказалось, что контрольный scFv-фаг и варианты PD-1 проявляют 40 разные характеристики связывания, следовательно, они содержат разные эпитопы (фиг. 20).

Пример 10. Специфическое связывание исходного антитела к PD-1

Для определения способности к связыванию у исходного антитела к PD1 и 45 контрольного антитела (ниволумаб) с другими антигенами, чем антиген PD1 (таблица 15), на 96-луночных иммунопланшетах фиксировали около 90 неспецифических антигенов при плотности 100 нг на лунку при 4°C в течение 16 часов и блокировали соответствующие лунки раствором PBS с 4% обезжиренного молока. Лунки промывали

0,2 мл PBS/T, а затем в каждую лунку вносили исходное антитело и контрольное антитело в дозе 100 мкл (1 мкг/мл) и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. Лунки опять промывали 4 раза по 0,2 мл PBS/T, а затем добавляли вторичное антитело против каппа с HRP в разведении 1:2000 и инкубировали при 5 комнатной температуре в течение 1 часа. После промывки 0,2 мл PBS/T проводили развитие окраски и измеряли поглощение при 490 нм.

Таблица 15

Fc	GP1BA	LRRN4	TLR3	LRTM1	TPBG	SEMA6A	SEMA5A	SLITRK5	EPYC	LINGO1	OGN
OPTC	RTN4RL1	LRR4C	LRRTM2	TLR4	TLR7	TLR9	LRRN1	SLITRK2	FZD10	C2orf28	SUSDI
FSTL3	SPOCK1	CD209	CD97	SCARF1	WIF1	TNR	EMR1	SPARC	DNER	BAMBI	FSTL1
Kremen1	CFC1	TMEFF2	NRG4	SPOCK2	CD40LG	FASLG	TNFSF4	GREM1	Fc	LRP11	LRP12
APCDD1	CHRD1	DKK4	DMP1	LRP6	TNFSF9	TNFSF8	TNF	TNFSF12	TMED1	CD320	SOST
C18orf1	OSTM1	NBL1	DKK3	ECM1	TNFSF18	TNFSF13	DKK1	SELP	HAPLN4	ULBP1	SPINT2
PLXDC1	PLXDC2	PODXL	CDCP1	PI3	WFDC2	AGR2	AGR3	CREG1	EVI2A	RAET1E	MICA
CD86	ICOSLG	CD276	PDCD1	BTN2A1	BTN3A2	BTN3A1	BTN19	BTN3A3	BTN1A1	Fc	пусто

В результате оказалось, что и контрольное антитело, и исходное антитело

специфически связываются только с антигеном PD1 и не связываются с неспецифическими антигенами (фиг. 21).

Пример 11. Сравнение продуктивности в системе краткосрочной экспрессии моноклональных антител к PD1

5 Как оказалось, оптимизированные антитела обладают сравнительно однородной и высокой продуктивностью благодаря превосходным физическим свойствам при получении и очистке в системе краткосрочной экспрессии. Некоторые антитела обладают большей продуктивностью, чем обычные коммерчески доступные антитела (фиг. 22).

Пример 12. Повышение активности под действием моноклональных антител к PD1 при аллогенной реакции MLR

10 Смешивали Т-клетки с происходящими из моноцитов дендритными клетками, выделенными от разных людей, в соотношении 1:10 и культивировали в течение 5 дней, а затем измеряли количество γ -интерферона в культуральной среде. При этом культуральные среды, содержащие исходные антитела 45D6 и 49A2, проявляли зависимое от концентрации повышение количества γ -интерферона (фиг. 23).

Пример 13. Испытание моноклональных антител к PD1 на термостабильность

Белок антител разводили в DPBS до 3 мкМ, отбирали 45 мкл и смешивали с 5 мкл 200-кратного красителя Sypro Orange (#S6650, Thermo), а затем по 50 мкл вносили в пробирки для qPCR (#B77009, B57651, Bioplastics). Проводили количественный ПЦР (qPCR) в реальном времени на установке BioRad CFX96. Условия qPCR задавали 20 следующим образом: реакция при 25°C в течение 30 сек, повышение температуры на 1°C вплоть до 99°C и в то же время реакция при каждой температуре в течение 1 мин, а затем заключительная реакция при 25°C в течение 10 сек. В качестве константы, характеризующей разупорядочение структуры антител, использовали Tm (температура 25 плавления). Результаты представлены ниже в таблице 16.

Таблица 16

Образец	Tm
Пембролизумаб	63
Опдиво	64
45D6	63
49A2	63
49A2-2B9	64

Промышленная применимость

35 Новые антитела, связывающиеся с PD-1, либо их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут связываться с PD-1 и ингибировать активность PD-1, поэтому они применимы для разработки иммунотерапевтических средств от различных заболеваний, связанных с PD-1.

40 Хотя конкретные конфигурации настоящего изобретения были описаны подробно, однако специалистам в данной области должно быть ясно, что данное описание приводится в качестве предпочтительных воплощений для иллюстративных целей и не должно рассматриваться как ограничивающее объем настоящего изобретения. Таким образом, существенный объем настоящего изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения и её эквивалентами.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

45 <110> Y-BIOLOGICS INC.

<120> NOVEL ANTIBODY AGAINST PROGRAMMED CELL DEATH PROTEIN (PD-1), AND USE THEREOF

<130> PF-B2149

<140> PCT/KR2017/008494
<141> 2017-08-07
<150> KR10-2016-0100210
<151> 2016-08-05
5 <160> 420
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 8
<212> PRT
10 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 1
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
15 1 5
<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
20 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 2
Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr Ala
1 5
25 <210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
30 <223> Artificial Sequence
<400> 3
Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Gly
1 5
<210> 4
35 <211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
40 <400> 4
Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5
<210> 5
<211> 8
45 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence

<400> 5
Gly Asp Thr Phe Thr Arg Asn Ala
1 5
<210> 6
5 <211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
10 <400> 6
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr
1 5
<210> 7
<211> 8
15 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 7
20 Gly Tyr Thr Phe Asn Ser Tyr Tyr
1 5
<210> 8
<211> 8
<212> PRT
25 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 8
Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr Ala
30 1 5
<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
35 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 9
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asp
1 5
40 <210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
45 <223> Artificial Sequence
<400> 10
Gly Phe Thr Val Ser Arg Asn Ser
1 5

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
5 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 11
Gly Asp Thr Phe Thr Arg Tyr Ile
1 5
10 <210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
15 <223> Artificial Sequence
<400> 12
Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr Ala
1 5
<210> 13
20 <211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
25 <400> 13
Gly Phe Thr Phe Glu Asp Tyr Ala
1 5
<210> 14
<211> 8
30 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 14
35 Gly Leu Ser Phe Ser Ser Tyr Trp
1 5
<210> 15
<211> 8
<212> PRT
40 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 15
Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp
45 1 5
<210> 16
<211> 8
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 16
5 Gly Phe Thr Phe Gly Asp His Pro
1 5
<210> 17
<211> 8
<212> PRT
10 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 17
Gly Phe Thr Phe Leu Arg Tyr Ala
15 1 5
<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
20 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 18
Gly Phe Thr Phe Lys Asn Asn Ala
1 5
25 <210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
30 <223> Artificial Sequence
<400> 19
Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr Ala
1 5
<210> 20
35 <211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
40 <400> 20
Gly Phe Thr Phe Pro Ile Tyr Ala
1 5
<210> 21
<211> 8
45 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence

<400> 21
Gly Phe Thr Phe Lys Thr Tyr Ala
1 5
<210> 22
5 <211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
10 <400> 22
Gly Phe Thr Phe Lys Tyr Tyr Ala
1 5
<210> 23
<211> 8
15 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 23
20 Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr Ala
1 5
<210> 24
<211> 8
<212> PRT
25 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 24
Gly Phe Thr Phe Leu Val Tyr Ala
30 1 5
<210> 25
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
35 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 25
Gly Phe Thr Phe Arg Leu Tyr Ala
1 5
40 <210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
45 <223> Artificial Sequence
<400> 26
Gly Phe Thr Phe Ser Phe Tyr Ala
1 5

<210> 27
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
5 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 27
Gly Phe Thr Phe Arg Thr Tyr Ala
1 5
10 <210> 28
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
15 <223> Artificial Sequence
<400> 28
Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr Ala
1 5
20 <210> 29
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
25 <400> 29
Gly Phe Thr Phe Met Arg Tyr Ala
1 5
<210> 30
<211> 8
30 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 30
35 Gly Phe Thr Phe Trp Thr Tyr Ala
1 5
<210> 31
<211> 8
<212> PRT
40 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 31
Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asp Lys
45 1 5
<210> 32
<211> 8
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 32
5 Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1 5
<210> 33
<211> 8
<212> PRT
10 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 33
Ile Ser Trp Asn Ser Gly Arg Ile
15 1 5
<210> 34
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
20 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 34
Ile Ser Trp Asn Ser Gly Thr Ile
1 5
25 <210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
30 <223> Artificial Sequence
<400> 35
Ile Ile Pro Leu Phe Ser Thr Ala
1 5
<210> 36
35 <211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
40 <400> 36
Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ser Ala
1 5
<210> 37
<211> 8
45 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence

<400> 37
Ile Ser Ala Ser Gly Asn Ser Ile
1 5
<210> 38
5 <211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
10 <400> 38
Ile Asn Pro Ser Asp Gly Ser Ala
1 5
<210> 39
<211> 8
15 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 39
20 Ile Ser Trp Asn Ser Asn Asn Ile
1 5
<210> 40
<211> 8
<212> PRT
25 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 40
Leu His Ala Asp Ser Gly Lys Thr
30 1 5
<210> 41
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
35 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 41
Ile Phe Ser Gly Gly Thr Thr Lys
1 5
40 <210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
45 <223> Artificial Sequence
<400> 42
Val Ile Pro Thr Leu Gly Leu Thr
1 5

<210> 43
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
5 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 43
Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Lys Ile
1 5
10 <210> 44
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
15 <223> Artificial Sequence
<400> 44
Ile Ser Trp Asn Ser His Asn Ile
1 5
<210> 45
20 <211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
25 <400> 45
Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys
1 5
<210> 46
<211> 8
30 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 46
35 Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr
1 5
<210> 47
<211> 8
<212> PRT
40 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 47
Ile Ser Trp Asn Ser Gly Thr Pro
45 1 5
<210> 48
<211> 8
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 48
5 Ile Arg Ser Lys Ala Tyr Gly Glu
1 5
<210> 49
<211> 8
<212> PRT
10 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 49
Ile Ser Tyr Asp Gly Gln Asp Lys
15 1 5
<210> 50
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
20 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 50
Ile Ser Tyr Asp Gly Arg His Lys
1 5
25 <210> 51
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
30 <223> Artificial Sequence
<400> 51
Ile Ser Tyr Asp Gly Gln His Lys
1 5
<210> 52
35 <211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
40 <400> 52
Ile Ser Tyr Asp Gly Ala His Lys
1 5
<210> 53
<211> 8
45 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence

<400> 53
Ile Ser Tyr Asp Gly Gln Tyr Lys
1 5
<210> 54
5 <211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
10 <400> 54
Ile Ser Tyr Asp Gly Arg Tyr Lys
1 5
<210> 55
<211> 8
15 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 55
20 Ile Ser Tyr Asp Gly Ser His Lys
1 5
<210> 56
<211> 8
<212> PRT
25 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 56
Ile Ser His Asp Gly Asn Asp Lys
30 1 5
<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
35 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 57
Val Pro Thr Thr Phe Glu Tyr
1 5
40 <210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
45 <223> Artificial Sequence
<400> 58
Thr Thr Thr Thr Phe Asp Ser
1 5

<210> 59
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
5 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 59
Ala Arg Ser Gln Gln Gln Ile Leu Asp Tyr
1 5 10
10 <210> 60
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
15 <223> Artificial Sequence
<400> 60
Ala Arg Ser Ile Arg Gln Ile Leu Asp Tyr
1 5 10
20 <210> 61
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
25 <220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(6)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<400> 61
30 Ala Arg Ser Leu Pro Xaa Ser Arg Ser Arg Leu Asp Val
1 5 10
<210> 62
<211> 14
<212> PRT
35 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<220>
<221> misc_feature
40 <222> (4)..(4)
<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
<400> 62
Ala Arg Ala Xaa Thr Ser Pro Leu Asp Met Ser Leu Asp Tyr
1 5 10
45 <210> 63
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 63
Ala Arg Leu Leu His Gln Met Asn Glu His Glu Phe Met Asp Val
5 1 5 10 15
<210> 64
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
10 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 64
Ala Lys His Lys Gly Leu Pro Phe Asp Trp Ser Pro Asp Gly Phe Asp
1 5 10 15
15 Thr
<210> 65
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
20 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 65
Ala Arg Thr Ile Glu Gly Ala Phe Asp Ile
1 5 10
25 <210> 66
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
30 <223> Artificial Sequence
<400> 66
Val Thr Ser Gly Pro Phe Gly Glu Phe Arg Asn
1 5 10
<210> 67
35 <211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
40 <400> 67
Ala Arg Leu Met His Thr Phe Ser Val Gln Tyr Phe Leu Asp Val
1 5 10 15
<210> 68
<211> 19
45 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence

<400> 68
 Ala Arg Asp Gly Asn Tyr Tyr Asp Ser Arg Gly Tyr Tyr Tyr Asp Thr
 1 5 10 15
 Phe Asp Met
 5 <210> 69
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 10 <223> Artificial Sequence
 <400> 69
 Ala Arg Gly Ala Leu Thr Pro Leu Asp Val
 1 5 10
 <210> 70
 15 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 20 <400> 70
 Ala Arg Gly Thr His Trp Leu Asp Ser
 1 5
 <210> 71
 <211> 17
 25 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 71
 30 Ala Arg Glu Glu Gln Phe Leu Ile Ala Leu Ala Gly Arg Tyr Phe Asp
 1 5 10 15
 Tyr
 <210> 72
 <211> 11
 35 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 72
 40 Ala Arg Gly Tyr Gly Ser Gly Ala Phe Asp Ile
 1 5 10
 <210> 73
 <211> 11
 <212> PRT
 45 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 73

Ala Arg Ile Gly Tyr Lys Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10
 <210> 74
 <211> 9
 5 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 74

10 Ser Thr Ser Gly Leu Gly Val His Ala
 1 5
 <210> 75
 <211> 11
 <212> PRT
 15 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 75

Ala Arg Asp Ser Phe Gly Gly His Leu Asp Leu
 20 1 5 10
 <210> 76
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 25 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 76

Ala Arg Glu Gly Asp Gly Ser Tyr Trp Gly Tyr Phe Asp Ser
 30 1 5 10
 <210> 77
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 35 <223> Artificial Sequence
 <400> 77

Ala Arg Gly His Asn Tyr Leu Asp Ser Ser Tyr Tyr Asp Tyr
 40 1 5 10
 <210> 78
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 45 <400> 78

Ala Ser Val Ser Tyr Cys Ser Gly Gly Ser Cys Tyr Gln Gly Thr Phe
 1 5 10 15
 Asp Tyr

<210> 79
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
5 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 79
Ala Arg Thr Thr Phe Asp Tyr
1 5
10 <210> 80
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
15 <223> Artificial Sequence
<400> 80
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 20 25
<210> 81
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
25 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 81
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
30 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25
<210> 82
<211> 25
<212> PRT
35 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 82
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
40 1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25
<210> 83
<211> 25
45 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence

<400> 83
 Gln Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asn Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 5 20 25
 <210> 84
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 10 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 84
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 15 20 25
 <210> 85
 <211> 25
 <212> PRT
 20 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 85
 Gln Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 25 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25
 <210> 86
 <211> 25
 30 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 86
 35 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser
 20 25
 <210> 87
 40 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 45 <400> 87
 Gln Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20 25
 <210> 88
 <211> 25
 <212> PRT
 5 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 88
 Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 10 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 20 25
 <210> 89
 <211> 25
 15 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 89
 20 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25
 <210> 90
 25 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 30 <400> 90
 Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
 20 25
 35 <210> 91
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 40 <223> Artificial Sequence
 <400> 91
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 45 20 25
 <210> 92
 <211> 25
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 92
 5 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser
 20 25
 <210> 93
 10 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 15 <400> 93
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Asn Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25
 20 <210> 94
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 25 <223> Artificial Sequence
 <400> 94
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Gly Ser
 30 20 25
 <210> 95
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 35 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 95
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 40 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 20 25
 <210> 96
 <211> 17
 <212> PRT
 45 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 96

RU 2 725 950 C1

Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10 15
 Val
 <210> 97
 5 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 10 <400> 97
 Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10 15
 Val
 <210> 98
 15 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 20 <400> 98
 Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 99
 25 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 30 <400> 99
 Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10 15
 Ser
 <210> 100
 35 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 40 <400> 100
 Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 101
 45 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> Artificial Sequence
 <400> 101
 Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Met Ala
 1 5 10 15
 5 Asp
 <210> 102
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 10 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 102
 Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10 15
 15 Asp
 <210> 103
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 20 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 103
 Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10 15
 25 Ile
 <210> 104
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 30 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 104
 Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10 15
 35 Gly
 <210> 105
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 40 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 105
 Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Gln Ala Pro Glu Trp Met Gly
 1 5 10 15
 45 Trp
 <210> 106
 <211> 17
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 106
 5 Met Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val Ser
 1 5 10 15
 Leu
 <210> 107
 <211> 17
 10 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 107
 15 Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10 15
 Arg
 <210> 108
 <211> 17
 20 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 108
 25 Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10 15
 Ser
 <210> 109
 <211> 17
 30 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 109
 35 Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10 15
 Asn
 <210> 110
 <211> 17
 40 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 110
 45 Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met Gly
 1 5 10 15
 Glu
 <210> 111

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 5 <223> Artificial Sequence
 <400> 111
 Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 1 5 10 15
 Gly
 10 <210> 112
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 15 <223> Artificial Sequence
 <400> 112
 Leu Thr Trp Val Arg Gln Ile Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly
 1 5 10 15
 Phe
 20 <210> 113
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 25 <223> Artificial Sequence
 <400> 113
 Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Thr
 1 5 10 15
 Val
 30 <210> 114
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 35 <223> Artificial Sequence
 <400> 114
 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 1 5 10 15
 Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 40 20 25 30
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 35
 <210> 115
 <211> 38
 45 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence

<400> 115
 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 1 5 10 15
 Pro Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 5 20 25 30
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 35
 <210> 116
 <211> 38
 10 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 116
 15 Val Tyr Ala Asp Ser Met Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 1 5 10 15
 Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 20 25 30
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 35
 <210> 117
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 25 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 117
 Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 1 5 10 15
 30 Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 20 25 30
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 35
 <210> 118
 35 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 40 <400> 118
 His Ser Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu
 1 5 10 15
 Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 20 25 30
 45 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 35
 <210> 119
 <211> 38

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 5 <400> 119
 Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Leu Thr Leu Thr Ala Asp Val
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 20 25 30
 10 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 35
 <210> 120
 <211> 38
 <212> PRT
 15 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 120
 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 20 1 5 10 15
 Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Ser Glu Asp
 20 25 30
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 35
 25 <210> 121
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 30 <223> Artificial Sequence
 <400> 121
 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 1 5 10 15
 Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 35 20 25 30
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 35
 <210> 122
 <211> 38
 40 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 122
 45 Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Ser Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 20 25 30

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35
<210> 123
<211> 38
5 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 123
10 Lys Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
1 5 10 15
Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
20 25 30
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
15 35
<210> 124
<211> 38
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
20 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 124
Gly Tyr Ala Gln Thr Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr
1 5 10 15
25 Ser Ile Asp Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
20 25 30
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35
<210> 125
30 <211> 38
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
35 <400> 125
Tyr Lys Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
1 5 10 15
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
20 25 30
40 Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
35
<210> 126
<211> 38
<212> PRT
45 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 126

RU 2 725 950 C1

Thr Tyr Ala Gln Asn Phe Gln Asp Thr Val Thr Ile Ile Ala Asp Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu Leu Lys Asn Leu Arg Ser Glu Asp
 20 25 30
 5 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 35
 <210> 127
 <211> 38
 <212> PRT
 10 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 127
 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn
 15 1 5 10 15
 Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 20 25 30
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 35
 20 <210> 128
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 25 <223> Artificial Sequence
 <400> 128
 Ala Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 1 5 10 15
 Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 30 20 25 30
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 35
 <210> 129
 <211> 38
 35 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 129
 40 Tyr Tyr Val Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 1 5 10 15
 Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 20 25 30
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 45 35
 <210> 130
 <211> 38
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 130
 5 Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Ser Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys
 1 5 10 15
 Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 20 25 30
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 10 35
 <210> 131
 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 15 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 131
 Gly Tyr Ala Asp Ser Val Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 1 5 10 15
 20 Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 20 25 30
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 35
 <210> 132
 25 <211> 38
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 30 <400> 132
 Thr Thr Glu Tyr Ala Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 1 5 10 15
 Asp Asp Ser Lys Ser Ile Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
 20 25 30
 35 Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 35
 <210> 133
 <211> 38
 <212> PRT
 40 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 133
 Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 45 1 5 10 15
 Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 20 25 30
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

35
<210> 134
<211> 38
<212> PRT
5 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 134
Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
10 1 5 10 15
Ser Lys Asn Met Leu Tyr Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
20 25 30
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
35
15 <210> 135
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
20 <223> Artificial Sequence
<400> 135
Trp Gly Gln Gly Ser Gln Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 136
25 <211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
30 <400> 136
Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 137
<211> 11
35 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 137
40 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 138
<211> 11
<212> PRT
45 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 138

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 139
<211> 11
5 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 139

10 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 140
<211> 11
<212> PRT
15 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 140

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Ile Thr Val Ser Ser
20 1 5 10
<210> 141
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
25 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 141

Trp Gly Leu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
30 1 5 10
<210> 142
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
35 <223> Artificial Sequence
<400> 142

Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser
40 1 5 10
<210> 143
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
45 <400> 143

Trp Gly Gln Gly Thr Met Ile Thr Val Ser Ser
1 5 10
<210> 144

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 5 <223> Artificial Sequence
 <400> 144
 Trp Gly Gln Gly Thr Pro Ile Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 145
 10 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 15 <400> 145
 Trp Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10
 <210> 146
 <211> 114
 20 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 146
 25 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 30 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 35 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Pro Thr Thr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Gln Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser
 40 <210> 147
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 45 <223> Artificial Sequence
 <400> 147
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

RU 2 725 950 C1

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 5 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro 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
 10 85 90 95
 Thr Thr Thr Thr Phe Asp Ser Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser
 <210> 148
 15 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 20 <400> 148
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 20 25 30
 25 Ala Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Arg Ile Val Tyr Ala Asp Ser Met
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 30 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 Ser Gln Gln Gln Ile Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 35 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 149
 <211> 117
 <212> PRT
 40 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 149
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 45 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

RU 2 725 950 C1

35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Arg Ile Val Tyr Ala Asp Ser Met
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 5 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 Ser Ile Arg Gln Ile Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 10 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 150
 <211> 120
 <212> PRT
 15 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (102)..(102)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid
 <400> 150
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 25 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Arg Ile Val Tyr Ala Asp Ser Met
 30 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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
 35 Ala Arg Ser Leu Pro Xaa Ser Arg Ser Arg Leu Asp Val Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 151
 40 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (100)..(100)
 <223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

RU 2 725 950 C1

<400> 151
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
 5 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Arg Ile Val Tyr Ala Asp Ser Met
 50 55 60
 10 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser 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 Ala Xaa Thr Ser Pro Leu Asp Met Ser Leu Asp Tyr Trp Gly
 15 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 152
 <211> 122
 20 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 152
 25 Gln Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asn Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 30 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Trp Asn Ser Gly Thr Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 35 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Leu His Gln Met Asn Glu His Glu Phe Met Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 40 115 120
 <210> 153
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 45 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 153
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

RU 2725 950 C1

1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 5 35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Leu Phe Ser Thr Ala His Ser Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 10 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys His Lys Gly Leu Pro Phe Asp Trp Ser Pro Asp Gly Phe Asp
 100 105 110
 Thr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 15 115 120
 <210> 154
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 20 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 154
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 25 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Asp Thr Phe Thr Arg Asn
 20 25 30
 Ala Val Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Ala Asp Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ser Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 30 50 55 60
 Gln Gly Arg Leu Thr Leu Thr Ala Asp Val Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 35 Ala Arg Thr Ile Glu Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 155
 40 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 45 <400> 155
 Gln Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

RU 2 725 950 C1

20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
5 50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
10 Thr Thr Thr Thr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Ile Thr Val
100 105 110
Ser Ser
<210> 156
<211> 118
15 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 156
20 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30
Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
25 35 40 45
Ser Asp Ile Ser Ala Ser Gly Asn Ser Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
30 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Thr Ser Gly Pro Phe Gly Glu Phe Arg Asn Trp Gly Leu Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
35 115
<210> 157
<211> 122
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
40 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 157
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
45 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

RU 2725 950 C1

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
5 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Leu Met His Thr Phe Ser Val Gln Tyr Phe Leu Asp Val Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
10 115 120
<210> 158
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
15 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 158
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
20 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
25 50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
30 Val Pro Thr Thr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Gln Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser
<210> 159
<211> 126
35 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 159
40 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Asn Ser Tyr
20 25 30
Tyr Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
45 35 40 45
Gly Ile Ile Asn Pro Ser Asp Gly Ser Ala Thr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Ser Asp Thr Ser Thr Ser Ser Val Tyr

RU 2 725 950 C1

65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gly Asn Tyr Tyr Asp Ser Arg Gly Tyr Tyr Tyr Asp Thr
 5 100 105 110
 Phe Asp Met Trp Gly Gln Gly Thr Leu Ile Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 <210> 160
 <211> 117
 10 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 160
 15 Gln Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 20 35 40 45
 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Asn Asn Ile Lys Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 25 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Ala Leu Thr Pro Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Pro
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 30 115
 <210> 161
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 35 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 161
 Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 40 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Ser Gly Gln Ala Pro Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Leu His Ala Asp Ser Gly Lys Thr Gly Tyr Ala Gln Thr Phe
 45 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

RU 2 725 950 C1

85 90 95
Ala Arg Gly Thr His Trp Leu Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
5 115
<210> 162
<211> 123
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
10 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 162
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
15 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Arg Asn
20 25 30
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Pro Glu Trp Val
35 40 45
Ser Leu Ile Phe Ser Gly Gly Thr Thr Lys Tyr Lys Asp Ser Val Lys
20 50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95
25 Arg Glu Glu Gln Phe Leu Ile Ala Leu Ala Gly Arg Tyr Phe Asp Tyr
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
<210> 163
30 <211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
35 <400> 163
Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Asp Thr Phe Thr Arg Tyr
20 25 30
40 Ile Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Arg Val Ile Pro Thr Leu Gly Leu Thr Thr Tyr Ala Gln Asn Phe
50 55 60
Gln Asp Thr Val Thr Ile Ile Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
45 65 70 75 80
Met Glu Leu Lys Asn Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Tyr Gly Ser Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110
 Met Ile Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 164
 5 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 10 <400> 164
 Gln Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr
 20 25 30
 15 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Lys Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 20 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 Ile Gly Tyr Lys Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 25 Met Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 165
 <211> 114
 <212> PRT
 30 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 165
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 35 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 40 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro 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
 45 85 90 95
 Thr Thr Thr Thr Phe Asp Ser Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser

<210> 166
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 5 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 166
 Gln Met Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 10 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Glu Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Ser Trp Asn Ser His Asn Ile Ala Tyr Ala Asp Ser Val
 15 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Ser 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
 20 Ser Thr Ser Gly Leu Gly Val His Ala Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 167
 25 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 30 <400> 167
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Ser Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 35 Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 40 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 Asp Ser Phe Gly Gly His Leu Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 45 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 168
 <211> 121

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 5 <400> 168
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 10 Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn Pro Gly Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 15 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Asp Gly Ser Tyr Trp Gly Tyr Phe Asp Ser Trp Gly
 100 105 110
 20 Gln Gly Thr Pro Ile Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 169
 <211> 121
 <212> PRT
 25 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 169
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Asn Leu Val Gln Pro Gly Arg
 30 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 35 Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Thr Pro Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 40 85 90 95
 Ala Arg Gly His Asn Tyr Leu Asp Ser Ser Tyr Tyr Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 45 <210> 170
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 170
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Arg
 5 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Gly Ser Gly Phe Thr Phe Gly Asp His
 20 25 30
 Pro Leu Thr Trp Val Arg Gln Ile Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 10 Gly Phe Ile Arg Ser Lys Ala Tyr Gly Glu Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ile
 65 70 75 80
 Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 15 85 90 95
 Tyr Cys Ala Ser Val Ser Tyr Cys Ser Gly Gly Ser Cys Tyr Gln Gly
 100 105 110
 Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 20 <210> 171
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 25 <223> Artificial Sequence
 <400> 171
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Arg Tyr
 30 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Gln Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 35 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Thr Thr Thr Phe Asp Ser Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val
 40 100 105 110
 Ser Ser
 <210> 172
 <211> 114
 <212> PRT
 45 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 172

RU 2725 950 C1

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Asn Asn
 20 25 30
 5 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Arg His Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 10 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Thr Thr Thr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 15 Ser Ser
 <210> 173
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 20 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 173
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 25 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Gln His Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 30 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 35 Thr Thr Thr Thr Phe Asp Ser Trp Ser Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser
 <210> 174
 <211> 114
 40 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 174
 45 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Pro Ile Tyr
 20 25 30

RU 2 725 950 C1

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ala His Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 5 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Thr Thr Thr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 10 100 105 110
 Ser Ser
 <210> 175
 <211> 114
 <212> PRT
 15 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 175
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 20 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 25 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Gln His Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 30 85 90 95
 Thr Thr Thr Thr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser
 <210> 176
 35 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 40 <400> 176
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Tyr Tyr
 20 25 30
 45 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Thr Val Ile Ser Tyr Asp Gly Gln Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

RU 2 725 950 C1

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
5 Thr Thr Thr Thr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser
<210> 177
<211> 114
10 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 177
15 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
20 35 40 45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Gln Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
25 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Thr Thr Thr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser
30 <210> 178
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
35 <223> Artificial Sequence
<400> 178
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Arg Tyr
40 20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Arg Tyr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
45 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

RU 2 725 950 C1

Thr Thr Thr Thr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser
 <210> 179
 5 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 10 <400> 179
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Leu Val Tyr
 20 25 30
 15 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser His Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 20 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Thr Thr Thr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 25 Ser Ser
 <210> 180
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 30 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 180
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 35 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Gln His Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 40 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 45 Thr Thr Thr Thr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser
 <210> 181

<211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 5 <223> Artificial Sequence
 <400> 181
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 10 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 15 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Pro Thr Thr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Gln Val Thr Val
 20 100 105 110
 Ser Ser
 <210> 182
 <211> 114
 <212> PRT
 25 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 182
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 30 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 35 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 40 85 90 95
 Val Pro Thr Thr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser
 <210> 183
 45 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>

RU 2725 950 C1

<223> Artificial Sequence
 <400> 183
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 5 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Leu Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser His Asp Gly Asn Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 10 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 15 Val Pro Thr Thr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser
 <210> 184
 <211> 114
 20 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 184
 25 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Phe Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 30 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 35 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Pro Thr Thr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser
 40 <210> 185
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 45 <223> Artificial Sequence
 <400> 185
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

RU 2725 950 C1

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Thr Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 5 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 10 85 90 95
 Val Pro Thr Thr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser
 <210> 186
 15 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 20 <400> 186
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Val Tyr
 20 25 30
 25 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 30 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Pro Thr Thr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 35 Ser Ser
 <210> 187
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 40 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 187
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 45 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Met Arg Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

RU 2 725 950 C1

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
5 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Pro Thr Thr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser
10 <210> 188
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
15 <223> Artificial Sequence
<400> 188
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Trp Thr Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Asn Asp Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
25 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Pro Thr Thr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
30 100 105 110
Ser Ser
<210> 189
<211> 114
<212> PRT
35 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 189
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
40 1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
45 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

RU 2 725 950 C1

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Thr Thr Thr Thr Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 5 Ser Ser
 <210> 190
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 10 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 190
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 15 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 20 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 25 Ala Arg Thr Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Ile Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser
 <210> 191
 <211> 114
 30 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 191
 35 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 40 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 45 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Pro Thr Thr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Gln Val Thr Val
 100 105 110

Ser Ser
 <210> 192
 <211> 114
 <212> PRT
 5 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 192
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 10 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 15 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 85 90 95
 Val Pro Thr Thr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Gln Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ser
 <210> 193
 25 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 30 <400> 193
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 35 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Met Leu Tyr
 40 65 70 75 80
 Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Val Pro Thr Thr Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Ser Gln Val Thr Val
 100 105 110
 45 Ser Ser
 <210> 194
 <211> 23
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 194
 5 ccaggatggg tcttagactc ccc 23
 <210> 195
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 10 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 195
 caccaggggt tggactggc 20
 <210> 196
 15 <211> 232
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 20 <400> 196
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 1 5 10 15
 Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 20 25 30
 25 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 35 40 45
 Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
 50 55 60
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 30 65 70 75 80
 Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 85 90 95
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 100 105 110
 35 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 115 120 125
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
 130 135 140
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 40 145 150 155 160
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 165 170 175
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
 45 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230
 <210> 197
 <211> 233
 5 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 197
 10 Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro
 1 5 10 15
 Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
 20 25 30
 Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val
 15 35 40 45
 Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe
 50 55 60
 Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu
 65 70 75 80
 20 Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His
 85 90 95
 Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys
 100 105 110
 Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser
 25 115 120 125
 Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met
 130 135 140
 Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro
 145 150 155 160
 30 Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn
 165 170 175
 Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met
 180 185 190
 Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser
 35 195 200 205
 Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr
 210 215 220
 Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 225 230
 40 <210> 198
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 45 <223> Artificial Sequence
 <400> 198
 Arg Asp Ile Ser Arg Trp
 1 5

<210> 199
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
5 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 199
Gln Ser Leu Val His
1 5
10 <210> 200
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
15 <223> Artificial Sequence
<400> 200
Gln Ala Ile Ser Asn Trp
1 5
20 <210> 201
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
25 <400> 201
Ala Leu Ser Lys Gln Tyr
1 5
<210> 202
<211> 8
30 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 202
35 Thr Ser Asn Ile Gly Thr Asn Ala
1 5
<210> 203
<211> 9
<212> PRT
40 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 203
Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp
45 1 5
<210> 204
<211> 6
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 204
5 Gln Gly Ile Val Ser Trp
1 5
<210> 205
<211> 12
<212> PRT
10 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 205
Gln Ser Leu Leu Asp Ser Glu Asp Gly Asn Thr Tyr
15 1 5 10
<210> 206
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
20 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 206
Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
1 5
25 <210> 207
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
30 <223> Artificial Sequence
<400> 207
Thr Phe Asn Ile Gly Thr Thr Thr
1 5
<210> 208
35 <211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
40 <400> 208
Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Asp Gly Lys Thr Tyr
1 5 10
<210> 209
<211> 6
45 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence

<400> 209
Ser Leu Arg Thr Tyr Tyr
1 5
<210> 210
5 <211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
10 <400> 210
Asn Leu Arg Thr Lys Tyr
1 5
<210> 211
<211> 9
15 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 211
20 Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr
1 5
<210> 212
<211> 9
<212> PRT
25 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 212
Arg Ser Asn Phe Gly Ala Gly His Asp
30 1 5
<210> 213
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
35 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 213
Gln Ser Leu Leu Asp Ser His Asp Gly Asn Thr Tyr
1 5 10
40 <210> 214
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
45 <223> Artificial Sequence
<400> 214
Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn Thr
1 5

<210> 215
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
5 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 215
Gln Ser Leu Phe Asp Ser Asp Asp Gly Asn Thr Tyr
1 5 10
10 <210> 216
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
15 <223> Artificial Sequence
<400> 216
Gln Ser Leu Leu Tyr Ile Asp Gly Glu Thr Tyr
1 5 10
<210> 217
20 <211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
25 <400> 217
Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Asn Tyr
1 5 10
<210> 218
<211> 6
30 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 218
35 Ala Leu Ser Lys Glu Tyr
1 5
<210> 219
<211> 6
<212> PRT
40 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 219
Gln Ser Val Thr Ser Asp
45 1 5
<210> 220
<211> 12
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 220
 5 Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Asp Gly Asn Thr Tyr
 1 5 10
 <210> 221
 <211> 12
 <212> PRT
 10 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 221
 Gln Ser Leu Leu Asp Arg Asp Gly Gly His Thr Tyr
 15 1 5 10
 <210> 222
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 20 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 222
 Gln Ser Leu Leu Asp Arg Gly Gly Gly His Thr Tyr
 1 5 10
 25 <210> 223
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 30 <223> Artificial Sequence
 <400> 223
 Gly Ala Ser
 1
 <210> 224
 35 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 40 <400> 224
 Lys Ile Ser
 1
 <210> 225
 <211> 3
 45 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence

<400> 225
Ala Thr Ser
1
<210> 226
5 <211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
10 <400> 226
Lys Asp Thr
1
<210> 227
<211> 3
15 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 227
20 Tyr Asp Asp
1
<210> 228
<211> 3
<212> PRT
25 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 228
Gly Asn Ser
30 1
<210> 229
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
35 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 229
Arg Ala Ser
1
40 <210> 230
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
45 <223> Artificial Sequence
<400> 230
Thr Leu Ser
1

<210> 231
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
5 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 231
Ala Ala Ser
1
10 <210> 232
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
15 <223> Artificial Sequence
<400> 232
Asn Tyr Asp
1
20 <210> 233
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
25 <400> 233
Gly Lys Asn
1
30 <210> 234
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 234
35 Gln Asp Thr
1
<210> 235
<211> 3
<212> PRT
40 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 235
Asp Val Ser
45 1
<210> 236
<211> 3
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 236
5 Gly Asn Asn
1
<210> 237
<211> 3
<212> PRT
10 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 237
Arg Asp Asp
15 1
<210> 238
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
20 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 238
Glu Val Ser
1
25 <210> 239
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
30 <223> Artificial Sequence
<400> 239
Leu Gly Ser
1
<210> 240
35 <211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
40 <400> 240
Lys Asp Ser
1
<210> 241
<211> 3
45 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence

<400> 241
Asp Ala Ser
1
<210> 242
5 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
10 <400> 242
Gln Gln Gly Lys Ser Phe Pro Tyr Thr
1 5
<210> 243
<211> 9
15 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 243
20 Met Gln Ser Thr Gln Phe Pro Tyr Thr
1 5
<210> 244
<211> 9
<212> PRT
25 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 244
Gln Gln Thr Asp Ser Phe Pro Leu Thr
30 1 5
<210> 245
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
35 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 245
Gln Ser Ile Thr Asp Lys Ser Gly Thr Asp Val Ile
1 5 10
40 <210> 246
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
45 <223> Artificial Sequence
<400> 246
Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Trp Val
1 5 10

<210> 247
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
5 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 247
Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Tyr Val
1 5 10
10 <210> 248
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
15 <223> Artificial Sequence
<400> 248
Gln Gln Ala Asp Ser Phe Pro Leu Thr
1 5
<210> 249
20 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
25 <400> 249
Leu Gln Arg Met Gly Phe Pro Tyr Thr
1 5
<210> 250
<211> 9
30 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 250
35 Gln Gln Ser Tyr Thr Ser Pro Arg Thr
1 5
<210> 251
<211> 11
<212> PRT
40 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 251
Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Ala Trp Leu
45 1 5 10
<210> 252
<211> 9
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 252
5 Met Gln Arg Val Glu Phe Pro Phe Thr
1 5
<210> 253
<211> 11
<212> PRT
10 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 253
Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Lys Ser Leu Val
15 1 5 10
<210> 254
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
20 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 254
Met Thr Trp Asp Val Asp Thr Thr Ser Met Ile
1 5 10
25 <210> 255
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
30 <223> Artificial Sequence
<400> 255
Ser Ser Phe Thr Ser Ser Ser Thr Val Val
1 5 10
<210> 256
35 <211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
40 <400> 256
Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Ala Trp Gly
1 5 10
<210> 257
<211> 9
45 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence

<400> 257
 Met Gln Arg Ile Asp Phe Pro Tyr Thr
 1 5
 <210> 258
 5 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 10 <400> 258
 Ala Ser Trp Asp Asp Thr Leu Asn Gly Trp Val
 1 5 10
 <210> 259
 <211> 10
 15 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 259
 20 Ser Ser Phe Ala Arg Asn Ser Asn Tyr Val
 1 5 10
 <210> 260
 <211> 9
 <212> PRT
 25 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 260
 Met Gln Gly Ile His Leu Pro Leu Thr
 30 1 5
 <210> 261
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 35 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 261
 Met Gln Gly Leu Gln Ile Pro Ser Thr
 1 5
 40 <210> 262
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 45 <223> Artificial Sequence
 <400> 262
 Gln Ser Val Asp Ser Ser Asp Thr Ser Val Val
 1 5 10

<210> 263
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
5 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 263
Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Leu Thr
1 5
10 <210> 264
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
15 <223> Artificial Sequence
<400> 264
Met Gln Arg Ile Glu Phe Pro Tyr Thr
1 5
<210> 265
20 <211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
25 <400> 265
Met Gln Arg Val Glu Phe Pro Tyr Thr
1 5
<210> 266
<211> 9
30 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 266
35 Met Gln Arg Ile Glu Phe Pro Phe Thr
1 5
<210> 267
<211> 9
<212> PRT
40 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 267
Met Gln Arg Arg Asp Phe Pro Phe Thr
45 1 5
<210> 268
<211> 9
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 268
5 Met Gln Arg Lys Glu Phe Pro Leu Thr
1 5
<210> 269
<211> 9
<212> PRT
10 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 269
Met Gln Arg Ile His Phe Pro Leu Thr
15 1 5
<210> 270
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
20 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 270
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
25 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
20 25
<210> 271
<211> 26
<212> PRT
30 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 271
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
35 1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
20 25
<210> 272
<211> 26
40 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 272
45 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
20 25

<210> 273
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
5 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 273
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Ser Pro Ser Val Ser Met Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
10 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp
20 25
<210> 274
<211> 25
<212> PRT
15 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 274
Gln Leu Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Met Ser Glu Ala Pro Gly Gln
20 1 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly
20 25
<210> 275
<211> 25
25 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 275
30 Gln Phe Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Arg Val Ile Ile Ser Cys Thr Gly Ser
20 25
<210> 276
35 <211> 26
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
40 <400> 276
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Ala Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
20 25
45 <210> 277
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 277
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 5 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Thr Thr Cys Arg Ala Ser
 20 25
 <210> 278
 <211> 25
 10 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> QFVLTQSPSA SGTPGQNIVI SCSAS
 <400> 278
 15 Gln Phe Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Asn Ile Val Ile Ser Cys Ser Ala Ser
 20 25
 <210> 279
 20 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 25 <400> 279
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp
 20 25
 30 <210> 280
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 35 <223> Artificial Sequence
 <400> 280
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Ala Pro Ser Leu Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Asn Ile Ile Cys Ser Gly Asp
 40 20 25
 <210> 281
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 45 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 281
 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln

1 5 10 15
Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr
20 25
<210> 282
5 <211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
10 <400> 282
Gln Phe Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser
20 25
15 <210> 283
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
20 <223> Artificial Sequence
<400> 283
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
25 20 25
<210> 284
<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
30 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 284
Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro Pro Ser Thr Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15
35 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Arg
20 25
<210> 285
<211> 26
<212> PRT
40 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 285
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
45 1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
20 25
<210> 286

<211> 25
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
5 <223> Artificial Sequence
<400> 286
Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr
10 20 25
<210> 287
<211> 26
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
15 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 287
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
20 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser
20 25
<210> 288
<211> 25
<212> PRT
25 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 288
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Leu Ser Leu Ser Val Ala Pro Gly Gln
30 1 5 10 15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp
20 25
<210> 289
<211> 26
35 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 289
40 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser
20 25
<210> 290
45 <211> 26
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> Artificial Sequence
 <400> 290
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro His Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 5 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 20 25
 <210> 291
 <211> 26
 <212> PRT
 10 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 291
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 15 1 5 10 15
 Glu Ala Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 20 25
 <210> 292
 <211> 26
 20 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 292
 25 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Pro Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 20 25
 <210> 293
 30 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 35 <400> 293
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Met Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Ala Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 20 25
 40 <210> 294
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 45 <223> Artificial Sequence
 <400> 294
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 20 25
 <210> 295
 <211> 17
 5 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 295
 10 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 1 5 10 15
 Tyr
 <210> 296
 <211> 17
 15 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 296
 20 Leu Asn Trp Phe His Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile
 1 5 10 15
 His
 <210> 297
 <211> 17
 25 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 297
 30 Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 1 5 10 15
 Tyr
 <210> 298
 <211> 17
 35 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 298
 40 Ala Ser Trp Tyr Gln Leu Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Val Val Met
 1 5 10 15
 Tyr
 <210> 299
 <211> 17
 45 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence

<400> 299
 Val Asn Trp Tyr Gln Gln Pro Pro Gly Lys Ala Pro Thr Leu Leu Ile
 1 5 10 15
 Tyr
 5 <210> 300
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 10 <223> Artificial Sequence
 <400> 300
 Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Val Leu Ile
 1 5 10 15
 Tyr
 15 <210> 301
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 20 <223> Artificial Sequence
 <400> 301
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 1 5 10 15
 Tyr
 25 <210> 302
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 30 <223> Artificial Sequence
 <400> 302
 Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile
 1 5 10 15
 Tyr
 35 <210> 303
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 40 <223> Artificial Sequence
 <400> 303
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 1 5 10 15
 Tyr
 45 <210> 304
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 304
Val Asn Trp Tyr Gln Arg Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile
5 1 5 10 15
Tyr
<210> 305
<211> 17
<212> PRT
10 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 305
Ala Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ile Leu Val Ile
15 1 5 10 15
Tyr
<210> 306
<211> 17
<212> PRT
20 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 306
Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Leu Leu Val Ile
25 1 5 10 15
Tyr
<210> 307
<211> 17
<212> PRT
30 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 307
Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile
35 1 5 10 15
Tyr
<210> 308
<211> 17
<212> PRT
40 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 308
Val His Trp Cys Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile
45 1 5 10 15
Tyr
<210> 309
<211> 17

<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
5 <400> 309
Val Thr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Val Leu Met
1 5 10 15
Tyr
<210> 310
10 <211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
15 <400> 310
Leu Phe Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile
1 5 10 15
Tyr
<210> 311
20 <211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
25 <400> 311
Ser Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Met
1 5 10 15
Tyr
<210> 312
30 <211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
35 <400> 312
Val Ala Trp Tyr Gln His Ile Arg Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
1 5 10 15
Tyr
<210> 313
40 <211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
45 <400> 313
Val Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile
1 5 10 15
Tyr

<210> 314
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
5 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 314
Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile
1 5 10 15
10 Tyr
<210> 315
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
15 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 315
Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile
1 5 10 15
20 Tyr
<210> 316
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
25 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 316
Ser Leu Arg Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15
30 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
20 25 30
Thr Tyr Phe Cys
35
<210> 317
35 <211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
40 <400> 317
Asn Arg Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ala Gly
1 5 10 15
Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
20 25 30
45 Val Tyr Tyr Cys
35
<210> 318
<211> 36

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 5 <400> 318
 Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala
 20 25 30
 10 Thr Tyr Tyr Cys
 35
 <210> 319
 <211> 36
 <212> PRT
 15 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 319
 Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly
 20 1 5 10 15
 Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu Asp Gly Ala
 20 25 30
 Asp Tyr Tyr Cys
 35
 25 <210> 320
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 30 <223> Artificial Sequence
 <400> 320
 Arg Leu Thr Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Arg Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala
 35 20 25 30
 Asp Tyr Tyr Cys
 35
 <210> 321
 <211> 36
 40 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 321
 45 Asp Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ala Ser Lys Ser Ala
 1 5 10 15
 Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala
 20 25 30

Asp Tyr Tyr Cys
35
<210> 322
<211> 36
5 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 322
10 Asp Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala
20 25 30
Thr Tyr Tyr Cys
15 35
<210> 323
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
20 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 323
His Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15
25 Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp Val Gly
20 25 30
Leu Tyr Tyr Cys
35
<210> 324
30 <211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
35 <400> 324
Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15
Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
20 25 30
40 Thr Tyr Phe Cys
35
<210> 325
<211> 36
<212> PRT
45 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 325

RU 2 725 950 C1

Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala
 20 25 30
 5 Asp Tyr Tyr Cys
 35
 <210> 326
 <211> 36
 <212> PRT
 10 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 326
 Tyr Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 15 1 5 10 15
 Thr Glu Phe Asn Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
 20 25 30
 Ile Tyr Tyr Cys
 35
 20 <210> 327
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 25 <223> Artificial Sequence
 <400> 327
 Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly
 1 5 10 15
 Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Glu Asp Glu Ala
 30 20 25 30
 Asp Tyr Tyr Cys
 35
 <210> 328
 <211> 36
 35 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 328
 40 Arg Arg Pro Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly
 1 5 10 15
 Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Arg Asp Glu Ser
 20 25 30
 Thr Tyr Tyr Cys
 45 35
 <210> 329
 <211> 36
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 329
 5 Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly
 1 5 10 15
 Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala
 20 25 30
 Asp Tyr Tyr Cys
 10 35
 <210> 330
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 15 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 330
 Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly
 1 5 10 15
 20 Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala
 20 25 30
 Glu Tyr Tyr Cys
 35
 <210> 331
 25 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 30 <400> 331
 His Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
 20 25 30
 35 Leu Tyr Tyr Cys
 35
 <210> 332
 <211> 36
 <212> PRT
 40 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 332
 Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly
 45 1 5 10 15
 Ile Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala
 20 25 30
 Asp Tyr Tyr Cys

35
<210> 333
<211> 36
<212> PRT
5 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 333
His Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
10 1 5 10 15
Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
20 25 30
Ile Tyr Tyr Cys
35
15 <210> 334
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
20 <223> Artificial Sequence
<400> 334
Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly
1 5 10 15
Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu Gln Pro Glu Asp Glu Ala
25 20 25 30
Asp Tyr Tyr Cys
35
<210> 335
<211> 36
30 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 335
35 Ser Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15
Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
20 25 30
Val Tyr Tyr Cys
40 35
<210> 336
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
45 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 336
Tyr Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly

1 5 10 15
 Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
 20 25 30
 Leu Tyr Tyr Cys
 5 35
 <210> 337
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 10 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 337
 Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly
 1 5 10 15
 15 Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala
 20 25 30
 Asp Tyr Tyr Cys
 35
 <210> 338
 20 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 25 <400> 338
 Asn Arg Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
 20 25 30
 30 Val Tyr Tyr Cys
 35
 <210> 339
 <211> 36
 <212> PRT
 35 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 339
 His Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 40 1 5 10 15
 Thr Glu Phe Asn Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
 20 25 30
 Ile Tyr Tyr Cys
 35
 45 <210> 340
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 340
Tyr Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
5 1 5 10 15
Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
20 25 30
Val Tyr Tyr Cys
35
10 <210> 341
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
15 <223> Artificial Sequence
<400> 341
His Arg Ala Leu Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15
Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ser Gly
20 25 30
Ile Tyr Tyr Cys
35
<210> 342
<211> 36
25 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 342
30 His Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15
Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ser Gly
20 25 30
Ile Tyr Tyr Cys
35
35 <210> 343
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
40 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 343
His Arg Ala Leu Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15
45 Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Asp Asp Val Gly
20 25 30
Leu Tyr Tyr Cys
35

<210> 344
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
5 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 344
His Arg Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15
10 Thr Glu Phe Asn Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
20 25 30
Ile Tyr Tyr Cys
35
<210> 345
15 <211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
20 <400> 345
His Arg Ala Leu Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15
Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp Val Gly
20 25 30
25 Leu Tyr Tyr Cys
35
<210> 346
<211> 36
<212> PRT
30 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 346
His Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
35 1 5 10 15
Thr Asp Phe Thr Leu Glu Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
20 25 30
Val Tyr Tyr Cys
35
40 <210> 347
<211> 36
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
45 <223> Artificial Sequence
<400> 347
His Arg Ala Leu Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
1 5 10 15

RU 2 725 950 C1

Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Asp Asn Val Gly
 20 25 30
 Leu Tyr Tyr Cys
 35
 5 <210> 348
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 10 <223> Artificial Sequence
 <400> 348
 His Arg Ala Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ser Gly
 15 20 25 30
 Ile Tyr Tyr Cys
 35
 <210> 349
 <211> 36
 20 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 349
 25 His Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
 20 25 30
 Val Tyr Tyr Cys
 30 35
 <210> 350
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 35 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 350
 His Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 40 Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp Val Gly
 20 25 30
 Ile Tyr Tyr Cys
 35
 <210> 351
 45 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> Artificial Sequence
 <400> 351
 His Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 5 Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Asp Asp Val Gly
 20 25 30
 Ile Tyr Tyr Cys
 35
 <210> 352
 10 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 15 <400> 352
 His Arg Ala Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Asp Phe Thr Leu Glu Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
 20 25 30
 20 Val Tyr Tyr Cys
 35
 <210> 353
 <211> 36
 <212> PRT
 25 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 353
 Tyr Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 30 1 5 10 15
 Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp Val Gly
 20 25 30
 Ile Tyr Tyr Cys
 35
 35 <210> 354
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 40 <223> Artificial Sequence
 <400> 354
 His Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 1 5 10 15
 Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Thr Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
 45 20 25 30
 Val Tyr Tyr Cys
 35
 <210> 355

<211> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 5 <223> Artificial Sequence
 <400> 355
 His Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Arg Gly Ser His
 1 5 10 15
 Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
 10 20 25 30
 Val Tyr Tyr Cys
 35
 <210> 356
 <211> 10
 15 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 356
 20 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 1 5 10
 <210> 357
 <211> 10
 <212> PRT
 25 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 357
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 30 1 5 10
 <210> 358
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 35 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 358
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 1 5 10
 40 <210> 359
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 45 <223> Artificial Sequence
 <400> 359
 Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 1 5 10

<210> 360
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
5 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 360
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10
10 <210> 361
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
15 <223> Artificial Sequence
<400> 361
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys
1 5 10
<210> 362
20 <211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
25 <400> 362
Val Arg Arg Arg Asp Gln Ala Asp Arg Pro
1 5 10
<210> 363
<211> 10
30 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 363
35 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10
<210> 364
<211> 10
<212> PRT
40 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 364
Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
45 1 5 10
<210> 365
<211> 10
<212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 365
 5 Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 1 5 10
 <210> 366
 <211> 10
 <212> PRT
 10 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 366
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 15 1 5 10
 <210> 367
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 20 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 367
 Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10
 25 <210> 368
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 30 <223> Artificial Sequence
 <400> 368
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Asp Ile Ser Arg Trp
 35 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Arg Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 40 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Lys Ser Phe Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 45 100 105
 <210> 369
 <211> 106
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificial Sequence

<400> 369

5 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Ser Pro Val Thr Leu Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Leu
20 25 30

10 Asn Trp Phe His Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile His
35 40 45

Lys Ile Ser Asn Arg Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

15 Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser Thr Gln Phe Pro Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 370

20 <211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificial Sequence

25 <400> 370

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

30 Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Thr Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

40 <210> 371

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

45 <223> Artificial Sequence

<400> 371

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

RU 2 725 950 C1

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Ser Lys Gln Tyr Ala
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Leu Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Val Val Met Tyr
 35 40 45
 5 Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Gly Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Ile Thr Asp Lys Ser Gly Thr
 10 85 90 95
 Asp Val Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105
 <210> 372
 <211> 110
 15 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 372
 20 Gln Leu Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Met Ser Glu Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Thr Ser Asn Ile Gly Thr Asn
 20 25 30
 Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Pro Pro Gly Lys Ala Pro Thr Leu Leu
 25 35 40 45
 Ile Tyr Tyr Asp Asp Arg Leu Thr Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Arg Leu Gln
 65 70 75 80
 30 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95
 Asn Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110
 <210> 373
 35 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 40 <400> 373
 Gln Phe Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Ile Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
 20 25 30
 45 Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Val
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asp Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

RU 2 725 950 C1

Ser Ala Ser Lys Ser Ala Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95
5 Leu Ser Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
100 105 110
<210> 374
<211> 107
<212> PRT
10 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 374
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
15 1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Val Ser Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
20 Tyr Arg Ala Ser Asp Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asp Ser Phe Pro Leu
25 85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
<210> 375
<211> 113
30 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 375
35 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Ala Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30
Glu Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
40 35 40 45
Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
65 70 75 80
45 Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Leu Gln
85 90 95
Arg Met Gly Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Asp Ile
100 105 110

Lys
 <210> 376
 <211> 107
 <212> PRT
 5 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 376
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 10 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Thr Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 15 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Tyr Thr Ser Pro Arg
 20 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys
 100 105
 <210> 377
 <211> 110
 25 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 377
 30 Gln Phe Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Asn Ile Val Ile Ser Cys Ser Ala Ser Thr Phe Asn Ile Gly Thr Thr
 20 25 30
 Thr Val Asn Trp Tyr Gln Arg Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 35 40 45
 Ile Tyr Asn Tyr Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80
 40 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95
 Asn Ala Trp Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110
 <210> 378
 45 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> Artificial Sequence
 <400> 378
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 5 Glu Ala Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val
 10 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Asn Leu Arg
 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95
 15 Arg Val Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Asp Ile
 100 105 110
 Lys
 <210> 379
 <211> 108
 20 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 379
 25 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Asp Pro Ala Val Ser Val Ala Leu Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Val Arg Ile Thr Cys Gln Gly Asp Ser Leu Arg Thr Tyr Tyr Ala
 20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ile Leu Val Ile Tyr
 30 35 40 45
 Gly Lys Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Ser Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Thr Ala Ala Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 35 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Asn Ser Arg Asp Ser Ser Gly Lys Ser
 85 90 95
 Leu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105
 <210> 380
 40 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 45 <400> 380
 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Ala Pro Ser Leu Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Asn Ile Ile Cys Ser Gly Asp Asn Leu Arg Thr Lys Tyr Val

RU 2 725 950 C1

20 25 30
 Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Leu Leu Val Ile Tyr
 35 40 45
 Gln Asp Thr Arg Arg Pro Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 5 50 55 60
 Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Thr Arg
 65 70 75 80
 Asp Glu Ser Thr Tyr Tyr Cys Met Thr Trp Asp Val Asp Thr Thr Ser
 85 90 95
 10 Met Ile Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105
 <210> 381
 <211> 110
 <212> PRT
 15 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 381
 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 20 1 5 10 15
 Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
 20 25 30
 Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 25 Met Ile Tyr Asp Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Phe Thr Ser Ser
 30 85 90 95
 Ser Thr Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110
 <210> 382
 <211> 111
 35 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 382
 40 Gln Phe Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Arg Ser Asn Phe Gly Ala Gly
 20 25 30
 His Asp Val His Trp Cys Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 45 35 40 45
 Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu

RU 2 725 950 C1

65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Glu Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95
 Leu Ser Ala Trp Gly Val Arg Arg Arg Asp Gln Ala Asp Arg Pro
 5 100 105 110
 <210> 383
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 10 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 383
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 15 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 His Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val
 20 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95
 25 Arg Ile Asp Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 Lys
 <210> 384
 <211> 110
 30 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 384
 35 Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro Pro Ser Thr Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Arg Ser Ser Asn Ile Gly Ile Asn
 20 25 30
 Thr Val Thr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Val Leu
 40 35 40 45
 Met Tyr Arg Asp Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Arg Ser Gly Ile Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln
 65 70 75 80
 45 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Asp Thr Leu
 85 90 95
 Asn Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 385
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 5 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 385
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 10 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asp Ser
 20 25 30
 Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val
 15 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln
 85 90 95
 20 Arg Met Gly Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 Lys
 <210> 386
 <211> 110
 25 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 386
 30 Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
 20 25 30
 Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 35 35 40 45
 Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
 65 70 75 80
 40 Gln Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Phe Ala Arg Asn
 85 90 95
 Ser Asn Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
 100 105 110
 <210> 387
 45 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> Artificial Sequence
 <400> 387
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 5 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ile
 20 25 30
 Asp Gly Glu Thr Tyr Leu Phe Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Val Pro
 10 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly 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 Met Gln Gly
 85 90 95
 15 Ile His Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 388
 <211> 112
 <212> PRT
 20 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 388
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 25 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 30 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
 35 85 90 95
 Leu Gln Ile Pro Ser Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
 100 105 110
 <210> 389
 <211> 108
 40 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 389
 45 Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Leu Ser Leu Ser Val Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Ser Lys Glu Tyr Ser
 20 25 30

RU 2725 950 C1

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Met Tyr
 35 40 45
 Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 5 Ser Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Val Asp Ser Ser Asp Thr Ser
 85 90 95
 Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105
 <210> 390
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 15 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 390
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 20 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Asp
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln His Ile Arg Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 25 Gly Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Leu
 85 90 95
 30 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105
 <210> 391
 <211> 113
 <212> PRT
 35 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 391
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 40 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 45 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Asn Leu Arg
 65 70 75 80

RU 2 725 950 C1

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95
Arg Val Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110
5 Lys
<210> 392
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
10 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 392
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
15 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asp Ser
20 25 30
Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val
20 50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
65 70 75 80
Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95
25 Arg Val Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110
Lys
<210> 393
<211> 113
30 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 393
35 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro His Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30
Glu Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
40 35 40 45
Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Leu Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
65 70 75 80
45 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ser Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95
Arg Ile Glu Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys
 <210> 394
 <211> 113
 <212> PRT
 5 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 394
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 10 1 5 10 15
 Glu Ala Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Glu Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 15 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ser Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln
 20 85 90 95
 Arg Val Glu Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Asp Ile
 100 105 110
 Lys
 <210> 395
 25 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 30 <400> 395
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Arg
 20 25 30
 35 Asp Gly Gly His Thr Tyr Val Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Leu Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 40 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Val Glu Ala Asp Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95
 Arg Ile Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 45 Lys
 <210> 396
 <211> 113
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 396
 5 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Ala Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Glu Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Arg Pro Gly Gln
 10 35 40 45
 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Asn Leu Arg
 65 70 75 80
 15 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95
 Arg Val Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 Lys
 20 <210> 397
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 25 <223> Artificial Sequence
 <400> 397
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asp Ser
 30 20 25 30
 Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Leu Gly Val
 50 55 60
 35 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Leu Gln
 85 90 95
 Arg Met Gly Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 40 100 105 110
 Lys
 <210> 398
 <211> 113
 <212> PRT
 45 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 398

RU 2725 950 C1

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Ala Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 5 Glu Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Glu
 10 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95
 Arg Arg Asp Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile
 100 105 110
 15 Lys
 <210> 399
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 20 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 399
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 25 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val
 30 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95
 35 Arg Val Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Asp Ile
 100 105 110
 Lys
 <210> 400
 <211> 113
 40 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 400
 45 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Arg
 20 25 30

RU 2 725 950 C1

Asp Gly Gly His Thr Tyr Val Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Leu Gly Val
 50 55 60
 5 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Val Glu Ala Asp Asn Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95
 Arg Ile Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 10 100 105 110
 Lys
 <210> 401
 <211> 113
 <212> PRT
 15 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 401
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 20 1 5 10 15
 Glu Ala Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Glu Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 25 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln
 30 85 90 95
 Arg Val Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 Lys
 <210> 402
 35 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 40 <400> 402
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 45 Glu Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val
 50 55 60

RU 2 725 950 C1

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Glu
65 70 75 80
Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95
5 Arg Val Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Asp Ile
100 105 110
Lys
<210> 403
<211> 113
10 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 403
15 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asp Ser
20 25 30
Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
20 35 40 45
Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val
50 55 60
Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
65 70 75 80
25 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ser Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95
Arg Val Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Asp Ile
100 105 110
Lys
30 <210> 404
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
35 <223> Artificial Sequence
<400> 404
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Ala Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
40 20 25 30
Glu Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val
50 55 60
45 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
65 70 75 80
Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95

RU 2 725 950 C1

Arg Val Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys
 <210> 405
 5 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 10 <400> 405
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 15 Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Asn Leu Arg
 20 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95
 Arg Val Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 25 Lys
 <210> 406
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 30 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 406
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 35 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val
 40 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95
 45 Arg Val Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Asp Ile
 100 105 110
 Lys
 <210> 407

<211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 5 <223> Artificial Sequence
 <400> 407
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Ala Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 10 20 25 30
 Glu Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val
 50 55 60
 15 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95
 Arg Val Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 20 100 105 110
 Lys
 <210> 408
 <211> 113
 <212> PRT
 25 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 408
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 30 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Glu Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 35 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Asn Leu Arg
 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln
 40 85 90 95
 Arg Val Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile
 100 105 110
 Lys
 <210> 409
 45 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> Artificial Sequence
 <400> 409
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 5 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asp Ser
 20 25 30
 Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val
 10 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Leu Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95
 15 Arg Val Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys
 <210> 410
 <211> 113
 20 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 410
 25 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Glu Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 30 35 40 45
 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 35 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95
 Arg Ile Asp Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Asp Ile
 100 105 110
 Lys
 40 <210> 411
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 45 <223> Artificial Sequence
 <400> 411
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Pro Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

RU 2 725 950 C1

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 5 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Glu
 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
 10 85 90 95
 Arg Arg Asp Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Asp Ile
 100 105 110
 Lys
 <210> 412
 15 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 20 <400> 412
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Met Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Ala Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 25 Glu Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 30 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Val Glu Ala Asp Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95
 Arg Val Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
 100 105 110
 35 Lys
 <210> 413
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 40 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 413
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 45 Glu Ala Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Glu Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

RU 2 725 950 C1

Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
65 70 75 80
5 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95
Arg Val Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110
Lys
10 <210> 414
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
15 <223> Artificial Sequence
<400> 414
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30
Glu Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val
50 55 60
25 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
65 70 75 80
Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95
Arg Val Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Asp Ile
30 100 105 110
Lys
<210> 415
<211> 113
<212> PRT
35 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 415
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
40 1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30
Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
45 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val
50 55 60
Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Glu
65 70 75 80

RU 2 725 950 C1

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95
Arg Arg Asp Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110
5 Lys
<210> 416
<211> 113
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
10 <220>
<223> Artificial Sequence
<400> 416
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
15 Glu Ala Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30
Glu Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val
20 50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
65 70 75 80
Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95
25 Arg Val Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110
Lys
<210> 417
<211> 113
30 <212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Artificial Sequence
<400> 417
35 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asp Ser
20 25 30
Asp Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
40 35 40 45
Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser Tyr Arg Ala Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
65 70 75 80
45 Ile Ser Arg Val Ala Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln
85 90 95
Arg Val Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Asp Ile
100 105 110

Lys
 <210> 418
 <211> 113
 <212> PRT
 5 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 <400> 418
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 10 1 5 10 15
 Glu Ala Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
 20 25 30
 Glu Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 15 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 65 70 75 80
 Ile Thr Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln
 20 85 90 95
 Arg Ile Glu Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 Lys
 <210> 419
 25 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Artificial Sequence
 30 <400> 419
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Arg
 20 25 30
 35 Gly Gly Gly His Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45
 Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Thr Leu Ser His Arg Ala Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys
 40 65 70 75 80
 Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln
 85 90 95
 Arg Lys Glu Phe Pro Leu Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110
 45 Lys
 <210> 420
 <211> 113
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Artificial Sequence

<400> 420

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

20

(57) Формула изобретения

1. Антитело, связывающееся с PD-1, либо его антигенсвязывающий фрагмент, включающие:

25 вариабельную область тяжелой цепи, включающую CDR1 тяжелой цепи, включающий последовательность SEQ ID NO: 2, CDR2 тяжелой цепи, включающий последовательность SEQ ID NO: 33, и CDR3 тяжелой цепи, включающий последовательность SEQ ID NO: 59, вариабельную область легкой цепи, включающую CDR1 легкой цепи, включающий последовательность SEQ ID NO: 198, CDR2 легкой цепи, включающий последовательность SEQ ID NO: 223, и CDR3 легкой цепи, включающий последовательность SEQ ID NO: 242,

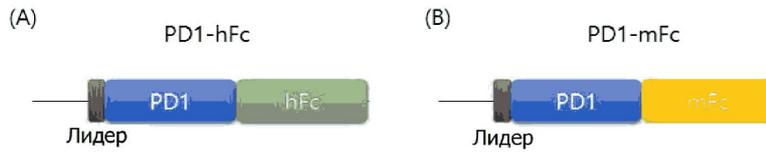
30 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 2, CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 33, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 60, вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 199, CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 224, и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 243,

35 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 2, CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 33, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 61, вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 200, CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 225, и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 244 CDR3,

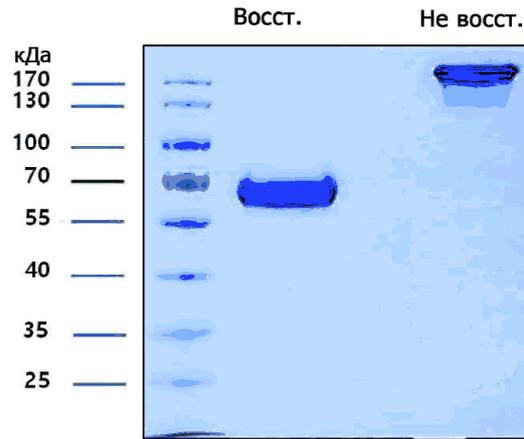
45 вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 2, CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 33, и CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 62, вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность SEQ ID NO: 201, CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность

2. Антитело либо его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, включающие:
FR1 вариабельной области тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 80-95;
FR2 вариабельной области тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 96-113;
FR3 вариабельной области тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 114-134; и
FR4 вариабельной области тяжелой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 135-145.
3. Антитело либо его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, включающие:
FR1 вариабельной области легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 270-294;
FR2 вариабельной области легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 295-315;
FR3 вариабельной области легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 316-355; и
FR4 вариабельной области легкой цепи, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NOs: 356-367.
4. Антитело либо его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, включающие:
вариабельную область тяжелой цепи, включающую последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 146-193.
5. Антитело либо его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, включающие:
вариабельную область легкой цепи, включающую последовательность, выбранную из группы, состоящей из последовательностей, приведенных в SEQ ID NO: 368-420.
6. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело либо его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5.
7. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 6.
8. Клетка для продуцирования антитела по п. 1, трансформированная экспрессионным вектором по п. 7.
9. Способ получения антитела, связывающегося с PD-1, либо его антигенсвязывающего фрагмента, включающий:
(а) культивирование клетки по п. 8; и
(б) извлечение антитела либо его антигенсвязывающего фрагмента из клеточной культуры.
10. Композиция для профилактики или лечения рака, характеризующегося экспрессией PD-1, содержащая в качестве активного ингредиента антитело по любому из пп. 1-5.
11. Композиция по п. 10, при этом рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака легких, рака печени, глиоцитомы, рака яичников, рака толстой кишки, рака головы и шеи, рака мочевого пузыря, рака почек, рака желудка, рака молочной железы, метастатического рака, рака простаты и рака поджелудочной железы.

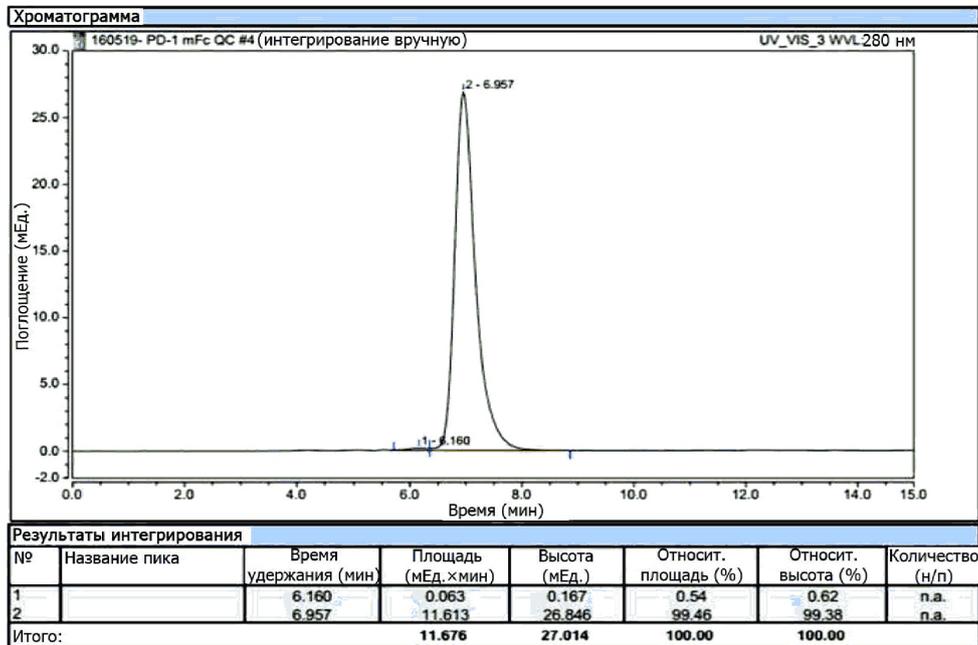
1/12



Фиг. 1

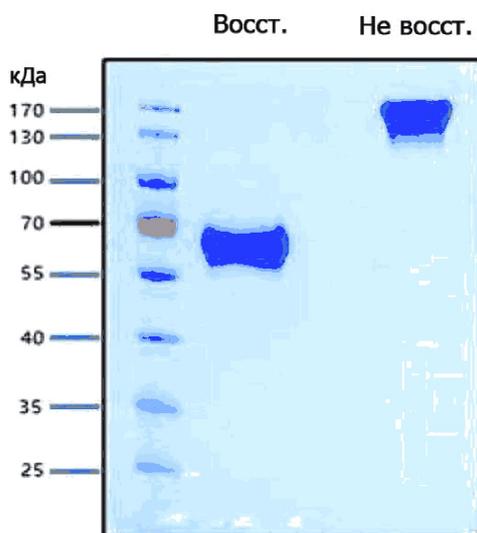


Фиг. 2а

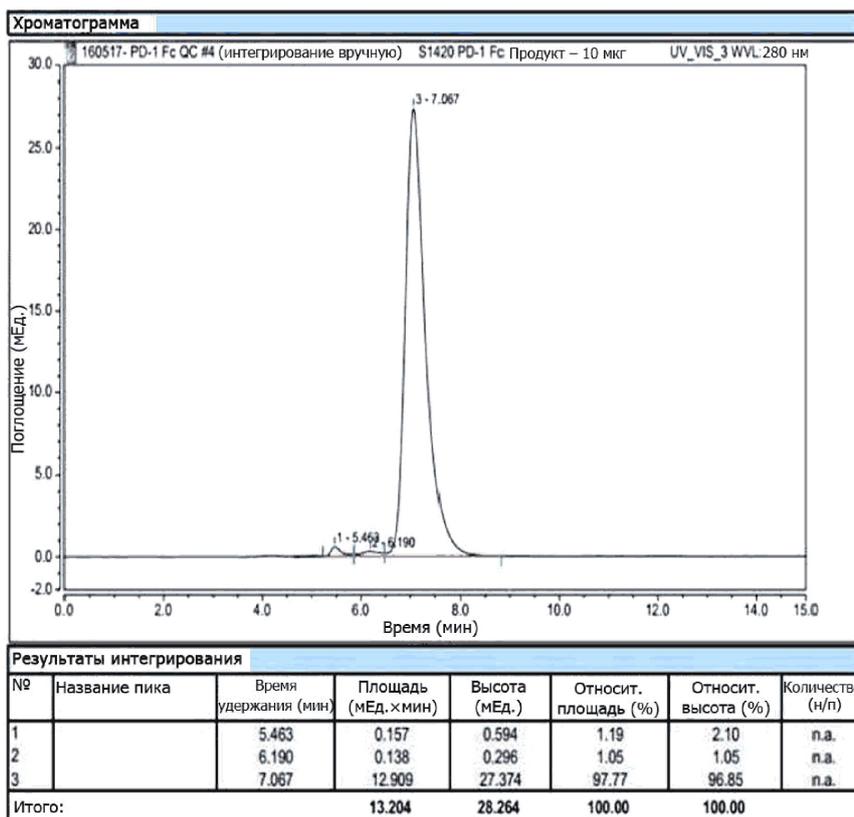


Фиг. 2б

2/12

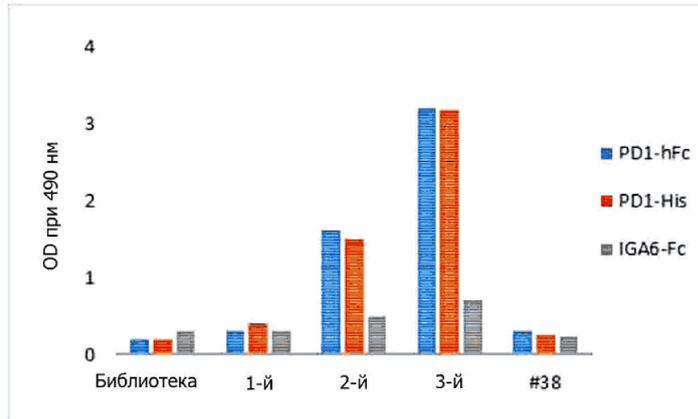


Фиг. 2с

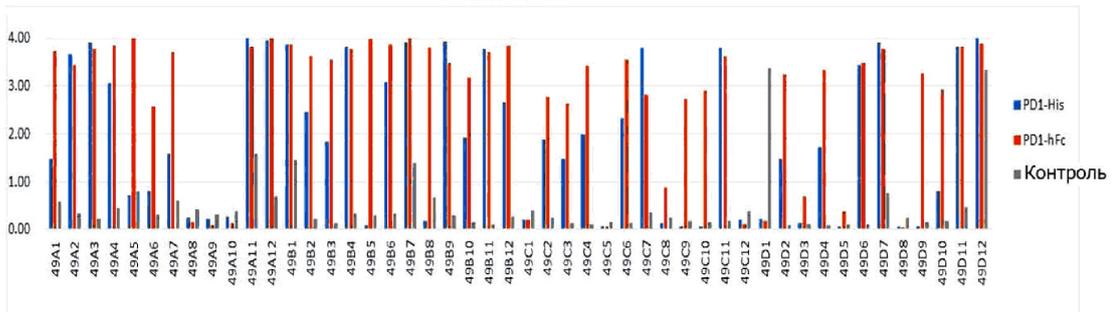


Фиг. 2d

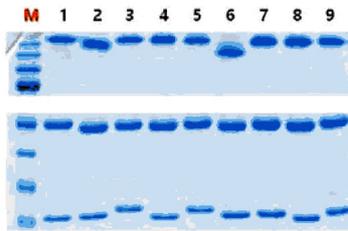
3/12



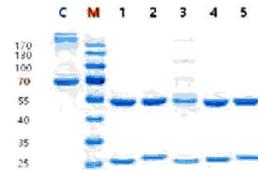
ФИГ. 3



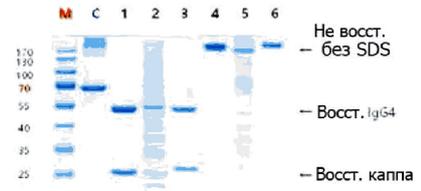
ФИГ. 4



N	Название	Серия	Выход (мг/л)
1	Ниволумаб	#140729	188.5
2	Пембролизумаб	#140502	44.45
3	Анти-PD1-29A2	#160428	24.95
4	Анти-PD1-29H3	#160428	27.17
5	Анти-PD1-31F3	#160428	13.95
6	Анти-PD1-32A6	#160428	89.55
7	Анти-PD1-41C9	#160428	38.17
8	Анти-PD1-42G4	#160428	31.62
9	Анти-PD1-44B5	#160428	23.67



N	Название	Серия	Выход (мг/л)
C	BSA	-	-
1	Анти-PD1-45D6	#160518	59.48
2	Анти-PD1-45F1	#160518	26.18
3	Анти-PD1-45F4	#160518	1.8
4	Анти-PD1-48A9	#160518	50.01
5	Анти-PD1-49B9	#160518	145.18

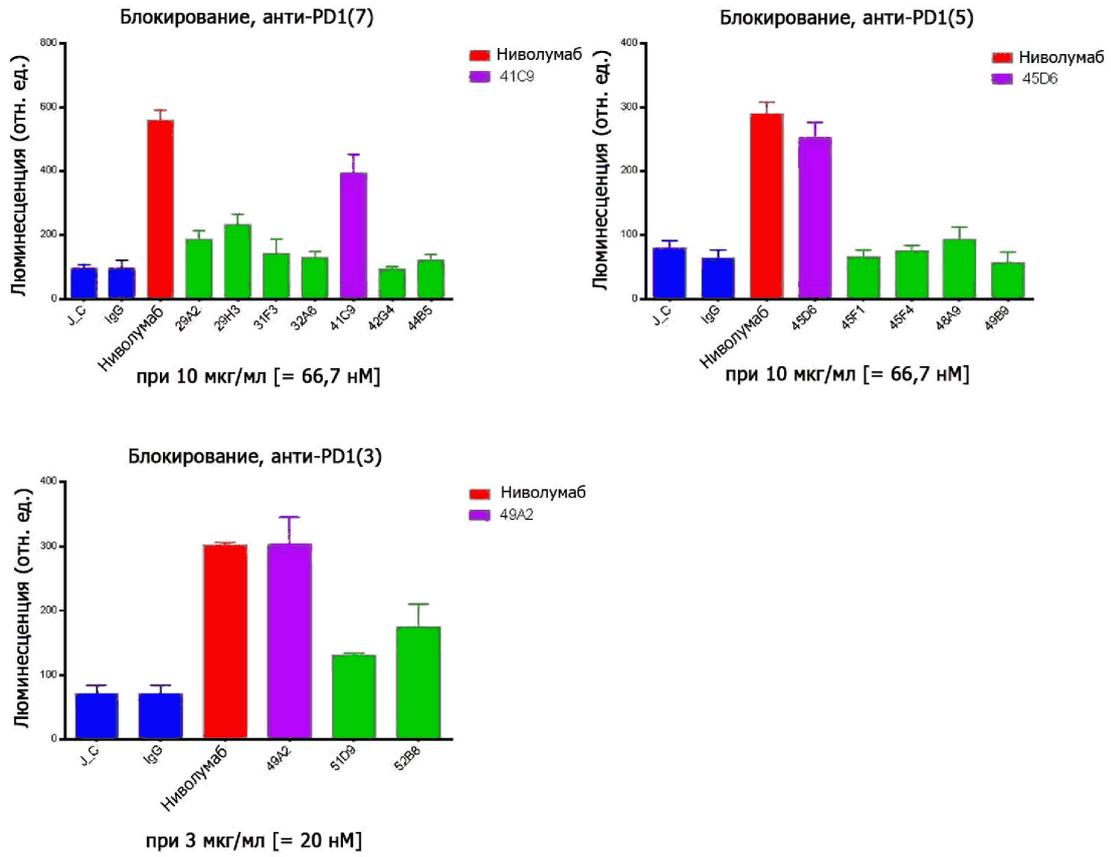


наносили 3 мкг

N	Название	Серия	Выход (мг/л)	
1	Анти-PD1-49A2	RE	#160524	56.12
2	Анти-PD1-51D9	RE	#160524	2.13
3	Анти-PD1-52E8	RE	#160524	169.46
4	Анти-PD1-49A2	NR	#160524	56.12
5	Анти-PD1-51D9	NR	#160524	2.13
6	Анти-PD1-52E8	NR	#160524	169.46

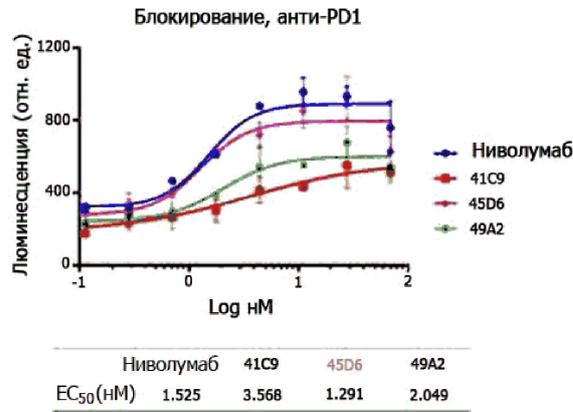
ФИГ. 5

4/12

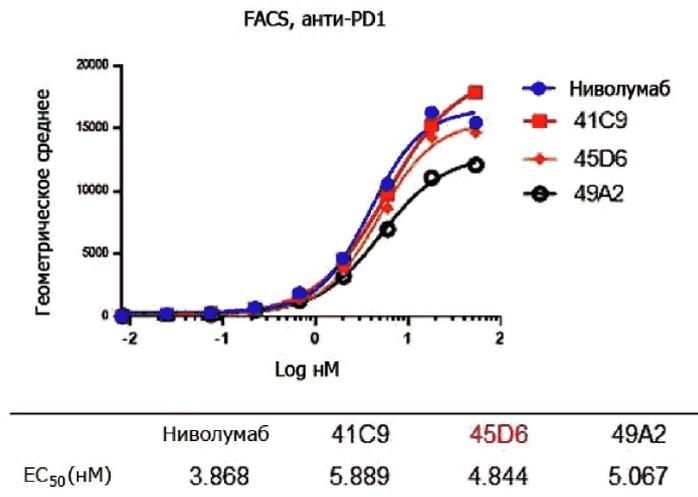


Фиг. 6

5/12

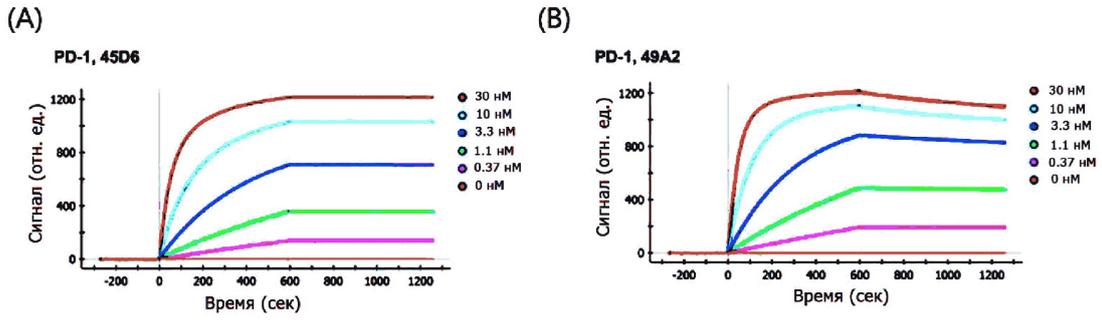


Фиг. 7

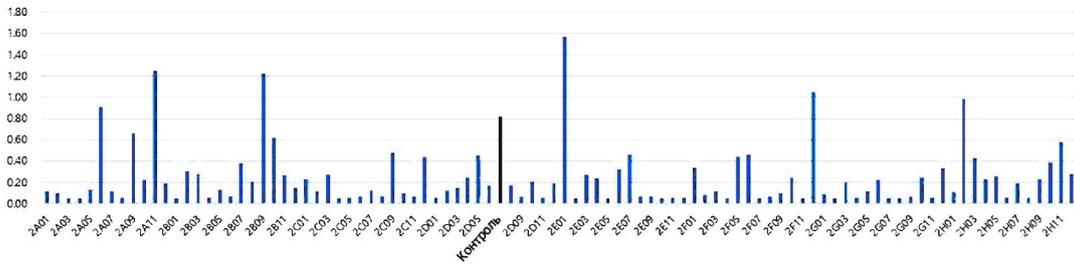


Фиг. 8

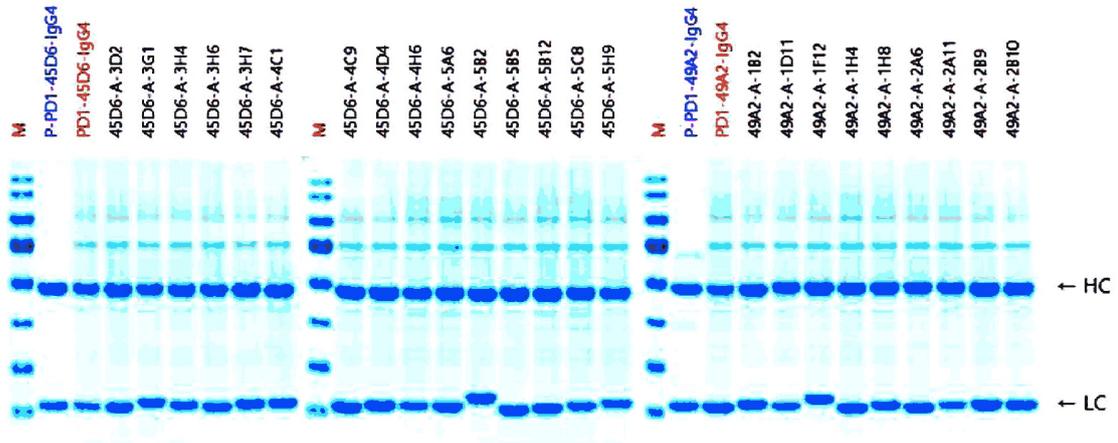
6/12



Фиг. 9

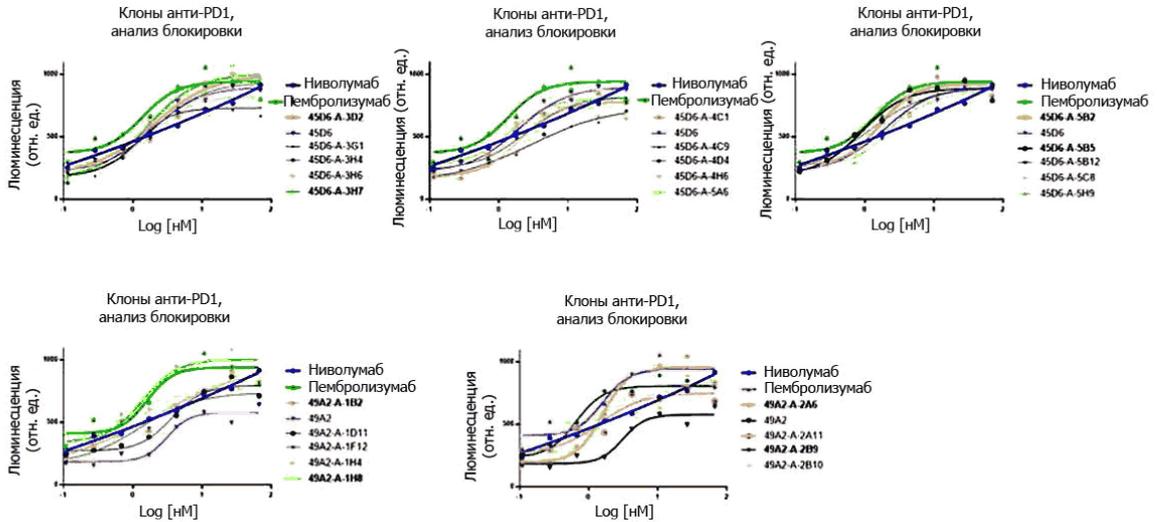


Фиг. 10



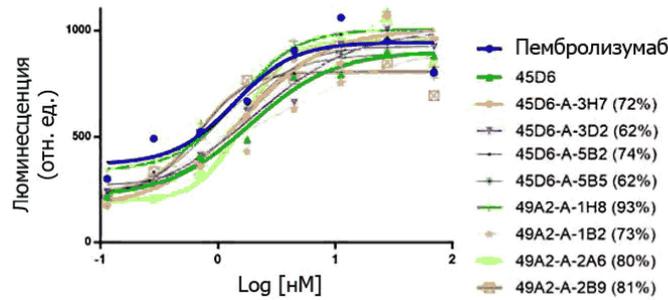
Фиг. 11

7/12



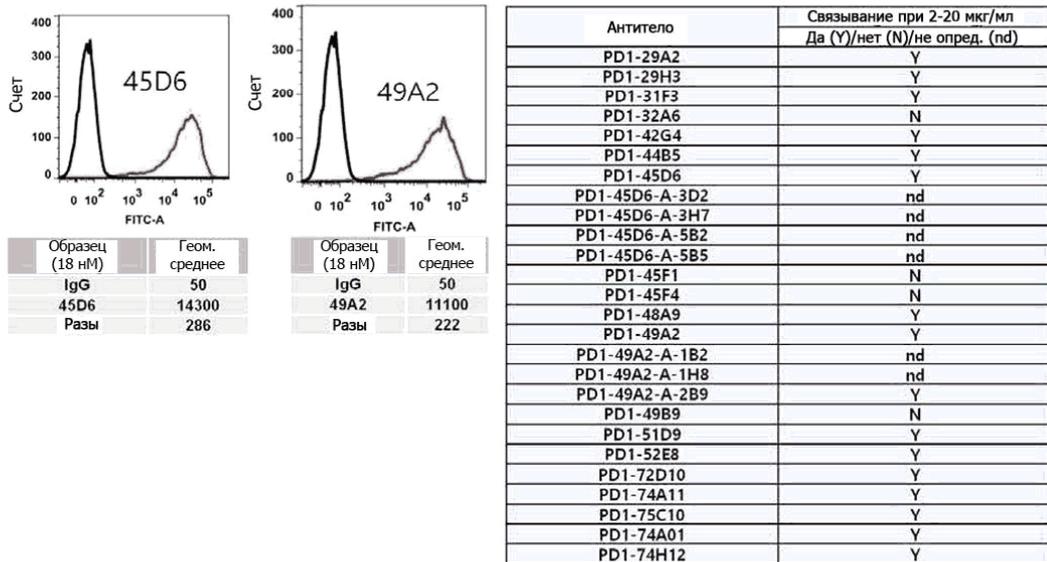
Фиг. 12

Клоны анти-PD1, анализ блокировки

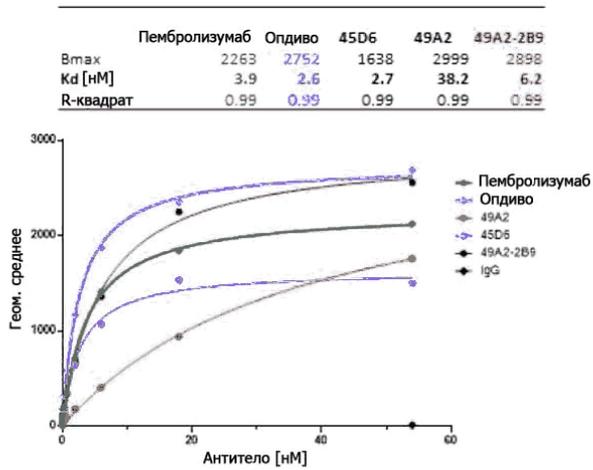


	Пембролизумаб	45D6	45D6-A-3D2	45D6-A-3H7	45D6-A-5B2	45D6-A-5B5	49A2-A-1B2	49A2-A-1H8	49A2-A-2A6	49A2-A-2B9
Нижнее	370.3	216.1	198	167.1	270.5	193.6	121.5	341.3	198.6	236.5
Верхнее	943.9	900.7	1002	1006	925.8	891.3	968.9	1006	957.3	807.4
EC50	1.367	1.876	2.005	1.635	1.66	0.9064	2.033	1.454	1.669	0.6888
R-квадрат	0.8881	0.9796	0.9687	0.9702	0.9656	0.9583	0.928	0.8804	0.9708	0.9406
Продуктивность			100.3	141	124.6	144.6	106.3	67.3	3.6	128

Фиг. 13

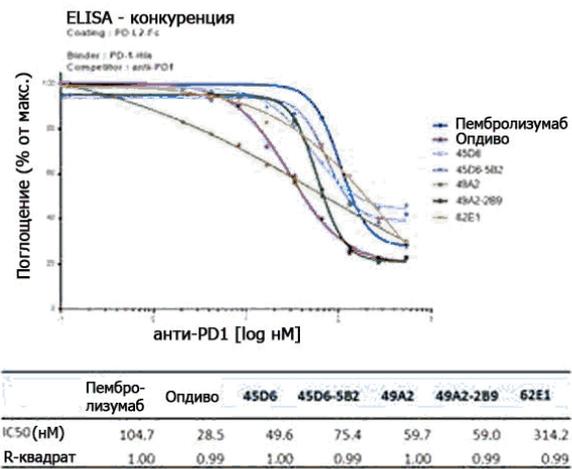
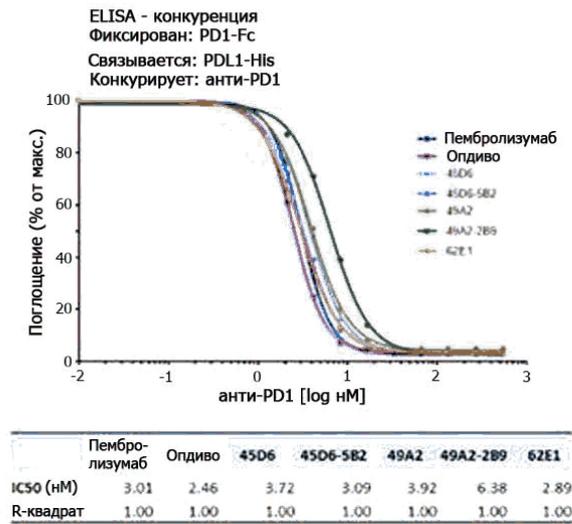


Фиг. 14

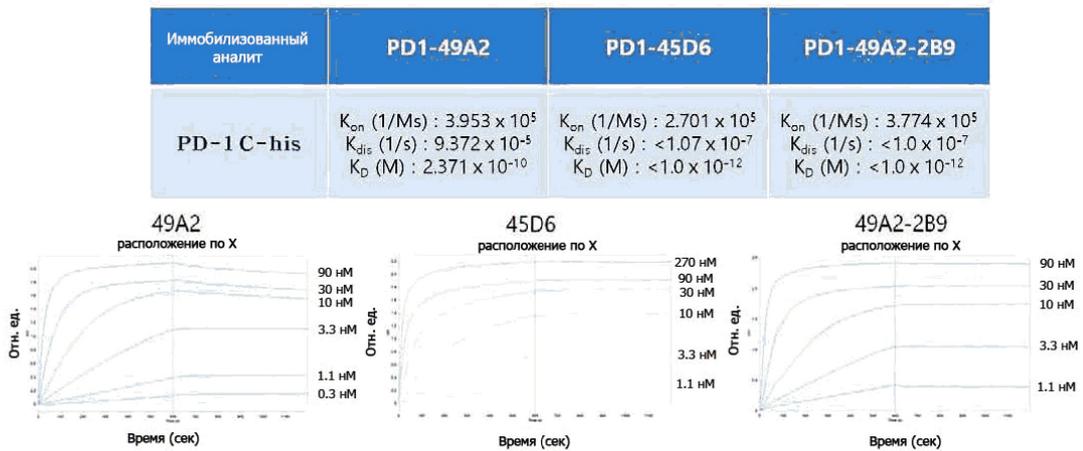


Фиг. 15

9/12



Фиг. 16



Фиг. 17

10/12

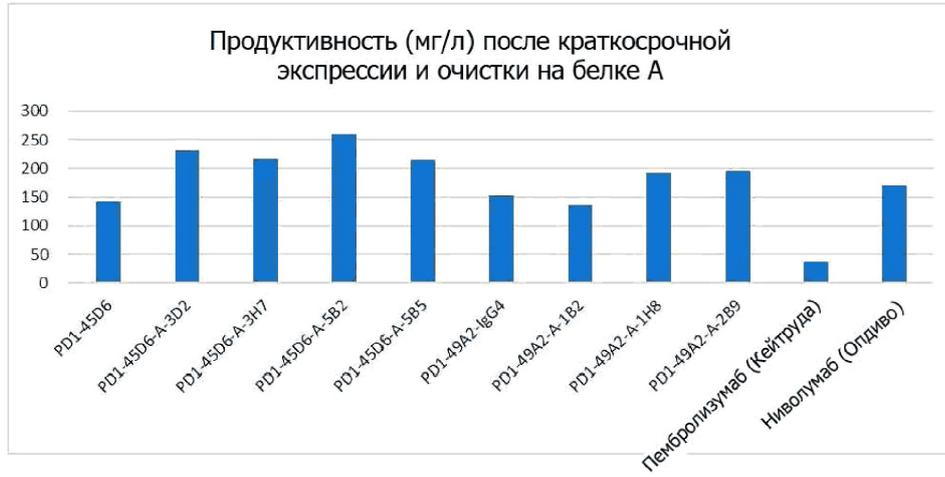
hFD-1
 PGRFLSDPDRWNPPTFSBALLVVTSGNATZTCSPNITSEBFLVWYRHSPIINQDILAAFPEDRBOPODCRFRVTLQPNWRGFIHISVVRARRNDGTYLQSAISLAFKAOIKESLRABLVTERRAEVPTAHSP8PRPAGQFOTLVVGVVQ
 M1-1
 Q...
 M1-2
 M1
 M2-1
 M2-2
 M3
 M4
 M11
 M5
 M5-1
 M5-2
 M6
 M12
 M13
 M14
 M7-1
 M7-2
 M7
 M8
 M9
 M10

* Мутированные аминокислоты отмечены красным цветом

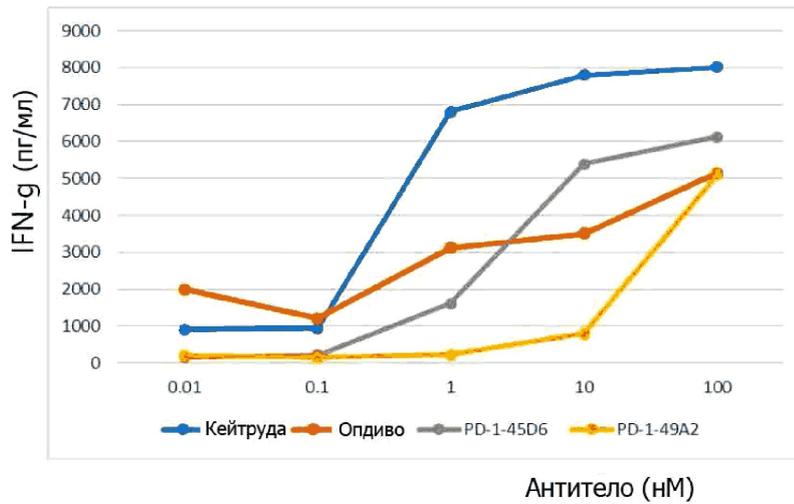
Фиг. 18

	WT	M1	M1-1	M1-2	M2	M2-1	M2-2	M3	M4	M11	M5	M5-1	M5-2	M6	M12	M13	M14	M7	M7-1	M7-2	M8	M9	M10	ITGA6
PDL1-FC	3.9	3.9	3.8	3.9	0.4	3.9	3.9	3.9	3.9	4.0	1.4	0.4	3.8	4.0	4.0	3.9	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	0.3
Ниволумаб	3.5	3.3	3.3	2.5	1.4	3.3	3.4	3.4	3.4	2.3	3.2	3.2	3.5	3.2	3.0	3.3	3.3	3.1	3.3	3.3	3.2	3.3	3.2	0.3
Пембролизумаб	3.3	2.8	2.8	3.1	0.1	3.1	2.8	2.3	3.0	0.3	1.1	0.1	3.3	3.1	2.9	3.2	2.7	2.6	2.8	2.9	1.9	2.8	2.5	0.1
29A2	2.2	2.7	2.7	3.2	0.6	3.2	3.1	1.7	2.8	0.8	1.6	1.9	3.3	3.4	3.0	3.4	3.4	1.1	1.4	3.3	1.9	3.2	2.8	0.4
29H3	3.6	1.5	3.2	0.6	0.7	2.8	3.2	2.3	3.3	1.0	2.0	2.0	3.7	3.5	3.0	3.5	3.5	1.4	1.5	3.1	2.2	3.4	3.0	0.3
31F3	2.0	3.0	3.0	3.2	0.7	3.5	3.3	1.9	2.7	0.8	1.1	1.3	3.4	3.3	2.6	3.3	3.4	0.7	0.8	1.5	1.7	3.2	3.0	0.4
32A6	3.5	2.4	2.6	2.8	3.2	2.8	2.7	3.0	2.4	3.3	2.9	3.6	2.8	2.9	2.7	0.5	1.7	3.2	3.1	2.8	3.1	2.4	2.5	0.3
41C9	3.2	3.2	3.1	3.2	0.8	3.4	3.2	2.3	3.2	0.9	2.3	2.8	3.6	3.6	3.1	3.6	3.5	0.8	1.2	3.0	2.5	3.3	3.4	0.5
42G4	2.8	1.8	2.9	0.6	0.6	0.6	3.0	2.0	1.9	1.7	1.6	1.9	3.5	3.3	2.7	3.7	3.7	2.5	2.9	2.7	2.1	3.4	3.1	0.4
44B5	3.8	3.8	3.6	0.3	3.7	3.6	3.7	3.7	3.6	3.8	3.7	3.7	3.8	3.7	3.6	3.7	3.7	3.6	3.7	3.7	3.5	3.7	3.7	0.3
45D6	3.8	4.0	3.8	3.9	0.4	3.9	3.8	3.8	3.9	0.7	3.6	3.8	3.9	3.9	3.9	4.0	3.9	0.5	1.3	4.0	3.8	3.8	3.9	0.5
45F1	4.0	3.9	3.9	3.9	3.8	3.9	4.0	3.8	3.9	3.8	3.8	3.9	3.9	4.0	0.4	2.2	3.8	3.8	3.9	3.9	3.9	3.8	3.9	0.1
45F4	3.8	2.6	2.5	3.6	2.9	3.0	2.5	3.7	2.7	0.3	1.1	0.1	3.1	3.7	3.7	3.5	1.8	3.5	3.5	3.4	3.6	3.3	3.3	0.1
48A9	2.1	3.7	3.8	3.9	0.3	3.8	3.9	2.0	3.9	0.3	1.3	0.6	3.9	3.9	3.9	4.0	4.0	0.3	0.4	0.4	1.7	3.9	3.8	0.3
49B9	3.9	3.9	3.8	3.9	3.9	3.8	3.9	3.9	3.8	1.4	3.9	3.9	4.0	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	3.9	4.0	3.9	3.9	0.3
49A2	3.6	3.0	3.4	3.8	0.3	3.7	3.6	3.4	3.9	0.4	1.2	0.7	3.8	3.9	3.9	3.9	3.9	0.4	0.5	2.2	3.0	3.7	2.6	0.2
51D9	0.1	0.2	0.2	0.4	0.1	0.4	0.6	0.3	1.1	0.1	0.1	0.1	0.6	0.3	0.3	0.7	0.8	0.1	0.1	0.3	0.1	0.3	0.1	0.1
52E8	0.4	1.4	1.5	3.6	0.2	2.9	3.4	1.5	3.7	0.2	0.5	0.3	3.3	3.4	3.2	3.9	2.6	1.0	1.1	3.9	0.6	2.4	1.0	0.1

Фиг. 19



Фиг. 22



Фиг. 23