

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **046734**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.04.17

(51) Int. Cl. **C07K 14/705 (2006.01)**

(21) Номер заявки
202092327

(22) Дата подачи заявки
2019.03.25

(54) **ВАРИАНТЫ LFA3 И ИХ КОМПОЗИЦИИ И ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) **62/650,022; 62/783,986**

(56) WO-A2-9306852
WO-A1-2005037867
WO-A1-2005115436
CN-A-101089180
WO-A2-2014025198

(32) **2018.03.29; 2018.12.21**

(33) **US**

(43) **2021.03.10**

(86) **PCT/US2019/023883**

(87) **WO 2019/190984 2019.10.03**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ПФАЙЗЕР ИНК.; ТЕ РИДЖЕНТС
ОФ ТЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ
КАЛИФОРНИЯ (US)**

(72) Изобретатель:
**Креллин Наташа Кей, Эли Лорен
Кейт, Рейес Джейсон Роблес, Хо Тиа
Ти, Блюстоун Джеффри Э., Тротта
Элеонора, Тан Цичжи (US)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(57) Изобретение относится к молекулам полипептида LFA3, например вариантным молекулам гибридного полипептида LFA3. Изобретение включает применение и ассоциированные способы применения молекул полипептида LFA3.

B1

046734

046734

B1

Родственные заявки

Данная заявка претендует на установление приоритета заявки США с регистрационным № 62/650022, поданной 29 марта 2018 г., и заявки США с регистрационным № 62/783986, поданной 21 декабря 2018 г., содержание каждой из которых полностью включено в настоящий документ посредством отсылки.

Ссылка на список последовательностей

Эта заявка подается в электронном виде и включает список последовательностей, представленный в электронном виде в формате .txt. Файл .txt содержит список последовательностей под названием "PC72432A_Seq_Listing_ST25.txt", созданный 21 марта 2019 г. и имеющий размер 127 715 байт. Список последовательностей, содержащийся в этом файле .txt, является частью описания и полностью включен в данное описание путем отсылки.

Стороны соглашения о совместных исследованиях

Заявленное в настоящее время изобретение было создано перечисленными ниже сторонами соглашения о совместных исследованиях или от их имени. Соглашение о совместных исследованиях вступило в силу на дату создания заявленного изобретения или ранее, и заявленное изобретение было создано в результате деятельности, предпринятой в рамках соглашения о совместных исследованиях. Сторонами соглашения о совместных исследованиях являются ДЗЕ РЕГЕНТС ОФ ДЗЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ КАЛИФОРНИЯ в интересах САН ФРАНЦИСКО КАМПУС и ПФАЙЗЕР ИНК.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к полипептидным молекулам, которые содержат домен антигена 3, ассоциированного с функцией лимфоцитов, (LFA3), а также к их композициям, способам и применениям.

Предшествующий уровень техники

Антиген 3, ассоциированный с функцией лимфоцитов, (LFA3), также известный как CD58, является лигандом CD2 и экспрессируется на многих типах клеток, включая антигенпрезентирующие клетки (APC) (Miller et al., J. Exp. Med. 1993 178(1):211-22; Krueger et al., Expert Opin. Biol. Ther. 2002 2(4):431-41; Haider et al., J. Immunol. 2007 393:411-20; Punch et al., Transplantation 1999 67(5):741-8; Leitner et al., J. Immunol. 2015 195(2):477-87). CD2 экспрессируется на всех Т-клетках, но экспрессия выше на Т-клетках памяти по сравнению с наивными или регуляторными Т-клетками (Chamian et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 2005 102(6):2075-80; Rigby et al., J. Clin. Invest. 2015 125(8):3285-96). У человека CD2 также экспрессируется на НК-клетках и некоторых популяциях дендритных клеток. Взаимодействие CD2 на Т-клетках или НК-клетках и LFA3 на А-клетках может доставлять костимулирующий сигнал как для наивных лимфоцитов, так и для ранее активированных лимфоцитов или лимфоцитов памяти. Этот костимулирующий сигнал потенциально включает увеличение активности межклеточного взаимодействия и/или доставку прямого костимулирующего сигнала через CD2 (Kaizuka et al. J. Cell Biol. 2009 185 (3): 521-34; Skanland et al., Biochem. J. 2014 460 (3): 399-410). По существу, нацеливание на CD2, например, с использованием растворимых молекул LFA3, может иметь терапевтический эффект при лечении аутоиммунных заболеваний, таких как диабет 1 типа (T1D) и/или псориатический артрит. Соответственно, ввиду выдающейся роли CD2 и LFA3 в опосредовании иммунных ответов, существует потребность в разработке стратегий для модуляции активности CD2, а также истощения CD2-экспрессирующих эффекторных иммунных клеток.

Сущность изобретения

В настоящем писании изобретения, в частности, предлагается открытие того, что определенные гибридные полипептиды LFA3-Fc модулируют активность CD2, а также истощают CD2-экспрессирующие клетки. Модуляция CD2-экспрессирующих клеток может иметь положительные эффекты при лечении аутоиммунных заболеваний, таких как диабет и/или псориатический артрит. В данной заявке описаны молекулы полипептида LFA3, например, молекулы вариантного полипептида LFA3, например, молекулы вариантного гибридного полипептида LFA3, например, молекулы вариантного гибридного полипептида LFA3-Fc. В некоторых аспектах молекулы полипептида LFA3 связываются с CD2, модулируют взаимодействие CD2-LFA3 и избирательно истощают CD2-экспрессирующие Т-клетки памяти.

Не желая быть связанными теорией, отметим, что описанные в данном документе молекулы полипептида LFA3, например, варианты молекул гибридного полипептида LFA3-Fc, например, M1d1 (также называемые в данном документе M1-d1, LFA3-Fc M1d1 и LFA3-Fc M1-d1), модулируют функцию и избирательное истощение CD2+ ТЕМ-клеток для восстановления баланса числа регуляторных/ТЕМ-клеток. В некоторых воплощениях молекулы полипептида LFA3, раскрытые в настоящем документе, например, варианты молекул гибридного полипептида LFA3-Fc, например, M1d1, способствуют элиминации и/или подавлению патогенных эффекторных Т-клеток. В некоторых воплощениях молекулы полипептида LFA3, раскрытые в настоящем документе, например, варианты молекул гибридного полипептида LFA3-Fc, например, M1d1, модулируют взаимодействие между CD2 и LFA3, тем самым прерывая CD2-опосредованную костимуляцию Т-клеток. В некоторых воплощениях изобретения молекулы полипептида LFA3, раскрытые в настоящем документе, например, варианты молекул гибридного полипептида LFA3-Fc, например, M1d1, истощают CD2+ Т-клетки посредством FcR-опосредованной

антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). В некоторых воплощениях молекулы полипептида LFA3, раскрытые в настоящем документе, например, варианты молекулы гибридного полипептида LFA3-Fc, например, M1d1, истощают CD2+ Т-клетки посредством апоптоза. В некоторых воплощениях молекулы полипептида LFA3, раскрытые в настоящем документе, например, варианты молекулы гибридного полипептида LFA3-Fc, например, M1d1, уменьшают количество CD2^{high} Т-клеток памяти (T_{mem}), например, Т-клеток центральной памяти (TCM) и Т-клеток эффекторной памяти (TEM), сохраняя при этом регуляторные Т-клетки (Treg). В некоторых воплощениях молекулы полипептида LFA3, раскрытые в настоящем документе, например, варианты молекулы гибридного полипептида LFA3-Fc, например, M1d1, уменьшают количество CD2^{high} T_{mem}-клеток, например, Т-клеток центральной памяти (TCM) и эффекторной памяти (TEM), при сохранении наивных регуляторных Т-клеток. В некоторых воплощениях молекулы полипептида LFA3, раскрытые в данном документе, например, варианты молекулы гибридного полипептида LFA3-Fc, например, M1d1, увеличивают соотношение Treg/TEM или соотношение Treg/TCM, например, в CD4+ и/или CD8+ Т-клетках. В некоторых воплощениях молекулы полипептида LFA3, раскрытые в настоящем документе, например, варианты молекулы гибридного полипептида LFA3-Fc, например, M1d1, увеличивают долю CD4+ TEM-клеток, экспрессирующих PD-1 и/или TIGIT.

Не желая быть связанными теорией, отметим, что описанные в данном документе молекулы полипептида LFA3, например, варианты молекулы гибридного полипептида LFA3-Fc, например, M1d1, связываются с CD2, белком клеточной поверхности, наиболее экспрессированным на CD4+ и CD8+ TEM-клетках (Т-клетках эффекторной памяти), которые в первую очередь ответственны за разрушение бета-клеток при диабете 1 типа (T1D). Введение молекул полипептида LFA3, описанных в настоящем документе, например, вариантов молекул гибридного полипептида LFA3-Fc, например, M1d1, может привести к длительному сохранению выработки эндогенного инсулина, снижению потребности в инсулине, уменьшению частоты тяжелой гипогликемии и восстановлению β-клеток у пациентов с T1D.

В некоторых воплощениях молекулы полипептида LFA3, например, варианты молекулы полипептида LFA3 по настоящему изобретению, были сконструированы для улучшения их стабильности и технологичности по сравнению с последовательностью LFA3 дикого типа. В некоторых воплощениях молекулы полипептида LFA3, например, варианты молекулы полипептида LFA3 по настоящему изобретению, были сконструированы для увеличения их аффинности связывания с CD2 по сравнению с последовательностью LFA3 дикого типа.

В одном аспекте в описании предлагается молекула гибридного полипептида LFA3, содержащая домен LFA3, слитый со вторым доменом. Не желая быть связанными теорией, отметим, что удлинение С-концевой границы домена LFA3 в молекуле гибридного полипептида LFA3 улучшает одну или несколько активностей молекулы гибридного полипептида LFA3. Например, удлинение С-концевой границы домена LFA3 для включения аминокислотного остатка Leu, который соответствует положению 93 LFA3 дикого типа (например, положению 93 SEQ ID NO: 2), или аминокислотной последовательности LESLPS (SEQ ID NO: 118), который соответствует положениям 93-98 LFA3 дикого типа (например, положениям 93-98 SEQ ID NO: 2), улучшает одну или несколько активностей молекулы гибридного полипептида LFA3, например, повышенную термическую стабильность и/или пониженную агрегацию, например, как показано на фиг. 6B-6D.

Специалисты в данной области поймут или смогут установить, используя не более чем рутинные эксперименты, многие эквиваленты конкретных воплощений изобретения, описанных в данном документе. Предполагается, что такие эквиваленты охватываются следующими воплощениями (E).

E1. Выделенная молекула полипептида (например, молекула гибридного полипептида), которая специфически связывается с CD2, при этом молекула полипептида включает домен LFA3 (например, гибридный вариант LFA3-Fc, как описано в данном документе) и обладает одним или несколькими из следующих свойств:

i) повышенная мономерная экспрессия по отношению к молекуле полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, например, показывающая процентное содержание мономеров более чем около 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99%, например, при измерении с использованием эксклюзионной хроматографии (SEC) и/или способов, описанных в примере 1 с учетом фиг. 3A,

ii) повышенная мономерная экспрессия и пониженная мультимерная экспрессия по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, показывающая процентное содержание мономеров более чем около 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99%, процентное содержание низкомолекулярных соединений (LMWS), который составляет менее чем около 10, 8, 6, 4 или 2%, и/или процентное содержание высокомолекулярных частиц (HMWS), которое составляет менее чем около 5, 2, или 1%, например, при измерении с использованием SEC и/или способов, описанных в примере 1 с учетом фиг. 6C,

iii) снижение склонности к агрегации при тепловом стрессе по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, например, показывающее процентное содержание мономеров, превышающее около 90, 92 или 95% после инкубации при 37,4°C в течение 24 ч и/или показывающее процентное содержание мономеров, которое составляет более чем около

75, 80 или 85% после инкубации при 40°C в течение 24 ч, например, при измерении с использованием SEC и/или способов, описанных в примере 1 с учетом фиг. 3D,

iv) сниженная склонность к агрегации при тепловом стрессе по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, демонстрирующая не более чем около 5, 10, 15 или 20% увеличения HMWS при 40°C и/или не более чем около 5, 10, 15, 20 или 25% увеличения HMWS при 50°C, например, при измерении с использованием SEC и/или способов, описанных в примере 1 с учетом табл. 4,

v) сниженная склонность к агрегации при низком pH по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, демонстрирующая не более чем около 6, 7, 8 или 9% увеличения HMWS при низком pH в течение 5 ч, например, измеренного с помощью SEC и/или способов, описанных в примере 1 с учетом табл. 4,

vi) повышенная стабильность по отношению к молекуле полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, показывающую не более чем около 0,5, 1, 1,5 или 2% увеличения HMMS и/или около 0,5, 1, 2, 3, 4 или 5% увеличения LMMS после 2 или 4 недель хранения при 40°C, при измерении с помощью капиллярного гель-электрофореза (CGE), эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC) и/или способов, описанных в примере 4 с учетом фиг. 30A-30C или фиг. 31A-31D,

vii) повышенная стабильность по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, демонстрирующая не более чем около 0,5, 1, 1,5 или 2% увеличения HMMS и/или около 0,5, 1 или 1,5% увеличения LMMS после 2, 4 или 6 недель хранения при 25°C, при измерении с помощью SE-HPLC и/или способов, описанных в примере 4 с учетом фиг. 32A-32D,

viii) повышенная стабильность по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, демонстрирующая не более чем около 0,5, 1 или 1,5% увеличения HMMS и/или около 0,5, 1 или 1,5% увеличения LMMS после 2, 4 или 6 недель хранения при 5°C, при измерении с помощью SE-HPLC и/или способов, описанных в примере 4 с учетом фиг. 33A-33D,

ix) повышенная стабильность при замораживании-оттаивании по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, показывающая не более чем около 0,5, 1 или 1,5% увеличения HMWS после 5 циклов замораживания-оттаивания, например, измеренного с помощью SEC и/или способов, описанных в примере 1 с учетом табл. 4,

x) повышенный выход по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, например, имеющей выход более чем около 5,5, 6, 6,5 или 7 мг на 20 мл культуры Expi293, например, при измерении с использованием описанных способов в примере 1 с учетом фиг. 3B,

xi) повышенная T_m по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, например, имеющей T_m, превышающую около 38, 40, 42 или 45°C, например, при измерении с помощью дифференциальной сканирующей флуорометрии (DSF) и/или с использованием способов, описанных в примере 1 с учетом фиг. 3C,

xii) повышенная T_m по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, имеющей T_m, которая больше около 40, 45, 50, 55 или 60°C, например, при измерении с помощью DSF и/или с использованием способов, описанных в примере 1 с учетом фиг. 5B,

xiii) повышенная T_m по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, например, имеющей T_m, которая больше около 40, 45 или 50°C, например, при измерении с помощью DSF и/или с использованием способов, описанных в примере 1 с учетом фиг. 6D,

xiv) повышенная T_m по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, имеющую T_m, которая больше около 45, 50 или 55°C, например, при измерении с помощью DSF и/или с использованием способов, описанных в примере 1 с учетом фиг. 7D,

xv) повышенная T_m по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, имеющую T_m более чем около 50 или 60°C, например, измеренную с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) и/или с использованием описанных способов в примере 1 с учетом табл. 4,

xvi) T_{m1} больше около 55, 58, 60, 62, 64 или 66°C и T_{m2} больше около 75, 78, 80 или 82°C при pH 7,5; T_{m1} больше около 55, 58, 60, 62 или 64°C и T_{m2} больше около 75, 78, 80 или 82°C при pH 5,8; или T_{m1} более 55, 58 или 60°C и T_{m2} составляет более чем около 75, 78 или 80°C при pH 4,5, например, при измерении с помощью DSC и/или с использованием способов, описанных в примере 4 с учетом табл. 13,

xvii) повышенная T_m по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, имеющей T_m более чем около 50 или 60°C при pH 7,5 или pH 4,5; имеющий T_m более чем около 50 или 62°C при pH 5,8, например, при измерении с помощью DSC

и/или с использованием способов, описанных в примере 4 с учетом табл. 14,

xviii) повышенная T_m по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, имеющую T_m более чем около 50 или 60°C, например, при измерении с помощью DSC и FabRICATOR IdeS и/или с использованием способов, описанных в примере 4 с учетом табл. 15,

xix) повышенная аффинность связывания с CD2 по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, KD для человеческого CD2 меньше около 1,2, 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2, 0,1 или 0,08 мкМ, например, при измерении с помощью SPR и/или с использованием способов, описанных в примере 1 с учетом фиг. 5A,

xx) повышенная аффинность связывания с CD2 по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, KD для CD2 человека, которая меньше около 1,3, 1,2, 1,1 или 1 мкМ, и/или KD для CD2 яванского макака, который составляет менее около 1,4, 1,3, 1,2, 1,1 или 1 мкМ, например, при измерении с помощью SPR и/или с использованием способов, описанных в примере 1 с учетом фиг. 7C,

xxi) повышенная аффинность связывания с CD2-экспрессирующими клетками относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, Kd для связывания с CD4 клетками памяти Т (T_{mem}), которая составляет не более чем около 100, 200, 300, или 400 пМ, например, измеренное с помощью способов, описанных в примере 2 с учетом табл. 6,

xxii) повышенная аффинность связывания с CD2-экспрессирующими клетками по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, рассчитанное значение IC50 для связывания с CD4 Т-клетками памяти, которое составляет не более чем около 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 1200 или 1500 пМ; рассчитанное значение IC50 для связывания с CD4+ ТЕМ-клетками, которое составляет не более чем около 150, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000 или 1200 пМ; рассчитанное значение IC50 для связывания с CD4+ ТСМ-клетками, которое составляет не более чем около 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 или 800 пМ; рассчитанное значение IC50 для связывания с наивными CD4 Т-клетками, которое составляет не более чем около 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000 или 1200 пМ; рассчитанное значение IC50 для связывания с размноженными CD4 Трег-клетками, которое составляет не более чем около 100, 200, 300, 400 или 500 пМ; рассчитанное значение IC50 для связывания с CD8 Т-клетками памяти, которая составляет не более чем около 100, 200, 300, 400, 500 или 600 пМ; и/или рассчитанное значение IC50 для связывания с CD8 нативными Т-клетками, которое составляет не более чем около 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 1200, 1500, 1600 или 1700 пМ, например, измеренное с использованием SPR и/или способов, описанных в примере 2 с учетом табл. 10 и фиг. 11,

xxiii) повышенная аффинность связывания с CD2-экспрессирующими клетками по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, рассчитанное значение Kd для связывания с CD4 Т-клетками памяти, которое составляет не более чем около 100, 200, 300, 400, или 500 пМ; рассчитанное значение Kd для связывания с CD4+ ТЕМ-клетками, которое составляет не более чем около 100, 200, 300, 400, 500 или 600 пМ; рассчитанное значение Kd для связывания с CD4+ ТСМ-клетками, которое составляет не более чем около 100, 200, 300, 400 или 500 пМ; рассчитанное значение Kd для связывания с наивными CD4 Т-клетками, которое составляет не более чем около 100, 200, 300 или 400 пМ; рассчитанное значение Kd для связывания с размноженными CD4 Трег-клетками, которое составляет не более чем около 100, 200 или 300 пМ; рассчитанное значение Kd для связывания с CD8 Т-клетками памяти, которое составляет не более чем около 50, 100 или 150 пМ; рассчитанное значение Kd для связывания с наивными CD8 Т-клетками, которое составляет не более чем около 50, 100, 200, 300, 400 или 500 пМ, например, при измерении с использованием SPR и/или способов, описанных в примере 2, с учетом табл. 10 и фиг. 11,

xxiv) повышенная аффинность связывания с CD2-экспрессирующими клетками по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, сниженная EC50 для связывания с CD4+ ТЕМ-клетками яванского макака относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, при измерении с использованием SPR и/или способов, описанных в примере 3 с учетом фиг. 18A и 18B,

xxv) повышенная цитотоксичность в отношении CD2-экспрессирующих клеток по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, EC50 для уничтожения CD4 T_{mem} -клеток, которая составляет не более чем около 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400 пМ или 1500 пМ, например, при измерении с использованием анализа антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или способов, описанных в примере 5 с учетом табл. 17 и фиг. 12A и 12B,

xxvi) повышенная цитотоксичность в отношении CD2-экспрессирующих клеток по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, EC50 для уничтожения CD8 T_{mem} -клеток, которая составляет не более чем около 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 нМ, например, при измерении с использованием анализа антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или способов, описанных в примере 5 с учетом табл. 17 и фиг. 12D,

xxvii) усиленное ингибирование аллогенного ответа Т-клеток, например, пролиферации Т-клеток и выработки цитокинов, по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последо-

вательность SEQ ID NO: 4, например, IC50, составляет не более чем около 400, 800, 1200, 1600, 2000 или 2400 пМ, например, при измерении с использованием анализа смешанной реакции лимфоцитов (MLR) и/или способов, описанных в примере 2 с учетом табл. 6 и фиг. 14А и 14В,

xxviii) усиленное ингибирование аллогенного ответа Т-клеток, например, пролиферации Т-клеток и продуцирования цитокинов, по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, IC50 для анализа смешанной реакции лимфоцитов (MLR) в отсутствие NK-клеток, которое составляет не более чем около 300, 400, 500, 600, 800, 1000, 1500 или 2000 пМ, например, при измерении с использованием анализа смешанной реакции лимфоцитов (MLR) и/или способов, описанных в примере 2 с учетом фиг. 15В и 15С,

xxix) усиленное ингибирование вторичного ответа на столбнячный токсин по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, IC50 для продуцирования IFN γ CD4 T_{mem}-клетками, которая составляет не более чем около 1, 2, 5, 10, 15, 20, или 25 нМ, например, при измерении с использованием анализа вторичного ответа на столбнячный токсин (TTR) и/или способов, описанных в примере 2 с учетом табл. 6 и фиг. 16А и 16В,

xxx) более медленный клиренс *in vivo* по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, клиренс из центрального объема, который составляет не более чем около 0,14, 0,16, 0,18, 0,2 или 0,22 мл/час/кг, например, измеренный с помощью способов, описанных в примере 2 с учетом табл. 11,

xxxi) повышенная чистота по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, чистота, по меньшей мере около 98% или 99% при измерении с использованием капиллярного гель-электрофореза и/или способов, описанных в примере 1 или 4, или

xxxii) пониженный уровень модификации сиаловой кислоты по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, с чистотой не более чем около 20, 18, 16, 14, 12, 10, 9, 8 или 7 нмоль сиаловой кислоты/нмоль полипептида при измерении с помощью капиллярного гель-электрофореза и/или метода, описанного в примерах 1 или 4.

Е2. Выделенная полипептидная молекула Е1, в которой молекула полипептида имеет усиленную мономерную экспрессию по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, например, демонстрируя процентное содержание мономеров более чем около 70, 75, 80, 85, 90 или 95%, например, при измерении с использованием SEC и/или способов, описанных в примере 1 с учетом фиг. 3А.

Е3. Выделенная полипептидная молекула Е1 или Е2, в которой молекула полипептида имеет повышенную мономерную экспрессию и пониженную мультимерную экспрессию по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, демонстрируя процентное содержание мономеров, превышающее около 75, 80, 85, 90 или 95%, процентное содержание низкомолекулярных соединений (LMWS), которое составляет менее около 10, 8, 6, 4 или 2%, и/или процентное содержание высокомолекулярных частиц (HMWS), которое составляет менее около 5, 2 или 1%, например, измеренное с помощью SEC и/или способов, описанных в примере 1 с учетом фиг. 6С.

Е4. Выделенная молекула полипептида по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида имеет пониженную склонность к агрегации при тепловом стрессе по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, например, демонстрируя процентное содержание мономеров более чем около 90, 92 или 95% после инкубации при 37,4°C в течение 24 ч, и/или демонстрируя процентное содержание мономеров более чем около 75, 80 или 85% после инкубации при 40°C в течение 24 ч, например, при измерении с помощью SEC и/или способов, описанных в примере 1 с учетом фиг. 3D.

Е5. Выделенная молекула полипептида по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида имеет пониженную склонность к агрегации при тепловом стрессе по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, показывающую не более чем около 5, 10, 15 или 20% увеличения HMWS при 40°C и/или не более чем около 5, 10, 15, 20 или 25% увеличения HMWS при 50°C, например, при измерении с использованием SEC и/или способов, описанных в примере 1 с учетом табл. 4.

Е6. Выделенная молекула полипептида по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида имеет пониженную склонность к агрегации при низком pH по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, показывающую не более чем около 6, 7, 8 или 9% увеличения HMWS при низком pH в течение 5 ч, например, при измерении с использованием SEC и/или способов, описанных в примере 1 с учетом табл. 4.

Е7. Выделенная молекула полипептида по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида имеет повышенную стабильность при замораживании-оттаивании по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, показывающую не более чем около 0,5, 1, или 1,5% увеличения HMWS после 5 циклов замораживания-оттаивания, например, при измерении с использованием SEC и/или способов, описанных в примере 1 с учетом табл. 4.

Е8. Выделенная молекула полипептида по любому из предыдущих воплощений, где молекула по-

липептида имеет повышенную стабильность по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, показывающую не более чем около 0,5, 1, 1,5 или 2% увеличения HMMS и/или около 0,5, 1, 2, 3, 4 или 5% увеличения LMMS после 2 или 4 недель хранения при 40°C, при измерении с помощью капиллярного гель-электрофореза (CGE), эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC) и/или способов, описанных в примере 4 с учетом фиг. 30A-30C или фиг. 31A-31D.

E9. Выделенная молекула полипептида по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида имеет повышенную стабильность по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, показывающую не более чем около 0,5, 1, 1,5 или 2% увеличения HMMS и/или около 0,5, 1 или 1,5% увеличения LMMS после 2, 4 или 6 недель хранения при 25°C, при измерении с помощью SE-HPLC и/или способов, описанных в примере 4 с учетом фиг. 32A-32D.

E10. Выделенная молекула полипептида по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида имеет повышенную стабильность по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, показывающую не более чем около 0,5, 1 или 1,5% увеличения HMMS и/или около 0,5, 1 или 1,5% увеличения LMMS после 2, 4 или 6 недель хранения при 5°C, при измерении с помощью SE-HPLC и/или способов, описанных в примере 4 с учетом фиг. 33A-33D.

E11. Выделенная полипептидная молекула по любому из предыдущих воплощений, где полипептидная молекула имеет повышенный выход по сравнению с полипептидной молекулой, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, например, имеющей выход более чем около 5,5, 6, 6,5 или 7 мг на 20 мл культуры Expi293, например, измеренный с помощью способов, описанных в примере 1 с учетом фиг. 3B.

E12. Выделенная полипептидная молекула по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида имеет повышенную T_m по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, например, имеющую T_m, которая больше чем около 38, 40, 42 или 45°C.

E13. Выделенная полипептидная молекула по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида имеет повышенную T_m по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, имеющей T_m, которая больше около 40, 45, 50, 55 или 60°C.

E14. Выделенная полипептидная молекула по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида имеет повышенную T_m по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, например, имеющую T_m, которая больше около 40, 45, или 50°C, например, при измерении с помощью DSF и/или с использованием способов, описанных в примере 1 с учетом фиг. 6D.

E15. Выделенная полипептидная молекула по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида имеет повышенную T_m по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, имеющую T_m, которая больше чем около 45, 50, или 55°C, например, при измерении с помощью DSF и/или с использованием способов, описанных в примере 1 с учетом фиг. 7D.

E16. Выделенная молекула полипептида по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида имеет повышенную T_m по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, имеющей T_m, которая составляет более чем около 50 или 60°C, например, при измерении с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) и/или с использованием способов, описанных в примере 1 с учетом табл. 4.

E17. Выделенная полипептидная молекула по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида имеет T_{m1}, который составляет более чем около 55, 58, 60, 62, 64 или 66°C, и T_{m2}, который составляет более чем около 75, 78, 80 или 82°C при pH 7,5; T_{m1} составляет более чем около 55, 58, 60, 62 или 64°C и T_{m2} составляет более чем около 75, 78, 80 или 82°C при pH 5,8; или T_{m1}, которая составляет более чем около 55, 58 или 60°C, и T_{m2}, которая составляет более чем около 75, 78 или 80°C при pH 4,5, например, при измерении с помощью DSC и/или с использованием способов, описанных в примере 4 с учетом табл. 13.

E18. Выделенная полипептидная молекула по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида имеет повышенную T_m по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, имеющую T_m, которая составляет более чем около 50 или 60°C при pH 7,5 или pH 4,5; имеющий T_m более чем около 50 или 62°C при pH 5,8, например, при измерении с помощью DSC и/или с использованием способов, описанных в примере 4 с учетом табл. 14.

E19. Выделенная полипептидная молекула по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида имеет повышенную T_m по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, имеющую T_m, которая составляет более чем около 50 или 60°C, например, при измерении с помощью DSC и FabRICATOR IdeS и/или с использованием

способов, описанных в примере 4 с учетом табл. 15.

E20. Выделенная молекула полипептида по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида имеет повышенную аффинность связывания с CD2 по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, KD для CD2 человека меньше чем около 1,2, 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2, 0,1 или 0,08 мкМ, например, при измерении с помощью SPR и/или с использованием способов, описанных в примере 1 с учетом фиг. 5A.

E21. Выделенная молекула полипептида по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида имеет повышенную аффинность связывания с CD2 по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, KD для CD2 человека меньше, чем около 1,3, 1,2, 1,1 или 1 мкМ, и/или KD для CD2 яванского макака составляет менее около 1,4, 1,3, 1,2, 1,1 или 1 мкМ, например, при измерении с помощью SPR и/или с использованием способов, описанных в примере 1 с учетом фиг. 7C.

E22. Выделенная молекула полипептида по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида имеет повышенную аффинность связывания с CD2-экспрессирующими клетками по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, Kd для связывания с CD4 T_{mem}-клетками, которое составляет не более чем около 100, 200, 300 или 400 пМ, например, при измерении с использованием способов, описанных в примере 2 с учетом табл. 6.

E23. Выделенная молекула полипептида по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида имеет повышенную аффинность связывания с CD2-экспрессирующими клетками по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, рассчитанное значение IC50 для связывания с CD4 T-клетки памяти, количество которых не превышает около 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 1200 или 1500 пМ; рассчитанное значение IC50 для связывания с CD4+ TEM-клетками, которое составляет не более чем около 150, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000 или 1200 пМ; рассчитанное значение IC50 для связывания с CD4+ TCM-клетками, которое составляет не более чем около 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 или 800 пМ; рассчитанное значение IC50 для связывания с наивными CD4 T-клетками, которое составляет не более чем около 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000 или 1200 пМ; рассчитанное значение IC50 для связывания с размноженными CD4 Treg-клетками, которое составляет не более чем около 100, 200, 300, 400 или 500 пМ; рассчитанное значение IC50 для связывания с CD8 T-клетками памяти, которое составляет не более чем около 100, 200, 300, 400, 500 или 600 пМ; и/или рассчитанное значение IC50 для связывания с нативными CD8 T-клетками, которое составляет не более чем около 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 1200, 1500, 1600 или 1700 пМ, например, при измерении с использованием SPR и/или способов, описанных в примере 2 с учетом табл. 10 и фиг. 11.

E24. Выделенная молекула полипептида по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида имеет повышенную аффинность связывания с CD2-экспрессирующими клетками по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, рассчитанное Kd для связывания с CD4 T-клетки памяти, которое составляет не более чем около 100, 200, 300, 400 или 500 пМ; рассчитанное значение Kd для связывания с CD4+ TEM-клетками, которое составляет не более чем около 100, 200, 300, 400, 500 или 600 пМ; рассчитанное значение Kd для связывания с CD4+ TCM-клетками, которое составляет не более чем около 100, 200, 300, 400 или 500 пМ; рассчитанное значение Kd для связывания с наивными CD4 T-клетками, которое составляет не более чем около 100, 200, 300 или 400 пМ; рассчитанное значение Kd для связывания с размноженными CD4 Treg-клетками, которое составляет не более чем около 100, 200 или 300 пМ; рассчитанное значение Kd для связывания с CD8 T-клетками памяти, которое составляет не более чем около 50, 100 или 150 пМ; рассчитанное значение Kd для связывания с наивными CD8 T-клетками, которое составляет не более чем около 50, 100, 200, 300, 400 или 500 пМ, например, при измерении с использованием SPR и/или способов, описанных в примере 2 с учетом табл. 10 и фиг. 11.

E25. Выделенная молекула полипептида по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида имеет повышенную аффинность связывания с CD2-экспрессирующими клетками по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, сниженную EC50 для связывания с CD4+ TEM-клетками яванского макака относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, при измерении с использованием SPR и/или способов, описанных в примере 3 с учетом фиг. 18A и 18B.

E26. Выделенная молекула полипептида по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида обладает повышенной цитотоксичностью в отношении CD2-экспрессирующих клеток по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, EC50 для уничтожения CD4 T_{mem}-клеток, то есть не более чем около 400, 600, 800, 1000, 1200 или 1400 пМ, например, при измерении с использованием анализа ADCC и/или способов, описанных в примере 5 с учетом табл. 17 и фиг. 12A и 12B.

E27. Выделенная молекула полипептида по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида обладает повышенной цитотоксичностью в отношении CD2-экспрессирующих клеток по

сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, EC50 для уничтожения CD8 T_{mem}-клеток, которое составляет не более чем около 1, 5, 10, 20, 30, 40 или 50 нМ, например, при измерении с использованием анализа антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или способов, описанных в примере 5 с учетом табл. 17 и фиг. 12D.

E28. Выделенная молекула полипептида по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида обладает усиленным ингибированием аллогенного ответа T-клеток, например, пролиферации T-клеток и продуцирования цитокинов, по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, IC50, которая составляет не более чем около 400, 800, 1200, 1600, 2000 или 2400 пМ, например, при измерении с использованием анализа MLR и/или способов, описанных в примере 2 с учетом табл. 6 и фиг. 14A и 14B.

E29. Выделенная молекула полипептида по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида обладает усиленным ингибированием аллогенного ответа T-клеток, например, пролиферации T-клеток и продуцирования цитокинов, по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, IC50 в отсутствие NK-клеток, которая составляет не более чем около 300, 400, 500, 600, 800, 1000, 1500 или 2000 пМ, например, при измерении с использованием анализа MLR и/или способов, описанных в примере 2 с учетом фиг. 15B и 15C.

E30. Выделенная молекула полипептида по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида обладает усиленным ингибированием вторичного ответа столбчатого анатоксина по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, IC50 для продуцирования IFN γ CD4 T_{mem}-клетками, то есть, не более чем около 1, 2, 5, 10, 15, 20 или 25 нМ, например, при измерении с использованием анализа TTR и/или способов, описанных в примере 2 с учетом табл. 6 и фиг. 16A и 16B.

E31. Выделенная молекула полипептида по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида имеет более медленный клиренс *in vivo* по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, клиренс из центрального объема составляет не более чем около 0,14, 0,16, 0,18, 0,2 или 0,22 мл/час/кг, например, при измерении с использованием способов, описанных в примере 2 с учетом табл. 11.

E32. Выделенная молекула полипептида по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида имеет повышенную чистоту по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, чистотой, по меньшей мере около 98% или 99%, при измерении с помощью капиллярного гель-электрофореза и/или способов, описанных в примере 1 или 4.

E33. Выделенная молекула полипептида по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида имеет пониженную модификацию сиаловой кислоты по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, с чистотой не более чем около 20, 18, 16, 14, 12, 10, 9, 8 или 7 нмоль сиаловой кислоты/нмоль полипептида, при измерении с помощью капиллярного гель-электрофореза и/или способа, описанного в примерах 1 или 4.

E34. Выделенная полипептидная молекула по любому из предыдущих воплощений, где полипептидная молекула дополнительно обладает одним или несколькими из следующих свойств:

i) предпочтительное связывание с CD2^{high} TЕМ-клетками, например, с CD4⁺ и/или CD8⁺ TЕМ-клетками, например, *in vivo*,

ii) уничтожение CD2-экспрессирующих клеток (например, CD4⁺ или CD8⁺ TCM-клеток или CD4⁺ или CD8⁺ TЕМ-клеток) в присутствии NK-клеток, например, измеренное с помощью способов, описанных в примере 2 с учетом фиг. 13A,

iii) уменьшение количества CD4⁺ и/или CD8⁺ TЕМ-клеток, например, периферических CD4⁺ TЕМ-клеток, *in vivo*, например, при измерении с использованием способов, описанных в примере 2 с учетом фиг. 20A,

iv) увеличение отношения Treg/TЕМ, например, в CD4⁺ T-клетках, *in vivo*, например, при измерении с использованием способов, описанных в примере 2 с учетом фиг. 20B, или

v) увеличение соотношения Treg/TCM, например, в CD4⁺ и/или CD8⁺ T-клетках.

E35. Выделенная полипептидная молекула по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида предпочтительно связывается с CD2^{high} TЕМ-клетками, например, с CD4⁺ и/или CD8⁺ TЕМ-клетками, например, *in vivo*.

E36. Выделенная молекула полипептида по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида убивает клетки, экспрессирующие CD2 (например, клетки CD4⁺ или CD8⁺ TCM, или клетки CD4⁺ или CD8⁺ TЕМ) в присутствии NK-клеток, например, при измерении с использованием способов, описанных в примере 2 с учетом фиг. 13A.

E37. Выделенная полипептидная молекула по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида снижает TЕМ-клетки CD4⁺ и/или CD8⁺, например, периферические CD4⁺ TЕМ-клетки, *in vivo*, например, при измерении с использованием способов, описанных в примере 2 с учетом фиг. 20A.

E38. Выделенная полипептидная молекула по любому из предыдущих воплощений, в которой полипептидная молекула увеличивает соотношение Treg/TЕМ, например, в CD4⁺ T-клетках, *in vivo*, на-

пример, при измерении с использованием способов, описанных в примере 2 с учетом фиг. 20В.

Е39. Выделенная полипептидная молекула по любому из предыдущих воплощений, где полипептидная молекула увеличивает соотношение Трег/TCM, например, в CD4+ и/или CD8+ Т-клетках.

Альтернативно или в комбинации с любым из воплощений, представленных в настоящем документе (например, E1-E39), молекула полипептида имеет один или несколько из следующих признаков и воплощений.

Е40. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73 или функциональный вариант SEQ ID NO: 73 (например, последовательность имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

Е41. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, при этом молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQQIYGVVYGNVTX1HX2PSNVPX3KEX4LX5KKQKDKX6X7EX8ENSEX9RX10FSSFK

NRVYX11DTVX12SX13TIYNLTSSDEDEYEX14ESPNTDTX15KX16FLYVX17,

где X1 представляет собой F, I, L, V, A или Y,

X2 представляет собой F, I, L, V, M, A или Nle,

X3 представляет собой F, I, L, V, Nle, M или A,

X4 представляет собой F, I, L, V, M, A или Nle,

X5 представляет собой W, F, L, C или Y,

X6 представляет собой F, I, L, V, M, A или Nle,

X7 представляет собой A, V, S, L или I,

X8 представляет собой F, I, L, V, Nle, M или A,

X9 представляет собой F, I, L, V, A или Y,

X10 представляет собой A, V, S, L или I,

X11 представляет собой F, I, L, V, Nle, M или A,

X12 представляет собой S, T, A или G,

X13 представляет собой F, I, L, V, Nle, M или A,

X14 представляет собой M, L, I или F,

X15 представляет собой M, L, I или F,

X16 представляет собой F, I, L, V, A или Y и

X17 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 74),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 74 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

Е42. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQQIYGVVYGNVTX1HX2PSNVPX3KEX4LX5KKQKDKX6X7EX8ENSEX9RX10

FSSFKNRVYX11DTVX12SX13TIYNLTSSDEDEYEX14ESPNTDTX15KX16FLYVX17,

где X1 представляет собой F, I, L или V,

X2 представляет собой F, I, L или V,

X3 представляет собой F, I, L или V,

X4 представляет собой F, I, L или V,

X5 представляет собой W, F, L или C,

X6 представляет собой F, I, L или V,

X7 представляет собой A, V, S или L,

X8 представляет собой F, I, L или V,

X9 представляет собой F, I, L или V,

X10 представляет собой A, V, S или L,

X11 представляет собой F, I, L или V,

X12 представляет собой S, T, A или G,

X13 представляет собой F, I, L или V,

X14 представляет собой M, L, I или F,

X15 представляет собой M, L, I или F,

X16 представляет собой F, I, L или V, и

X17 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 75),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 75 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

E43. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, при этом молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 содержит одну или несколько мутаций (например, замену, делецию или вставку) в остатках 15, 17, 23, 26, 28, 35, 36, 38, 43, 45, 55, 60, 62, 77, 86 или 88 относительно SEQ ID NO: 3.

E44. Выделенная полипептидная молекула E43, в которой одна или несколько мутаций включают одну или несколько из следующих замен:

- i) замену, выбранную из F15I, F15L, F15V, F15A или F15Y,
- ii) замену, выбранную из V17F, V17I, V17L, V17M, V17A или V17Nle,
- iii) замену, выбранную из L23F, L23I, L23V, L23Nle, L23M или L23A,
- iv) замену, выбранную из V26F, V26I, V26L, V26M, V26A или V26Nle,
- v) замену, выбранную из W28F, W28L, W28C или W28Y,
- vi) замену, выбранную из V35F, V35I, V35L, V35M, V35A или V35Nle,
- vii) замену, выбранную из A36V, A36S, A36L или A36I,
- viii) замену, выбранную из L38F, L38I, L38V, L38Nle, L38M или L38A,
- ix) замену, выбранную из F43I, F43L, F43V, F43A или F43Y,
- x) замену, выбранную из A45V, A45S, A45L или A45I,
- xi) замену, выбранную из L55F, L55I, L55V, L55Nle, L55M или L55A,
- xii) замену, выбранную из G60S, G60T или G60A,
- xiii) замену, выбранную из L62F, L62I, L62V, L62Nle, L62M или L62A,
- xiv) замену, выбранную из M77L, M77I или M77F,
- xv) замену, выбранную из M86L, M86I или M86F, или
- xvi) замену, выбранную из F88I, F88L, F88V, F88A или F88Y.

E45. Выделенная полипептидная молекула E43, в которой одна или несколько мутаций включают одну или несколько из следующих замен:

- i) замену, выбранную из F15I, F15L или F15V,
- ii) замену, выбранную из V17F, V17I или V17L,
- iii) замену, выбранную из L23F, L23I или L23V,
- iv) замену, выбранную из V26F, V26I или V26L,
- v) замену, выбранную из W28F, W28L или W28C,
- vi) замену, выбранную из V35F, V35I или V35L,
- vii) замену, выбранную из A36V, A36S или A36L,
- viii) замену, выбранную из L38F, L38I или L38V,
- ix) замену, выбранную из F43I, F43L или F43V,
- x) замену, выбранную из A45V, A45S или A45L,
- xi) замену, выбранную из L55F, L55I или L55V,
- xii) замену, выбранную из G60S, G60T или G60A,
- xiii) замену, выбранную из L62F, L62I, L62V,
- xiv) замену, выбранную из M77L, M77I или M77F,
- xv) замену, выбранную из M86L, M86I или M86F, или
- xvi) замену, выбранную из F88I, F88L или F88V.

E46. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, где домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 76), или функциональный вариант SEQ ID NO: 76 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

E47. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, при этом полипептидная молекула включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKVX1EX2ENSEX3RX4FSSFKNRVYL

DTVSGSLTIYNLTSSDEDEYEX5ESPNITDTX6KFFLYVX7,

где X1 представляет собой A, V, S, L или I,

X2 представляет собой F, I, L, V, Nle, M или A,

X3 представляет собой F, I, L, V, A или Y,

X4 представляет собой A, V, S, L или I,

X5 представляет собой M, L, I или F,

X6 представляет собой M, L, I или F, и

X7 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 77),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 77 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

E48. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, при этом по-

липептидная молекула включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKVX1EX2ENSEX3RX4FSSFKNRVYL

DTVSGSLTIYNLTSSDEDEYEX5ESPNITDTX6KFFLYVX7,

где X1 представляет собой A, V, S или L,

X2 представляет собой F, I, L или V,

X3 представляет собой F, I, L или V,

X4 представляет собой A, V, S или L,

X5 представляет собой M, L, I или F,

X6 представляет собой M, L, I или F, и

X7 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 78),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 78 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

E49. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, при этом полипептидная молекула включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKVX1EX2ENSEX3RX4FSSFKNRVYL

DTVSGSLTIYNLTSSDEDEYEX5ESPNITDTX6KFFLYVX7,

где X1 представляет собой V, L или A,

X2 представляет собой F или L,

X3 представляет собой V, I, L или F,

X4 представляет собой A, V или S,

X5 представляет собой M, F, I или L,

X6 представляет собой F, M, I или L, и

X7 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 79),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 79 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

E50. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, где эта полипептидная молекула включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKVX1EFENSEX2RX3FSSFKNRVYLD

TVSGSLTIYNLTSSDEDEYEX4ESPNITDTX5KFFLYVX6,

где X1 представляет собой V или L,

X2 представляет собой V, I или L,

X3 представляет собой A или V,

X4 представляет собой M или F,

X5 представляет собой F или M, и

X6 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 80),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 80 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

E51. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, где эта полипептидная молекула включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKVX1EFENSEX2RX3FSSFKNRVYLD

TVSGSLTIYNLTSSDEDEYEX4ESPNITDTX5KFFLYVX6,

где X1 представляет собой V или L,

X2 представляет собой V, I или L,

X3 представляет собой A или V,

X4 представляет собой M или F,

X5 представляет собой F или M, и

X6 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 80).

E52. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, при этом полипептидная молекула включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKVX1EFENSEX2RX3FSSFKNRVYLD

TVSGSLTIYNLTSSDEDEYEX4ESPNITDTFKFFLYVX5,

где X1 представляет собой V или L,

X2 представляет собой V, I или L,

X3 представляет собой A или V,

X4 представляет собой M или F, и

X5 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 81),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 81 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

E53. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, при этом полипептидная молекула включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKVX1EFENSEX2RX3FSSFKNRVYLD

TVSGSLTIYNLTSSDEDEYEX4ESPNITDTFKFFLYVX5,

где X1 представляет собой V или L,

X2 представляет собой V, I или L,

X3 представляет собой A или V,

X4 представляет собой M или F, и

X5 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 81).

E54. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, при этом полипептидная молекула включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKVVEFENSEX1RX2FSSFKNRVYLD

VSGSLTIYNLTSSDEDEYEX3ESPNITDTFKFFLYVX4,

где X1 представляет собой V или I,

X2 представляет собой A или V,

X3 представляет собой M или F, и

X4 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 82),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 82 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

E55. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, при этом полипептидная молекула включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKVVEFENSEX1RX2FSSFKNRVYLD

VSGSLTIYNLTSSDEDEYEX3ESPNITDTFKFFLYVX4,

где X1 представляет собой V или I,

X2 представляет собой A или V,

X3 представляет собой M или F, и

X4 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 82).

E56. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 17-23, или ее функциональный вариант (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

E57. Выделенная полипептидная молекула E56, дополнительно содержащая аминокислотный остаток Leu или аминокислотную последовательность LESLPS (SEQ ID NO: 118).

E58. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, при этом молекула полипептида включает домен LFA3, где домен LFA3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 26-29, или ее функциональный вариант (например, последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

E59. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, где эта полипептидная молекула включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17 или ее функциональный вариант (например, последовательность, имеющую не менее 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

E60. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.

E61. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, где эта полипептидная молекула включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 или ее функциональный вариант (например, последовательность, имеющая не

SEQ ID NO: 27.

E78. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28 или ее функциональный вариант (например, последовательность, имеющую не менее 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

E79. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28.

E80. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, где эта полипептидная молекула включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29 или ее функциональный вариант (например, последовательность, имеющую не менее 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

E81. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, где домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

E82. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, где домен LFA3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 24 или 25, или ее функциональный вариант (например, последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

E83. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, где эта полипептидная молекула включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24 или ее функциональный вариант (например, последовательность, имеющую не менее 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

E84. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24.

E85. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25 или ее функциональный вариант (например, последовательность, имеющую не менее 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

E86. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 25.

E87. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, при этом молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 30-41, или ее функциональный вариант (например, последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

E88. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 30-41.

E89. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, при этом молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 содержит одну или несколько мутаций (например, замену, делецию или вставку) в остатках 36, 38, 43, 45, 77 или 86 относительно SEQ ID NO: 3, пронумерованных в соответствии с SEQ ID NO: 3.

E90. Выделенная полипептидная молекула E89, где одна или несколько мутаций включает одну или несколько из следующих замен:

- i) замену, выбранную из A36V, A36S, A36L или A36I,
- ii) замену, выбранную из L38F, L38I, L38V, L38Nle, L38M или L38A,
- iii) замену, выбранную из F43I, F43L, F43V, F43A или F43Y,
- iv) замену, выбранную из A45V, A45S, A45L или A45I,
- v) замену, выбранную из M77L, M77I или M77F, или
- vi) замену, выбранную из M86L, M86I или M86F.

E91. Выделенная полипептидная молекула E89, где одна или несколько мутаций включает одну или несколько из следующих замен:

- i) замену, выбранную из A36V, A36S или A36L,
- ii) замену, выбранную из L38F, L38I или L38V,

- iii) замену, выбранную из F43I, F43L или F43V,
- iv) замену, выбранную из A45V, A45S или A45L,
- v) замену, выбранную из M77L, M77I или M77F, или
- vi) замену, выбранную из M86L, M86I или M86F.

E92. Выделенная полипептидная молекула E89, где одна или несколько мутаций включает одну или несколько из следующих замен:

- i) замену, выбранную из A36V или A36L,
- ii) замену L38F,
- iii) замену, выбранную из F43V, F43I или F43L,
- iv) замену, выбранную из A45V или A45S,
- v) замену, выбранную из M77L, M77I или M77F, или
- vi) замену, выбранную из M86L, M86I или M86F.

E93. Выделенная полипептидная молекула E89, где одна или несколько мутаций включает одну или несколько из следующих замен:

- i) замену, выбранную из A36V или A36L,
- ii) замену L38F,
- iii) замену, выбранную из F43V, F43I или F43L,
- iv) замену A45V,
- v) замену M77F или
- vi) замену M86F.

E94. Выделенная полипептидная молекула E89, где одна или несколько мутаций включает одну или несколько из следующих замен:

- i) замену A36V,
- ii) замену L38F,
- iii) замену, выбранную из F43V или F43I,
- iv) замену A45V,
- v) замену M77F, или
- vi) замену M86F.

E95. Выделенная полипептидная молекула E89, где одна или несколько мутаций включает одну или несколько из следующих замен:

- i) замену A36V,
- ii) замену L38F,
- iii) замену F43V, или
- iv) замену M86F.

E96. Выделенная полипептидная молекула E89, где мутации включают следующие замены: A36V, L38F, F43V и M86F.

E97. Выделенная полипептидная молекула E89, где одна или несколько мутаций включает одну или несколько из следующих замен:

- i) замену A36V,
- ii) замену L38F,
- iii) замену F43V,
- iv) замену A45V,
- v) замену M77F, или
- vi) замену M86F.

E98. Выделенная полипептидная молекула E89, где одна или несколько мутаций включает одну или несколько из следующих замен:

- i) замену A36V,
- ii) замену L38F,
- iii) замену F43I,
- iv) замену A45V,
- v) замену M77F или
- vi) замену M86F.

E99. Выделенная молекула полипептида по любому из предыдущих воплощений, где молекула полипептида дополнительно включает от 1 до 10, например, от 1 до 6 аминокислотных остатков из внеклеточного домена SEQ ID NO: 2, например, аминокислотных остатков 93-187 из SEQ ID NO: 2.

E100. Выделенная полипептидная молекула по любому из предыдущих воплощений, где полипептидная молекула дополнительно включает один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислотных остатков LESLPSPTLTCALTNCSIIEV (SEQ ID NO: 119).

E101. Выделенная полипептидная молекула по любому из предыдущих воплощений, где полипептидная молекула дополнительно включает один, два, три, четыре, пять или все аминокислотные остатки LESLPS (SEQ ID NO: 118).

E102. Выделенная молекула полипептида по любому из предыдущих воплощений, дополнительно

включающая второй домен, например, молекула полипептида представляет собой молекулу гибридного белка.

E103. Выделенная полипептидная молекула E102, в которой домен LFA3 связан со вторым доменом, например, через линкер или без линкера, например, С-конец домена LFA3 связан с N-концом второго домена или N-конец домена LFA3 связан с С-концом второго домена, необязательно, где С-конец домена LFA3 связан с N-концом второго домена без линкера.

E104. Выделенная полипептидная молекула E102 или E103, в которой второй домен способен образовывать димер с другим вторым доменом, например, через межмолекулярную дисульфидную связь.

E105. Выделенная полипептидная молекула по любому из E102-E104, где:

i) второй домен способен опосредовать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) или

ii) второй домен способен связываться и активировать клетки, экспрессирующие CD16, например, экспрессирующие CD16 НК-клетки или макрофаги, экспрессирующие CD16.

E106. Выделенная полипептидная молекула по любому из E102-E105, где второй домен представляет собой белок иммуноглобулина, например, константную область тяжелой цепи, например, константную область тяжелой цепи человека, или ее функциональный вариант.

E107. Выделенная полипептидная молекула по любому из E102-E106, где второй домен включает область Fc тяжелой цепи (например, тяжелую цепь IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4, например, тяжелую цепь IgG1 человека) или функциональный его вариант, например, в котором второй домен содержит шарнирную область, область CH2 и область CH3 или их функциональный вариант.

E108. Выделенная полипептидная молекула по любому из E102-E107, где второй домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16 или ее функциональный вариант (например, последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), например, где второй домен включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

E109. Выделенный полипептид или его фрагмент, который специфически связывается с CD2, содержащий первый домен и второй домен,

где первый домен включает полипептид, включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 26, и где полипептид не содержит аминокислоту SEQ ID NO: 3; и

где второй домен включает полипептид, включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 16.

E110. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, при этом молекула полипептида включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69 или ее функциональный вариант (например, последовательность, имеющую не менее 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где молекула полипептида не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

E111. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, при этом молекула полипептида включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69.

E112. Выделенная мультимерная (например, димерная) белковая молекула, содержащая две или более полипептидных молекул любого из предыдущих воплощений.

E113. Выделенная мультимерная (например, димерная) белковая молекула, содержащая две или более молекул полипептида, содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26 или ее функциональный вариант (например, последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где молекула полипептида не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

E114. Выделенная мультимерная (например, димерная) белковая молекула, содержащая две или более полипептидных молекул, содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

E115. Выделенная мультимерная (например, димерная) белковая молекула, содержащая две или более полипептидных молекул, содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69 или ее функциональный вариант (например, последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где молекула полипептида не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

E116. Выделенная мультимерная (например, димерная) белковая молекула, содержащая две или более полипептидных молекул, содержащих аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69.

E117. Молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептидную молекулу по любому из E1-E111 или мультимерную белковую молекулу по любому из E112-E116.

E118. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 44-50, 53-56, 122 или 123, или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности, при этом молекула нуклеиновой кислоты не содержит нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

E119. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, выбранную

из SEQ ID NO: 44-50, 53-56, 122 или 123.

E120. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 53 или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности, при этом молекула нуклеиновой кислоты не содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, необязательно, где молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 53.

E121. Молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 123 или нуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности, при этом молекула нуклеиновой кислоты не включает нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, необязательно, где молекула нуклеиновой кислоты включает нуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 123.

E122. Вектор, включающий молекулу нуклеиновой кислоты по любому из E117-E121.

E123. Клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по любому из E117-E121 или вектора E122.

E124. Клетка-хозяин по E123, где клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего.

E125. Клетка-хозяин E124, где клетка-хозяин представляет собой клетку CHO, клетку COS, клетку HEK293, клетку NS0, клетку PER.C6® или клетку Sp2.0.

E126. Фармацевтическая композиция, включающая полипептидную молекулу по любому из E1-E111 или мультимерную белковую молекулу по любому из E112-E116, и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

E127. Фармацевтическая композиция E126, дополнительно включающая буферный солевой раствор ГЭПЭС (ГЭПЭС).

E128. Фармацевтическая композиция E126, в которой молекула полипептида по любому из E1-E111 или мультимерная белковая молекула по любому из E112-E116 составлена в концентрации около 0,015, около 0,15 или около 1,5 мг/мл.

E129. Способ получения выделенной молекулы полипептида, которая специфически связывается с CD2, включающий культивирование клетки-хозяина по любому из E123-E125 в условиях, в которых молекула полипептида экспрессируется клеткой-хозяином.

E130. Способ E129, дополнительно включающий выделение молекулы полипептида.

E131. Молекулу полипептида получают с использованием способа E129 или E130.

E132. Способ снижения активности CD2, например, снижения передачи сигнала CD2, у объекта, который в этом нуждается, способ, включающий введение объекту терапевтически эффективного количества молекулы полипептида по любому из E1-E111, мультимерной белковой молекулы по любому из E112-E116 или фармацевтической композиции по любому из E126-E128.

E133. Способ уменьшения количества CD2-экспрессирующих клеток, например, CD2-экспрессирующих Т-клеток памяти, например, CD2-экспрессирующих ТЕМ-клеток, например, CD2-экспрессирующих CD4+ ТЕМ-клеток или CD8+ ТЕМ-клеток у объекта, нуждающегося в этом, способ включающий введение объекту терапевтически эффективного количества полипептидной молекулы по любому из E1-E111, мультимерной белковой молекулы по любому из E112-E116 или фармацевтической композиции по любому из E126-E128.

E134. Способ увеличения соотношения Treg/ТЕМ или соотношения Treg/ТСМ, например, в CD4+ и/или CD8+ Т-клетках, у объекта, нуждающегося в этом, способ, включающий введение объекту терапевтически эффективного количества молекулы полипептида по любому из E1-E111, мультимерной белковой молекулы по любому из E112-E116 или фармацевтической композиции по любому из E126-E128.

E135. Способ нарушения взаимодействия между CD2 и существующей в природе молекулой LFA3 у объекта, нуждающегося в этом, способ, включающий введение объекту терапевтически эффективного количества молекулы полипептида по любому из E1-E111, мультимерной белковой молекулы по любому из E112-E116 или фармацевтической композиции по любому из E126-E128.

E136. Способ лечения воспалительного заболевания, расстройства или состояния у объекта, нуждающегося в этом, способ включает введение объекту терапевтически эффективного количества полипептидной молекулы по любому из E1-E111, мультимерной белковой молекулы по любому из E112-E116, или фармацевтической композиции по любому из E126-E128.

E137. Способ лечения аутоиммунного заболевания, расстройства или состояния у объекта, нуждающегося в этом, способ включает введение объекту терапевтически эффективного количества полипептидной молекулы по любому из E1-E111, мультимерной белковой молекулы по любому из E112-E116, или фармацевтической композиции по любому из E126-E128.

E138. Способ лечения объекта, нуждающегося в иммуносупрессии, включающий введение объекту терапевтически эффективного количества полипептидной молекулы по любому из E1-E111, мультимерной белковой молекулы по любому из E112-E116 или фармацевтической композиции по любому из E126-E128.

E139. Способ лечения заболевания, расстройства или состояния, связанного с aberrантным Т-клеточным ответом памяти или опосредованного им у объекта, нуждающегося в этом, способ, вклю-

чающий введение объекту терапевтически эффективного количества полипептидной молекулы по любому из E1-E111, мультимерной белковой молекулы по любому из E112-E116 или фармацевтической композиции по любому из E126-E128.

E140. Способ по любому из E132-E139, где объектом является человек.

E141. Способ по любому из E132-E140, включающий введение молекулы полипептида, молекулы мультимерного белка или фармацевтической композиции подкожно, внутримышечно или внутривенно.

E142. Способ по E141, включающий введение молекулы полипептида, молекулы мультимерного белка или фармацевтической композиции подкожно.

E143. Способ по E141, включающий введение молекулы полипептида, мультимерной белковой молекулы или фармацевтической композиции внутримышечно.

E144. Способ по E141, включающий введение молекулы полипептида, мультимерной белковой молекулы или фармацевтической композиции внутривенно.

E145. Способ по любому из E132-E144, где введение молекулы полипептида, молекулы мультимерного белка или фармацевтической композиции имеет одно или несколько из следующих свойств:

i) молекулу полипептида, мультимерную белковую молекулу или фармацевтическую композицию вводят два раза в неделю, один раз в неделю, один раз каждые две недели или один раз каждые три недели, например, один раз в неделю,

ii) молекулу полипептида, мультимерную белковую молекулу или фармацевтическую композицию вводят в дозе около 5-20 мг/неделю (например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17 или 20 мг в неделю), например, около 7,5 мг в неделю,

iii) молекулу полипептида, мультимерную белковую молекулу или фармацевтическую композицию вводят в дозе около 0,2-8 мг на инъекцию (например, 0,2, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5 или 8 мг на инъекцию), например, между 0,22-7,5 мг на инъекцию или 7,5 мг на инъекцию,

iv) молекулу полипептида, мультимерную белковую молекулу или фармацевтическую композицию вводят около в 0,5-2,0 мл раствора на инъекцию (например, 0,5, 1 или 1,5 мл раствора на инъекцию), например, около в 1 мл раствора на инъекцию, или

v) молекулу полипептида, мультимерную белковую молекулу или фармацевтическую композицию вводят одним или несколькими курсами, например, каждый курс состоит из 10-14 недель (например, 10, 11, 12, 13 или 14 недель), например, 12 недель, например, при этом два смежных курса разделены интервалом от 10 до 14 недель (например, интервалом в 10, 11, 12, 13 или 14 недель), например, 12 недельным интервалом,

необязательно где: молекула полипептида, мультимерная белковая молекула или фармацевтическая композиция вводятся подкожно в дозе около 15 мг/неделю один раз в неделю, например, где мультимерная белковая молекула или фармацевтическая композиция вводятся в течение одного или нескольких курсов, где каждый курс состоит из 12 недель, а два смежных курса разделены 12-недельным интервалом.

E146. Способ по любому из E132-E144, в котором молекулу полипептида, молекулу мультимерного белка или фармацевтическую композицию вводят в дозе около 0,03, около 0,3, около 3 или около 100 мг/кг.

E147. Способ по любому из E132-E144, где молекулу полипептида, молекулу мультимерного белка или фармацевтическую композицию вводят в объеме дозы около 2 мл/кг.

E148. Способ по любому из E132-E144, где молекулу полипептида, молекулу мультимерного белка или фармацевтическую композицию вводят подкожно в дозе около 7,5 мг/неделю.

E149. Способ по любому из E132-E144, где молекулу полипептида, молекулу мультимерного белка или фармацевтическую композицию вводят еженедельно.

E150. Полипептидная молекула по любому из E1-E111, мультимерная белковая молекула по любому из E112-E116 или фармацевтическая композиция по любому из E126-E128 для применения в качестве лекарственного средства.

E151. Полипептидная молекула по любому из E1-E111, мультимерная белковая молекула по любому из E112-E116 или фармацевтическая композиция по любому из E126-E128 для применения при снижении активности CD2 у объекта.

E152. Полипептидная молекула по любому из E1-E111, мультимерная белковая молекула по любому из E112-E116 или фармацевтическая композиция по любому из E126-E128 для применения при лечении объекта, нуждающегося в иммуносупрессии.

E153. Полипептидная молекула по любому из E1-E111, мультимерная белковая молекула по любому из E112-E116 или фармацевтическая композиция по любому из E126-E128 для применения при лечении аутоиммунного заболевания, расстройства или состояния у объекта.

E154. Способ или применение по любому из E132-E153, где объект страдает одним или несколькими из следующих заболеваний, нарушений или состояний: диабет 1 типа, псориаз, пятнистый псориаз, пальмоплантарный пустулез, пустулезный псориаз ладоней и ступней, ладонно-подошвенный пустулез, пустулез ладоней и ступней, атопический дерматит, красный плоский лишай, болезнь трансплантат против хозяина (GVHD), витилиго, красный волосистый педириаз, трансплантация (например, транспланта-

ция органов, например, трансплантация почки), псориатический артрит, заболевание, расстройство или состояние, требующее аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, талассемия, серповидноклеточная анемия, тромбастения Гланцмана, синдром Вискотта-Олдрича, хроническая гранулематозная болезнь, тяжелая врожденная нейтропения, недостаточность адгезии лейкоцитов, синдром Швахмана-Даймонда, анемия Даймонда-Блэкфана, анемия Фанкони, врожденный дискератоз, синдром Чедиака-Хигаши, апластическая анемия, очаговая алопеция и Т-клеточная лимфома (например, кожная Т-клеточная лимфома или периферическая Т-клеточная неходжкинская лимфома).

E155. Способ или применение по любому из E132-E153, где объект страдает одним или несколькими из следующих заболеваний, расстройств или состояний: сахарный диабет (например, сахарный диабет I типа или инсулинозависимый сахарный диабет); ювенильный диабет; воспалительные реакции, такие как воспалительные кожные заболевания, включая псориаз и дерматит (например, атопический дерматит); дерматомиозит; системная склеродермия и склероз; реакции, связанные с воспалительным заболеванием кишечника (такими как болезнь Крона и язвенный колит); респираторный дистресс-синдром (включая респираторный дистресс-синдром взрослых; ARDS); дерматит; менингит; энцефалит; увеит; колит; гастрит; гломерулонефрит; аллергические состояния, такие как экзема и астма, и другие состояния, включающие инфильтрацию Т-клеток и хронические воспалительные реакции; атеросклероз; недостаточность адгезии лейкоцитов; ревматоидный артрит; системная красная волчанка (SLE); рассеянный склероз; Синдром Рейно; аутоиммунный тиреоидит; аллергический энцефаломиелит; Синдром Шегрена; и иммунные ответы, связанные с острой и замедленной гиперчувствительностью, опосредованной цитокинами и Т-лимфоцитами, обычно обнаруживаемыми при туберкулезе, саркоидозе, полимиозите, гранулематозе и васкулите; Болезнь Вегенера; злокачественную анемию (болезнь Аддисона); заболевания, сопровождающиеся диapedезом лейкоцитов; воспалительное заболевание центральной нервной системы (ЦНС); синдром полиорганной травмы; гемолитическую анемию (включая, помимо прочего, криоглобинемию или анемию Кумбса); миастению; заболевания, опосредованные комплексом антиген-антитело; легочный гемосидероз с гломерулонефритом; антифосфолипидный синдром; аллергический неврит; Болезнь Грейвса; миастенический синдром Ламберта-Итона; пемфигоид буллезный; пузырчатку; аутоиммунные полиэндокринопатии; витилиго; Болезнь Рейтера; синдром скованного человека; Болезнь Беше; гигантоклеточный артериит; иммунокомплексный нефрит; нефропатию IgA; полинейропатии IgM; иммунную тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП) или аутоиммунную тромбоцитопению и аутоиммунные гемолитические заболевания; тиреоидит Хашимото; аутоиммунный гепатит; аутоиммунную гемофилию; аутоиммунный лимфопрлиферативный синдром (ALPS); аутоиммунный увеоретинит; синдром Гийена-Барре; синдром Гудпасчера; смешанное заболевание соединительной ткани; бесплодие, связанное с аутоиммунным заболеванием; узелковый полиартериит; очаговую алопецию; идиопатическую микседему; болезнь трансплантат против хозяина; мышечная дистрофия (Дюшенна, Беккера, миотоническая, конечностно-поясная, лицево-плечевая, врожденная, окулофарингеальная, дистальная, Эмери-Дрейфуса); и воспалительное неиммунное заболевание, такое как болезнь сердца или болезнь мозга.

E156. Способ или применение по любому из E132-E153, где:

- i) у объекта диабет,
- ii) у объекта диабет I типа (T1D),
- iii) у объекта новый эпизод T1D,
- iv) у объекта новый эпизод T1D с остаточной функцией β -клеток,
- v) у объекта диагностирован новый эпизод T1D в течение менее 100 дней),
- vi) объект является пациентом с T1D на стадии преддиабета,
- vii) объект имеет T1D стадии 2, например, объект демонстрирует дисгликемию, имеет предсимптомное заболевание и/или является положительным, по меньшей мере, по двум аутоантителам, ассоциированным с T1D,
- viii) объект имеет T1D стадии 3, например, объект проявляет гипергликемию, имеет симптоматическое заболевание и/или является положительным, по меньшей мере, по двум аутоантителам, ассоциированным с T1D, или
- ix) объект является положительным по одному или нескольким аутоантителам, ассоциированным с T1D.

E157. Способ или применение по любому из E132-E156, дополнительно включающий введение объекту второй терапии, необязательно, где вторая терапия усиливает активность Treg или увеличивает количество Treg, при этом вторая терапия необязательно включает IL-2.

E158. Способ или применение E156, где объект страдает диабетом, например, диабетом I типа, например, впервые возникшим диабетом I типа, а вторая терапия включает инсулин.

E159. Способ обнаружения CD2 в образце, ткани или клетке с использованием полипептидной молекулы по любому из E1-E111, мультимерной белковой молекулы по любому из E112-E116 или фармацевтической композиции по любому из E126-E128, включающий контакт образца, ткани или клетки с молекулой полипептида, молекулой мультимерного белка или фармацевтической композицией и обнаружение молекулы полипептида, молекулы мультимерного белка или фармацевтической композиции.

E160. Набор, включающий полипептидную молекулу по любому из E1-E111, мультимерную белко-

вую молекулу по любому из E112-E116 или фармацевтическую композицию по любому из E126-E128.

E161. Выделенная молекула полипептида или ее функциональный вариант, который специфически связывается с CD2,

где молекула полипептида включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 69, и

где молекула полипептида не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

E162. Выделенная полипептидная молекула или ее функциональный вариант E161,

где молекула полипептида включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 69, и

где молекула полипептида не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

E163. Выделенная полипептидная молекула E161 или E162, где полипептидная молекула включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69.

E164. Выделенный полипептид или его функциональный вариант, который специфически связывается с CD2, включающий домен LFA3, включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 17-41, и где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

E165. Выделенный полипептид или его функциональный вариант, по E164, аминокислотная последовательность которого представляет собой SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23, и где домен LFA3 дополнительно включает аминокислотный остаток Leu или аминокислотную последовательность LESLPS (SEQ ID NO: 118).

E166. Выделенный полипептид или его функциональный вариант, по E164, где домен LFA3 включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 26, и где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

E167. Выделенный полипептид по E164 или E166, где домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26.

E168. Выделенный полипептид или его функциональный вариант, включающий домен LFA3,

где домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 с одной или несколькими мутациями в остатках 36, 38, 43 и 86, пронумерованных в соответствии с SEQ ID NO: 3.

E169. Выделенный полипептид или его функциональный вариант по E168, где домен LFA3 дополнительно включает аминокислотный остаток Leu или аминокислотную последовательность LESLPS (SEQ ID NO: 118).

E170. Выделенный полипептид или его функциональный вариант по E168 или E169, где одна или несколько мутаций в остатках 36, 38, 43 и 86, пронумерованных согласно SEQ ID NO: 3, представляют собой A36V, L38F, F43V и M86F.

E171. Выделенный полипептид или его функциональный вариант по любому из E164-E170, дополнительно включающий второй домен,

где второй домен включает белок иммуноглобулина, например, константную область тяжелой цепи, например, константную область тяжелой цепи человека, или ее функциональный вариант;

где второй домен включает область Fc тяжелой цепи (например, тяжелой цепи IgG1 человека) или ее функциональный вариант; или

где второй домен включает шарнирную область, область CH2 и область CH3 или их функциональный вариант.

E172. Выделенный полипептид или его функциональный вариант по любому из E164-E171, дополнительно включающий второй домен, где второй домен включает домен Fc, включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности SEQ ID NO: 16.

E173. Выделенный полипептид или его функциональный вариант E172, где второй домен включает домен Fc, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

E174. Выделенный полипептид или его функциональный вариант по любому из E171-E173, дополнительно включающий линкер, где линкер связывает N-конец второго домена с C-концом домена LFA3.

E175. Выделенный полипептид или его функциональный вариант по любому из E171-E174, где:

i. второй домен способен образовывать димер с другим вторым доменом, например, через межмолекулярную дисульфидную связь, и/или

ii. второй домен способен опосредовать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC).

E176. Выделенный полипептид или его функциональный вариант по любому из E171-E175,

где домен LFA3 включает полипептид, включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 26, и где полипептид не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и

где домен Fc включает полипептид, включающий аминокислотную последовательность, имеющую

по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 16.

E177. Выделенный полипептид или его функциональный вариант по любому из E171-E175, отличающийся тем, что полипептид или его функциональный вариант включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и

отличающийся тем, что аминокислотная последовательность включает одну или несколько мутаций в остатках 36, 38, 43, 86, 92, 228 и 230, пронумерованных в соответствии с SEQ ID NO: 4.

E178. Выделенный полипептид или его фрагмент E177, в котором одна или несколько мутаций в остатках 36, 38, 43, 86, 92, 228 и 230, пронумерованных согласно SEQ ID NO: 4, представляют собой A36V, L38F, F43V, M86F, V92_D93insL, D228E и L230M.

E179. Выделенная полипептидная молекула, которая связывается, например, специфически связывается с CD2, отличающаяся тем, что молекула полипептида включает домен LFA3 и обладает одним или несколькими из следующих свойств:

i) повышенная мономерная экспрессия, продемонстрированная процентным содержанием мономера, которое на около 70, 75, 80, 85, 90 или 95% выше по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, при измерении с помощью эксклюзионной хроматографии,

ii) повышенная мономерная экспрессия и сниженная мультимерная экспрессия, демонстрируемые процентным содержанием мономера, превышающим около 75, 80, 85, 90 или 95%, процентным содержанием низкомолекулярных веществ (LMWS), которое меньше, чем около 10, 8, 6, 4 или 2%, и/или процентным содержанием высокомолекулярных веществ (HMWS), которое меньше, чем около 5, 2 или 1% по отношению к молекуле полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с использованием эксклюзионной хроматографии,

iii) снижение склонности к агрегации при тепловом стрессе, демонстрируемое процентным содержанием мономера, превышающим около 90, 92 или 95% после инкубации при 37,4°C в течение 24 ч, и/или показывающим процентное содержание мономера, которое больше, чем около 75, 80 или 85% после инкубации при 40°C в течение 24 ч относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, при измерении с помощью эксклюзионной хроматографии,

iv) снижение склонности к агрегации при термическом стрессе, демонстрируемое увеличением HMWS не более чем около 5, 10, 15 или 20% при 40°C и/или не более чем около 5, 10, 15, 20 или 25% увеличения HMWS при 50°C относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с помощью эксклюзионной хроматографии,

v) сниженная склонность к агрегации при низком pH, продемонстрированная не более чем около 6, 7, 8 или 9% увеличения HMWS при низком pH в течение 5 ч по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с использованием эксклюзионной хроматографии,

vi) повышенная стабильность, о чем свидетельствует увеличение HMMS не более чем на 0,5, 1, 1,5 или 2% и/или увеличение LMMS на 0,5, 1, 2, 3, 4 или 5% после 2 или 4 недель хранения при 40°C относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с помощью капиллярного гель-электрофореза (CGE) или эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC),

vii) повышенная стабильность по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, демонстрирующая не более чем около 0,5, 1, 1,5 или 2% увеличения HMMS и/или около 0,5, 1 или 1,5% увеличения LMMS через 2, 4 или 6 недель хранения при 25°C, при измерении с помощью SE-HPLC,

viii) повышенная стабильность по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, демонстрирующая не более чем около 0,5, 1 или 1,5% увеличения HMMS и/или около 0,5, 1 или 1,5% увеличения LMMS через 2, 4 или 6 недель хранения при 5°C, при измерении с помощью SE-HPLC,

ix) повышенная стабильность при замораживании-оттаивании, продемонстрированная не более чем около 0,5, 1 или 1,5% увеличения HMWS после 5 циклов замораживания-оттаивания по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с использованием эксклюзионной хроматографии,

x) повышенный выход, о чем свидетельствует выход, который составляет более чем около 5,5, 6, 6,5 или 7 мг на 20 мл культуры Expi293 по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120,

xi) повышенная T_m, о чем свидетельствует T_m, которая составляет более чем около 38, 40, 42, 45 или 50°C относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, при измерении с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF),

xii) повышенная T_m, о чем свидетельствует T_m, которая составляет более чем около 40, 45, 50, 55 или 60°C относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с помощью DSF,

xiii) повышенная T_m, о чем свидетельствует T_m, которая составляет более чем около 50 или 60°C

относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, измеренную с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC),

xiv) Tm1 составляет более чем около 55, 58, 60, 62, 64 или 66°C и Tm2 составляет более чем около 75, 78, 80 или 82°C при pH 7,5; Tm1 составляет более чем около 55, 58, 60, 62 или 64°C и Tm2 составляет более чем около 75, 78, 80 или 82°C при pH 5,8; или Tm1 составляет более чем около 55, 58 или 60°C, и Tm2 составляет более чем около 75, 78 или 80°C при pH 4,5, при измерении с помощью DSC,

xv) повышенная Tm, о чем свидетельствует Tm, которая составляет более чем около 50 или 60°C при pH 7,5 или pH 4,5, или Tm, которая составляет более чем около 50 или 62°C при pH 5,8 относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 при измерении с помощью DSC,

xvi) повышенная Tm, о чем свидетельствует Tm, которая составляет более чем около 50 или 60°C относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с помощью DSC и FabRICATOR IdeS,

xvii) повышенная аффинность связывания с CD2, о чем свидетельствует KD для CD2 человека, которая составляет менее около 1,2, 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2, 0,1 или 0,08 мкМ по отношению к молекуле полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с помощью SPR,

xviii) повышенная аффинность связывания с CD2, о чем свидетельствует KD для CD2 человека, которая составляет менее около 1,3, 1,2, 1,1 или 1 мкМ, и/или KD для CD2 яванского макака, которая составляет менее 1,4, 1,3, 1,2, 1,1 или 1 мкМ относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с помощью SPR,

xix) повышенная аффинность связывания с CD2-экспрессирующими клетками, о чем свидетельствует Kd связывания с CD4 T_{mem}-клетками, которая составляет не более чем около 100, 200, 300 или 400 пМ относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с помощью SPR,

xx) повышенная аффинность связывания с CD2-экспрессирующими клетками, что продемонстрировано рассчитанным значением IC50 для связывания с CD4 T-клетками памяти, которое составляет не более чем около 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 1200 или 1500 пМ; рассчитанным значением IC50 для связывания с CD4+ TEM-клетками, которое составляет не более чем около 150, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000 или 1200 пМ; рассчитанным значением IC50 для связывания с CD4+ TCM-клетками, которое составляет не более чем около 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 или 800 пМ; рассчитанным значением IC50 для связывания с наивными CD4 T-клетками, которое составляет не более чем около 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000 или 1200 пМ; рассчитанным значением IC50 для связывания с размноженными CD4 Treg-клетками, которое составляет не более чем около 100, 200, 300, 400 или 500 пМ; рассчитанным значением IC50 для связывания с CD8 T-клетками памяти, которое составляет не более чем около 100, 200, 300, 400, 500 или 600 пМ; и/или рассчитанным значением IC50 для связывания с нативными CD8 T-клетками, которое составляет не более чем около 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 1200, 1500, 1600 или 1700 пМ, например, при измерении с использованием SPR и/или способов, описанных в примере 2 с учетом табл. 10 и фиг. 11, относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с помощью SPR,

xxi) повышенная аффинность связывания с CD2-экспрессирующими клетками, что продемонстрировано рассчитанным значением Kd для связывания с CD4 T-клетками памяти, которое составляет не более чем около 100, 200, 300, 400 или 500 пМ; рассчитанным значением Kd для связывания с CD4+ TEM-клетками, которое составляет не более чем около 100, 200, 300, 400, 500 или 600 пМ; рассчитанным значением Kd для связывания с CD4+ TCM-клетками, которое составляет не более чем около 100, 200, 300, 400 или 500 пМ; рассчитанным значением Kd для связывания с наивными CD4 T-клетками, которое составляет не более чем около 100, 200, 300 или 400 пМ; рассчитанным значением Kd для связывания с размноженными CD4 Treg-клетками, которое составляет не более чем около 100, 200 или 300 пМ; рассчитанным значением Kd для связывания с CD8 T-клетками памяти, которое составляет не более чем около 50, 100 или 150 пМ; рассчитанным значением Kd для связывания с наивными CD8 T-клетками, которое составляет не более чем около 50, 100, 200, 300, 400 или 500 пМ относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с помощью SPR,

xxii) повышенная аффинность связывания с CD2-экспрессирующими клетками, что продемонстрировано сниженным EC50 для связывания с CD4+ TEM-клетками яванского макака по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с помощью SPR,

xxiii) повышенная цитотоксичность против CD2-экспрессирующих клеток, продемонстрированная EC50 для уничтожения CD4 T_{mem}-клеток, которая составляет не более чем около 400, 600, 800, 1000, 1200 или 1400 пМ относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с помощью анализа антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC),

xxiv) повышенная цитотоксичность против CD2-экспрессирующих клеток, продемонстрированная EC50 для уничтожения CD8 T_{mem}-клеток, которая составляет не более чем около 1, 5, 10, 20, 30, 40 или 50 нМ относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с использованием анализа антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC),

xxv) усиленное ингибирование аллогенного Т-клеточного ответа, где аллогенный Т-клеточный ответ представляет собой пролиферацию Т-клеток и/или продуцирование цитокинов, как продемонстрировано с помощью IC50 для анализа смешанной реакции лимфоцитов (MLR), который составляет не более чем около 400, 800, 1200, 1600, 2000 или 2400 пМ относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4,

xxvi) усиленное ингибирование аллогенного Т-клеточного ответа, где аллогенный Т-клеточный ответ представляет собой пролиферацию Т-клеток и/или продуцирование цитокинов, что продемонстрировано с помощью IC50 для анализа смешанной реакции лимфоцитов (MLR) в отсутствие НК-клеток, которое составляет не более чем около 330, 400, 500, 600, 800, 1000, 1500 или 2000 пМ относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4,

xxvii) усиленное ингибирование вторичного ответа на столбнячный токсин, что продемонстрировано с помощью IC50 для продуцирования IFN γ CD4 T_{mem}-клетками, которое составляет не более чем около 1, 2, 5, 10, 15, 20 или 25 нМ относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении в анализе вторичного ответа на столбнячный токсин (TTR),

xxviii) более медленный клиренс *in vivo*, о чем свидетельствует клиренс из центрального объема, который составляет не более чем около 0,14, 0,16, 0,18, 0,2 или 0,22 мл/час/кг относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении в исследованиях ФК/ФД, и/или

xxix) повышенная чистота, по меньшей мере около 98% или 99% по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с помощью капиллярного гель-электрофореза.

E180. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая выделенный полипептид или его функциональный вариант по любому из E161-E179.

E181. Выделенная нуклеиновая кислота E180, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере около 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% идентичности с SEQ ID NO: 43, 53 и/или 123.

E182. Выделенная нуклеиновая кислота E180 или E181, содержащая последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 43, 53 и/или 123.

E183. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из E180-E182.

E184. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по любому из E180-E182 или вектора E183.

E185. Клетка-хозяин E184, где клетка-хозяин представляет собой клетку млекопитающего, выбранную из группы, состоящей из клетки Expi293, клетки ExpiCHO, клетки CHO, клетки COS, клетки HEL-293, клетки NSO, клетки PER.C6 или клетки SP2.0.

E186. Клетка-хозяин E184 или E185, где клетка-хозяин представляет собой клетку Expi293 или клетку ExpiCHO.

E187. Фармацевтическая композиция, содержащая полипептидную молекулу по любому из E161-E179 и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

E188. Фармацевтическая композиция E187, содержащая 7,5 мг полипептидной молекулы по любому из E161-E179 и буферный солевой раствор ГЭПЭС.

E189. Способ получения выделенной молекулы полипептида, которая специфически связывается с CD2, включающий культивирование клетки-хозяина по любому из E184-E186 в условиях, в которых молекула полипептида экспрессируется клеткой-хозяином.

E190. Способ E189, дополнительно включающий выделение молекулы полипептида.

E191. Выделенный полипептид по любому из E161-E179 или фармацевтической композиции E187 или E188 для применения при лечении объекта, нуждающегося в иммуносупрессии.

E192. Применение выделенного полипептида по любому из E161-E179 или фармацевтической композиции по E187 или E188 для лечения иммунного заболевания, расстройства или состояния.

E193. Способ лечения или профилактики иммунного заболевания, нарушения или состояния, опосредованного CD2, у человека, нуждающегося в этом, указанный способ включает введение объекту эффективного количества фармацевтической композиции по E187 или E188, при этом указанное заболевание, нарушение или состояние выбрано из группы, состоящей из: диабета 1 типа, псориаза, пятнистого псориаза, пальмоплантарного пустулеза, пустулезного псориаза ладоней и ступней, ладонно-подошвенного пустулеза, пустулеза ладоней и ступней, атопического дерматита, красного плоского лишая, болезни трансплантат против хозяина (GVHD), витилиго, красного волосистого питириаза, трансплантации (например, трансплантации органов, например, трансплантации почки), псориазического артрит, заболевания, расстройства или состояния, требующего аллогенной трансплантации гемопоэтиче-

ских стволовых клеток, талассемии, серповидноклеточной анемии, тромбастении Гланцмана, синдрома Вискотта-Олдрича, хронической гранулематозной болезни, тяжелой врожденной нейтропении, недостаточности адгезии лейкоцитов, синдрома Швахмана-Даймонда, анемии Даймонда-Блэкфана, анемии Фанкони, врожденного дискератоза, синдрома Чедиака-Хигаши, апластической анемии, очаговой алопеции и Т-клеточной лимфомы (например, кожной Т-клеточной лимфомы или периферической Т-клеточной неходжкинской лимфомы).

E194. Способ E193, где указанное заболевание представляет собой диабет, например, диабет 1 типа (T1D), например, новый эпизод T1D, например, новый эпизод T1D с остаточной функцией β -клеток (например, у объекта диагностирован менее 100 дней), например, стадия 2 или стадия 3 T1D.

E195. применение выделенного полипептида по любому из E161-E179 при производстве лекарственного средства для лечения иммунного заболевания, расстройства или состояния.

E196. Способ обнаружения CD2 в образце, ткани или клетке с использованием выделенного полипептида или его функционального варианта, по любому из E161-E179, включающий контакт образца, ткани или клетки с полипептидом или его функциональным вариантом и обнаружение полипептида или его функционального варианта.

E197. Способ или применение по E132-E153, где у объекта псориатический артрит.

Краткое описание чертежей

Приведенное выше краткое изложение, а также последующее подробное описание изобретения будет лучше понято при чтении вместе с прилагаемыми чертежами. Для иллюстрации изобретения на чертежах показаны воплощения. Однако следует понимать, что изобретение не ограничивается показанными точными схемами и средствами.

Фиг. 1 - дизайн структурной библиотеки для библиотек дрожжевого дисплея стабильности (S) и аффинности + стабильности (AS) первого поколения. 16 основных (библиотека S и AS) и 15 контактных остатков (библиотека AS) мутировали до 4-6 химически подобных остатков. Остатки, показанные на фиг. 1 пронумерованы согласно SEQ ID NO: 2.

Фиг. 2A-2D - встречаемость вариаций в аминокислотах в клонах, идентифицированных в библиотеках дрожжевого дисплея, идентифицировала 6 "горячих точек", фиг. 2A представляет собой график, показывающий шесть идентифицированных остатков "горячих точек". Эти шесть остатков пронумерованы в соответствии с SEQ ID NO: 2. На фиг. 2B остатки LFA3, выявленные в библиотеках, показаны жирным шрифтом, а шесть остатков "горячих точек" выделены жирным шрифтом и подчеркнуты, фиг. 2C представляет собой график, показывающий частоту изменения аминокислот в шести положениях "горячих точек", фиг. 2D представляет собой таблицу, показывающую конструирование 6 рекомбинантных вариантов M1-M6. Аминокислотные остатки в "горячих точках" указаны для каждого варианта.

Фиг. 3A-3D - типичные графики, изображающие молекулярную оценку гибридных белков LFA3 дикого типа (LFA3 WT) и вариантов M1-M6, слитых с Fc. "LFA3 WT-Pfe" и "WT-Pfe" относятся к WT LFA3-Pfe.

Фиг. 4 - дизайн структурной библиотеки для библиотеки петель FG для идентификации клонов с повышенной аффинностью связывания. Показанное в таблице на фиг. 4 является остатками, предназначенными для мутагенеза в библиотеке второго поколения. Положения остатков пронумерованы в соответствии с SEQ ID NO: 2.

Фиг. 5A и 5B - типичная характеристика вариантов LFA3 с высокой аффинностью. Клоны оценивали на аффинность связывания с рекомбинантным CD2 в анализе Biacore (SPR) (фиг. 5A) и термостабильность с помощью DSF (фиг. 5B). "LFA3-WT" относится к LFA3-Fc WT. "LFA3-Pfe" относится к WT LFA3-Pfe.

Фиг. 6A-6D - детальный дизайн варианта d1 границы домена. Типичная характеристика белков LFA3-Fc, содержащих дополнительный эндогенный остаток лейцина (d1) для мономерной экспрессии и термостабильности, с последовательностью LFA3 дикого типа (LFA3-Fc d1) или стабильными M-вариантами (M1-d1 (также упоминается как "M1d1") и M4-d1 (также упоминается как "M4d1")). "WT" на фиг. 6C относится к LFA3-Fc WT. "Pfe" на фиг. 6D относится к WT LFA3-Pfe.

Фиг. 7A-7D - аффинность к CD2 человека и яванского макака и термостабильность (DSF) вариантов доменной границы M1-d1 (также упоминается как "M1d1") и M1-d3 (также упоминается как "M1d3").

Фиг. 8A-8D - дизайн и характеристики M7-d1. Показано на фиг. 8B, 8C и 8D -примерные результаты анализа SEC, анализа термостабильности и анализа аффинности, соответственно. "LFA3-WT" на фиг. 8C и "WT" на фиг. 8D относится к LFA3-Fc WT. "LFA3-Pfe" на фиг. 8C относится к WT LFA3-Pfe.

Фиг. 9 и 10 - типичные графики, изображающие уровни CD2 в PBMC человека в состоянии покоя (фиг. 9) и после активации TCR гранулами против CD3/CD28 (фиг. 10). Среднее значение \pm стандартная погрешность среднего значения (SEM) от 4 доноров показано на фиг. 9, а один донор показан на фиг. 10. Данные выражены как среднее количество (+/- SD) молекул на клетку. NK = натуральный киллер; eff mem = Т-клетки эффекторной памяти; cen mem = Т-клетки центральной памяти; Tregs = регуляторные Т-клетки.

Фиг. 11 - типичное связывание LFA3-Fc с первичными популяциями Т-клеток человека с использованием анализа конкурентного связывания с антителом против CD2. Анализ проводили в трех повторах,

нанесено среднее значение \pm ст. откл. "WT" относится к LFA3-Fc WT (дикого типа).

Фиг. 12A-12E - примерный анализ ADCC для PBMC человека. PBMC совместно культивировали с возрастающими количествами белка LFA3-Fc (LFA3-Fc M1d1 или LFA3-Fc WT), и цитотоксичность CD4 клеток памяти (например, CD4 CD45RO+) представлена на фиг. 12A. EC50 доноров показано на фиг. 12B. Типичная зависящая от концентрации цитотоксичность CD4-клеток не-памяти (например, CD4 CD45RO-), CD8-клеток памяти (например, CD8 CD45RO+) и CD8-клеток не-памяти (например, CD8 CD45RO-) белками LFA3-Fc изображена на фиг. 12C-12E. Точки данных представляют собой среднее ($n=5$) \pm SEM.

Фиг. 13A-13C - типичные графики, изображающие анализы цитотоксичности с очищенными NK-клетками, совместно культивированными с клетками-мишенями с фиксированным количеством LFA3-Fc M1d1 или LFA3-Fc WT. Фиг. 13A: Клетки-мишени (CD4 клетки памяти) инкубировали с 250 нМ белка. Показано среднее значение трех лунок \pm ст. откл. для 1 из 5 доноров. Клетки-мишени (CD4 наивные, CD4 клетки памяти или В-клетки) инкубировали со 100 нМ LFA3-Fc WT (фиг. 13B) или LFA3-Fc M1d1 (фиг. 13C) и NK-клетками (эффекторными клетками) при различных соотношениях эффекторных клеток к клеткам-мишеням. Показано среднее значение трех лунок \pm ст. откл. для 1 донора. "WT" относится к LFA3-Fc WT.

Фиг. 14A и 14B - типичные графики, изображающие полное ингибирование LFA3-Fc M1d1 ("M1d1") размножения CD4+ Т-клеток в ответ на аллогенную стимуляцию (MLR). Показано среднее значение трех лунок \pm ст. откл. для одного донора на фиг. 14A. IC50 для нескольких доноров показана на фиг. 14B. "WT" относится к LFA3-Fc WT.

Фиг. 15A-15C - типичные графики, изображающие ингибирование LFA3-Fc M1d1 ("M1d1") для MLR в отсутствие NK-клеток. NK-клетки были либо нетронутыми (фиг. 15A), либо истощенными (фиг. 15B) с использованием магнитного выделения. Показано среднее значение трех лунок \pm ст. откл. для одного донора на фиг. 15A и 15B. IC50 в повторных экспериментах показано на фиг. 15C. "WT" относится к LFA3-Fc WT.

Фиг. 16A и 16B - типичные графики, изображающие ингибирование LFA3-Fc M1d1 ("M1-d1") вторичного ответа CD4 клеток памяти на антиген столбнячного токсина (TT). Показано среднее значение трех лунок \pm ст. откл. для одного донора на фиг. 16A. IC50 для нескольких доноров показано на фиг. 16B. "WT" относится к LFA3-Fc WT.

Фиг. 17 - типичная экспрессия CD2 на PBMC яванского макака. $N = 6$; данные выражены как среднее количество (\pm SD) молекул на клетку. NK = естественный киллер; eff mem = эффекторная память; sep mem = центральная память; Tregs = регуляторные Т-клетки.

Фиг. 18A и 18B - типичный анализ ADCC PBMC яванского макака. PBMC яванского макака совместно культивировали с увеличивающимися количествами полипептидов LFA3-Fc (M1d1 или WT), и наносили на график цитотоксичности CD4+ ТЕМ-клеток. Показано среднее значение трех лунок \pm ст. откл. для одного донора на фиг. 18A. EC50 для 3 доноров показано на фиг. 18B. "WT" относится к LFA3-Fc WT.

Фиг. 19 - экспериментальный дизайн исследования ФК/ФД 17MA057 с повторной дозой на яванском макаке.

Фиг. 20A и 20B - LFA3-Fc M1d1 снижал CD4+ ТЕМ и увеличивал соотношение Treg/CD4+ ТЕМ после повторного дозирования (черные стрелки). Типичные данные представлены как кратное изменение по сравнению с подсчетом клеток до введения дозы. Показано среднее значение \pm SEM для 4 животных.

Фиг. 21 - обработка LFA3-Fc M1d1 оказывает большее влияние на Т-клетки памяти. Типичные данные представлены как кратное изменение по сравнению с подсчетом клеток до введения дозы. Показано среднее значение \pm SEM для 4 животных.

Фиг. 22A и 22B - LFA3-Fc WT снижал CD4+ ТЕМ и увеличивал соотношение Treg/CD4+ ТЕМ после повторного введения. Типичные данные представлены как кратное изменение по сравнению с подсчетом клеток до введения дозы. Показано среднее значение \pm SEM для 4 животных. "WT" относится к LFA3-Fc WT.

Фиг. 23A и 23B - типичный ФК-профиль M1d1 и LFA3-Fc WT у яванского макака из исследования 17MA057. Доза пропорциональна 0,03-3 мг/кг.

Фиг. 24 - предполагаемые механизмы действия LFA3-Fc.

Фиг. 25A-25B - примерная количественная оценка экспрессии CD2 на человеческом KLRG1+ по сравнению с субпопуляциями KLRG1-TIGIT+PD1+ хелперных Т-клеток с использованием гранул квантибрита и проточной цитометрии. Фиг. 25A изображает экспрессию CD2 в CD4 клетках эффекторной памяти ("ЕМ"), фиг. 25B изображает экспрессию CD2 в CD4 клетках центральной памяти ("СМ"). Данные выражены в виде средней геометрической интенсивности флуоресценции (gMFI) $n=2$ донора \pm SD. KLRG1 = лектин-подобный рецептор клеток-киллеров G1; TIGIT = иммунорецептор Т-клеток с доменами Ig и ITIM.

Фиг. 26A-26B - примерная количественная оценка экспрессии CD2 на субпопуляциях хелперных Т-клеток человека с использованием гранул квантибрита и проточной цитометрии. Фиг. 26A и фиг. 26B

представляют двух доноров, проанализированных в два разных дня. Данные выражены в виде средней геометрической интенсивности флуоресценции (gMFI) +/- SD. CCR7 = C-C хемокиновый рецептор типа 7; PD1 = белок 1 запрограммированной гибели клеток; TH = Т-хелперы; Tfh = фолликулярные Т-хелперы; Tregs = регуляторные Т-клетки.

Фиг. 27 - примерный профиль дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) LFA3-Fc M1d1, приготовленного в Трис-буфере pH 7,5, гистидиновом буфере pH 5,8 или глутаматном буфере pH 4,5.

Фиг. 28 - типичный профиль дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) LFA3-Fc M1d1 после расщепления с помощью Fabricator-IdeS.

Фиг. 29A-29C - типичный анализ гетерогенности заряда LFA3-Fc M1-d1 (также упоминается как LFA3-Fc M1d1) и WT LFA3-Fc (также упоминается как LFA3-Fc WT), составленных в 20 mM Трис-буфере pH 7,5 (фиг. 29A), 20 mM гистидиновом буфере Ph 5,8 (фиг. 29B) или 20 mM глутаматном буфере pH 4,5 (фиг. 29C).

Фиг. 30A-30C - типичный анализ невосстановливающего (NR) капиллярного гель-электрофореза (CGE) LFA3-Fc M1d1 и LFA3-Fc WT, приготовленных в трис-буфере pH 7,5 (фиг. 30A), гистидиновом буфере pH 5,8 (фиг. 30B) или глутаматном буфере с pH 4,5 (фиг. 30C) в момент времени 0 и после хранения при 40°C в течение 2 или 4 недель. Был определен процент низкомолекулярных соединений (LMMS).

Фиг. 31A-31D - типичный анализ методом эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC) LFA3-Fc M1d1 и LFA3-Fc WT, приготовленных в трис-буфере pH 7,5 (фиг. 31A), гистидиновом буфере pH 5,8 (фиг. 31B) или глутаматном буфере pH 4,5 (фиг. 31C) в момент времени 0 и после хранения при 40°C в течение 2 или 4 недель. Количественно определяли процентное содержание низкомолекулярных соединений (LMMS) (фиг. 31D) и высокомолекулярных соединений (HMMS) (фиг. 31A-31C).

Фиг. 32A-32D - типичный анализ методом эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC) LFA3-Fc M1d1 и LFA3-Fc WT, приготовленных в трис-буфере с pH 7,5 (фиг. 32A), гистидиновом буфере с pH 5,8 (фиг. 32B) или глутаматном буфере pH 4,5 (фиг. 32C) в момент времени 0 и после хранения при 25°C в течение 2, 4 или 6 недель. Количественно определяли процентное содержание низкомолекулярных соединений (LMMS) (фиг. 32D) и высокомолекулярных соединений (HMMS) (фиг. 32A-32C).

Фиг. 33A-33D - типичный анализ методом эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC) LFA3-Fc M1d1 и LFA3-Fc WT, приготовленных в трис/сахарозном буфере, pH 7,5 (фиг. 33A), гистидин/сахарозном буфере, pH 5,8 (фиг. 33B) или глутаматном/трегалозном буфере pH 4,5 (фиг. 33C) в момент времени 0 и после хранения при 5°C в течение 2, 4 или 6 недель. Определяли процентное содержание низкомолекулярных соединений (LMMS) (фиг. 33D) и высокомолекулярных соединений (HMMS) (фиг. 33A-33C).

Фиг. 34A, 34B - LFA3-Fc M1d1 снижал CD4+ TEM и увеличивал соотношение Treg/CD4+ TEM после повторного введения. Типичные данные представлены как кратное изменение по сравнению с подсчетом клеток до введения дозы. Показано среднее значение +/- SEM для 4 животных.

Фиг. 35A, 35B - LFA3-Fc WT снижал CD4+ TEM и увеличивал соотношение Treg/CD4+ TEM после повторного введения. Типичные данные представлены как кратное изменение по сравнению с подсчетом клеток до введения дозы. Показано среднее значение +/- SEM для 4 животных.

Подробное описание

В настоящем документе раскрыты молекулы полипептида LFA3, например, молекулы вариантного полипептида LFA3, например, молекулы вариантного гибридного полипептида LFA3, например, молекулы вариантного гибридного полипептида LFA3-Fc, которые связываются с CD2, ингибируют активность CD2 и/или истощают CD2-экспрессирующие клетки. Предлагаются способы получения молекул полипептида LFA3, композиции, содержащие эти молекулы полипептида LFA3, и способы применения этих молекул полипептида LFA3.

В некоторых воплощениях молекулы полипептида LFA3 по изобретению обладают повышенной стабильностью и технологичностью по сравнению с молекулами полипептида LFA3 дикого типа. В некоторых воплощениях молекулы полипептида LFA3 (например, вариантные гибридные белки LFA3-Fc) по изобретению обладают повышенной аффинностью связывания с CD2 по сравнению с молекулами полипептида LFA3 дикого типа (например, гибридными белками LFA3 дикого типа-Fc). В некоторых воплощениях молекулы полипептида LFA3 (например, вариантные гибридные белки LFA3-Fc) по настоящему изобретению проявляют повышенную цитотоксичность в отношении CD2-экспрессирующих клеток, по сравнению с молекулами полипептида LFA3 дикого типа (например, гибридными белками LFA3 дикого типа-Fc). В некоторых воплощениях молекулы полипептида LFA3 (например, вариантные гибридные белки LFA3-Fc) по изобретению проявляют усиленное ингибирование аллогенного Т-клеточного ответа по сравнению с молекулами полипептида LFA3 дикого типа (например, гибридными белками LFA3 дикого типа-Fc). В некоторых воплощениях молекулы полипептида LFA3 (например, вариантные гибридные белки LFA3-Fc) по настоящему изобретению демонстрируют более медленный

клиренс *in vivo* по сравнению с молекулами полипептида LFA3 дикого типа (например, гибридные белки LFA3 дикого типа-Fc).

Предлагаются полинуклеотиды, кодирующие молекулы полипептида LFA3. Предлагаются клетки-хозяева, которые экспрессируют молекулы полипептида LFA3. Предложены способы лечения с использованием молекул полипептида LFA3. В одном воплощении такие способы включают способы лечения воспалительного заболевания, расстройства или состояния. В одном воплощении такие способы включают способы лечения заболеваний, требующих подавления иммунитета, включая, без ограничения указанным, аутоиммунные заболевания. В одном воплощении такие способы включают способы лечения воспалительного неиммунного заболевания, такого как болезнь сердца или болезнь мозга.

Используемые в данном документе заголовки разделов предназначены только для организационных целей и не должны истолковываться как ограничивающие описанный объект изобретения.

Все источники, процитированные в данном документе, включая заявки на патенты, патентные публикации и учетные номера Genbank, включены в настоящее описание путем отсылки, как если бы каждая отдельная ссылка была специально и индивидуально указана для включения путем отсылки полностью.

Методы и процедуры, описанные или упомянутые в данном документе, обычно хорошо понятны и обычно используются специалистами в данной области с использованием традиционной методологии, такой как, например, широко используемые методологии, описанные в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY* (F.M. Ausubel, et al. eds., (2003)); the series *METHODS IN ENZYMOLOGY* (Academic Press, Inc.): *PCR 2: A PRACTICAL APPROACH* (M. J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)), Harlow and Lane, eds. (1988) *ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL*, and *ANIMAL CELL CULTURE* (R.I. Freshney, ed. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney), ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)); *The Antibodies* (M. Zanetti and J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); и *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993); и их обновленные версии.

Молекулы полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) можно использовать для профилактики, лечения и/или облегчения заболеваний, расстройств или состояний, включая, помимо прочего, диабет 1 типа, псориаз, пятнистый псориаз, пальмоплантарный пустулез, пустулезный псориаз ладоней и ступней, ладонно-подошвенный пустулез, пустулез ладоней и ступней, атопический дерматит, красный плоский лишай, болезнь трансплантат против хозяина (GVHD), витилиго, красный волосистый питириаз, трансплантация (например, трансплантация органов, например, трансплантация почки), псориатический артрит, заболевание, расстройство или состояние, требующее аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, талассемию, серповидноклеточную анемию, тромбастению Гланцмана, синдром Вискотта-Олдрича, хроническую гранулематозную болезнь, тяжелую врожденную нейтропению, недостаточность адгезии лейкоцитов, синдром Швахмана-Даймонда, анемию Даймонда-Блэкфана, анемию Фанкони, врожденный дискератоз, синдром Чедиака-Хигаши, апластическую анемию, очаговую алопецию и Т-клеточную лимфому (например, кожную Т-клеточную лимфому или периферическую Т-клеточную неходжкинскую лимфому). Дополнительными примерами заболеваний, нарушений или состояний являются: сахарный диабет (например, сахарный диабет I типа или инсулинозависимый сахарный диабет); ювенильный диабет; воспалительные реакции, такие как воспалительные кожные заболевания, включая псориаз и дерматит (например, атопический дерматит); дерматомиозит; системная склеродермия и склероз; реакции, связанные с воспалительным заболеванием кишечника (такими как болезнь Крона и язвенный колит); респираторный дистресс-синдром (включая респираторный дистресс-синдром взрослых; ARDS); дерматит; менингит; энцефалит; увеит; колит; гастрит; гломерулонефрит; аллергические состояния, такие как экзема и астма, и другие состояния, включающие инфильтрацию Т-клеток и хронические воспалительные реакции; атеросклероз; недостаточность адгезии лейкоцитов; ревматоидный артрит; системная красная волчанка (SLE); рассеянный склероз; Синдром Рейно; аутоиммунный тиреоидит; аллергический энцефаломиелит; Синдром Шегрена; и иммунные ответы, связанные с острой и замедленной гиперчувствительностью, опосредованной цитокинами и Т-лимфоцитами, обычно обнаруживаемыми при туберкулезе, саркоидозе, полимиозите, гранулематозе и васкулите; Болезнь Вегенера; злокачественную анемию (болезнь Аддисона); заболевания, сопровождающиеся диapedезом лейкоцитов; воспалительное заболевание центральной нервной сис-

темы (ЦНС); синдром полиорганной травмы; гемолитическую анемию (включая, помимо прочего, криоглобинемию или анемию Кумбса); миастению; заболевания, опосредованные комплексом антиген-антитело; легочный гемосидероз с гломерулонефритом; антифосфолипидный синдром; аллергический неврит; Болезнь Грейвса; миастенический синдром Ламберта-Итона; пемфигоид буллезный; пузырчатку; аутоиммунные полиэндокринопатии; витилиго; Болезнь Рейтера; синдром скованного человека; Болезнь Беше; гигантоклеточный артериит; иммунокомплексный нефрит; нефропатию IgA; полинейропатии IgM; иммунную тромбоцитопеническую пурпуру (ИТП) или аутоиммунную тромбоцитопению и аутоиммунные гемолитические заболевания; тиреоидит Хашимото; аутоиммунный гепатит; аутоиммунную гемофилию; аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (ALPS); аутоиммунный увеоретинит; синдром Гийена-Барре; синдром Гудпасчера; смешанное заболевание соединительной ткани; бесплодие, связанное с аутоиммунным заболеванием; узелковый полиартериит; очаговую алопецию; идиопатическую микседему; болезнь трансплантат против хозяина; мышечную дистрофию (Дюшенна, Беккера, миотоническая, конечностно-поясная, лицево-плечевая, врожденная, окулофарингеальная, дистальная, Эмери-Дрейфуса); и воспалительное неиммунное заболевание, такое как болезнь сердца или болезнь мозга.

I. Определения.

Настоящее изобретение можно лучше понять, обратившись к нижеследующему подробному описанию примерных воплощений изобретения и включенных в него примеров.

Если не определено иначе, то все технические и научные термины, использованные в данном документе, имеют тот же смысл, который вкладывается в них обычным специалистом области, к которой принадлежит настоящее изобретение. В случае противоречий, настоящее описание, включая определения, будет приоритетным.

Кроме того, если иное не требуется контекстом или явно не указано, термины в единственном числе должны включать множественное число, а термины во множественном числе должны включать единственное число.

Понятно, что аспект и воплощения изобретения, описанные в данном документе, включают аспекты и воплощения, "состоящие" и/или "состоящие по существу из". В контексте настоящего описания формы единственного числа включают формы множественного числа, если не указано иное.

В этой заявке использование "или" означает "и/или", если явно не указано или не понятно специалисту в данной области. В контексте множественного зависимого пункта формулы использование "или" относится к более чем одному предшествующему независимому или зависимому пункту формулы.

"Около" или "приблизительно", при использовании в связи с измеримой числовой переменной, относится к указанному значению переменной и ко всем значениям переменной, которые находятся в пределах экспериментальной ошибки указанного значения (например, в пределах 95% достоверности интервал для среднего) или в пределах 10 процентов от указанного значения, в зависимости от того, что больше. Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон.

Несмотря на то, что числовые диапазоны и параметры, определяющие широкий объем изобретения, являются приблизительными, числовые значения, изложенные в конкретных примерах, указаны с максимальной возможной точностью. Однако любое числовое значение по своей природе содержит определенные ошибки, неизбежно получаемые в результате стандартного отклонения, обнаруженного в соответствующих испытательных измерениях. Более того, следует понимать, что все диапазоны, раскрытые в данном документе, охватывают любые и все входящие в них поддиапазоны. Например, заявленный диапазон "от 1 до 10" следует рассматривать как включающий все и все поддиапазоны между (и включительно) минимальным значением 1 и максимальным значением 10; то есть все поддиапазоны, начинающиеся с минимального значения 1 или более, например, от 1 до 6,1 и заканчивается максимальным значением 10 или меньше, например, от 5,5 до 10.

В данном описании и формуле изобретения слово "включать" или варианты, такие как "включает" или "включающий", будут пониматься как подразумевающие включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключение любого другого целого числа или группы целых чисел. Если иное не требуется по контексту, термины в единственном числе должны включать множественное число, а термины во множественном числе должны включать единственное число. Любые примеры, следующие за термином "например" не являются исчерпывающими или ограничивающими.

Понятно, что везде, где воплощения описаны в данном документе формулировкой "включающий", также предоставляются аналогичные воплощения, описанные в терминах "состоящий из" и/или "состоящий по существу из".

Если аспекты или воплощения изобретения описаны в терминах группы Маркуша или другого группирования альтернатив, настоящее изобретение охватывает не только всю группу, перечисленную в целом, но и каждого члена группы в отдельности и все возможные подгруппы основной группы, но также в основной группе отсутствует один или несколько членов группы. Настоящее изобретение также предусматривает явное исключение одного или нескольких членов группы в заявленном изобретении.

Следует понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена только для описания конкретных воплощений и не предназначена для ограничения. В этом описании и в следующей формуле изобретения будут сделаны ссылки на ряд терминов, которые должны иметь следующие значе-

ния.

Термин "выделенная молекула" (где молекула представляет собой, например, полипептид или полинуклеотид) представляет собой молекулу, которая в силу своего происхождения или источника образования: (1) не ассоциирована с естественно ассоциируемыми компонентами, которые сопровождают ее в ее естественном состоянии, (2) практически не содержит других молекул из того же вида (3) экспрессируется клеткой другого вида, или (4) не встречается в природе. Таким образом, молекула, которая синтезируется химическим путем или экспрессируется в клеточной системе, отличной от клетки, из которой она происходит в естественных условиях, будет "выделена" из ее естественно ассоциированных компонентов. Молекула также может быть сделана практически свободной от естественно ассоциированных компонентов путем выделения с использованием методов очистки, хорошо известных в данной области. Чистота или гомогенность молекул может быть определена рядом способов, хорошо известных в данной области. Например, чистота образца полипептида может быть проанализирована с использованием электрофореза в полиакриламидном геле и окрашивания геля для визуализации полипептида с использованием методов, хорошо известных в данной области. Для определенных целей более высокое разрешение может быть обеспечено с помощью ВЭЖХ или других средств очистки, хорошо известных в данной области техники.

Используемый в данном документе термин "по существу чистый" означает, что вид объекта является преобладающим присутствующим видом (т.е. на молярной основе он более распространен, чем любой другой отдельный вид в композиции), и предпочтительно существенно очищенная фракция представляет собой композицию, в которой объект разновидности (например, гликопротеин) составляют по меньшей мере около 50 процентов (на молярной основе) всех присутствующих макромолекулярных видов. Как правило, по существу чистая композиция будет содержать более чем около 80% всех макромолекулярных компонентов, присутствующих в композиции, более предпочтительно, более чем около 85%, 90%, 95% и 99%. Наиболее предпочтительно, целевой компонент очищен до существенной гомогенности (загрязняющий компонент не может быть детектирован в композиции с помощью стандартных способов детекции), где композиция состоит по существу из единственного макромолекулярного компонента. В некоторых воплощениях по существу чистый материал имеет чистоту не менее 50% (т.е. не содержит примесей), более предпочтительно, чистоту не менее 90%, более предпочтительно, чистоту не менее 95%, еще более предпочтительно, чистоту не менее 98%, и наиболее предпочтительно чистота не менее 99%.

Термин "идентичность", известный в данной области, относится к взаимосвязи между последовательностями двух или более полипептидных молекул или двух или более молекул нуклеиновых кислот, определяемых сравнением последовательностей. В данной области "идентичность" также означает степень родства последовательностей между последовательностями полипептидов или молекул нуклеиновых кислот, в зависимости от обстоятельств, что определяется соответствием между цепочками нуклеотидных или аминокислотных последовательностей. "Идентичность" измеряет процент идентичных совпадений между двумя или более последовательностями с выравниванием разрывов, учитываемых конкретной математической моделью компьютерных программ (т.е. е. "алгоритмами").

Термин "сходство" является родственным понятием, но в отличие от "идентичности" относится к мере сходства, которая включает как идентичные совпадения, так и совпадения с консервативной заменой. Поскольку консервативные замены применяются к полипептидам, а не к молекулам нуклеиновых кислот, сходство касается только сравнения полипептидных последовательностей. Если две полипептидные последовательности имеют, например, 10 из 20 идентичных аминокислот, а все остальные представляют собой неконсервативные замены, то идентичность и сходство в процентах будут равны 50%. Если в том же примере есть еще 5 положений, в которых есть консервативные замены, то процент идентичности останется 50%, но процентное сходство будет составлять 75% (15 из 20). Следовательно, в случаях, когда есть консервативные замены, степень сходства между двумя полипептидными последовательностями будет выше, чем процент идентичности между этими двумя последовательностями.

Полипептидные "фрагменты" или "части" согласно изобретению могут быть получены путем укорочения, например, удалением одной или нескольких аминокислот с N- и/или C-конца полипептида. Таким способом можно удалить до 10, до 20, до 30, до 40 или более аминокислот с N- и/или C-конца. Фрагменты также могут быть созданы путем одного или нескольких внутренних удалений.

Вариантная молекула может содержать 1, 2, 3, 4, 5, до 10, до 20, до 30 или более аминокислотных замен и/или делеций и/или вставок из конкретных последовательностей и фрагментов, обсуждаемых выше. "Делеционные" варианты могут включать делецию отдельных аминокислот, делецию небольших групп аминокислот, например, 2, 3, 4 или 5 аминокислот, или делецию более крупных аминокислотных областей, например, делецию определенных аминокислотных доменов или других элементов. Варианты со "вставками" могут включать вставку отдельных аминокислот, вставку небольших групп аминокислот, например, 2, 3, 4 или 5 аминокислот, или вставку более крупных аминокислотных областей, например, вставку определенных аминокислотных доменов или других элементов. Варианты с "заменой" предпочтительно включают замену одной или нескольких аминокислот на то же количество аминокислот и выполнение консервативных аминокислотных замен. Например, аминокислота может быть заменена аль-

тернативной аминокислотой, имеющей аналогичные свойства, например, другой основной аминокислотой, другой кислотной аминокислотой, другой нейтральной аминокислотой, другой заряженной аминокислотой, другой гидрофильной аминокислотой, другой гидрофобной аминокислотой, другой полярной аминокислотой, другой ароматической аминокислотой или другой алифатической аминокислотой.

Некоторые свойства 20 основных аминокислот, которые можно использовать для выбора подходящих заместителей, представлены ниже.

Варианты с заменой имеют, по меньшей мере, один удаленный аминокислотный остаток в молекуле и вставленный на его место другой остаток. Типичные консервативные замены показаны в табл. 1 под заголовком "консервативные замены". Могут быть введены дополнительные замены, обозначенные ниже как "примерные замены", или дополнительно описанные ниже со путем отсылки на классы аминокислот, а продукты могут быть подвергнуты скринингу.

Таблица 1

Аминокислоты и замены		
Исходный остаток	Консервативные замены	Типичные замены
аланин Ala (A)	Val (V)	Val (V); Leu (L); Ile (I)
аргинин Arg (R)	Lys (K)	Lys (K); Gln (Q); Asn (N)
аспарагин Asn (N)	Gln (Q)	Gln (Q); His (H); Asp (D); Lys (K); Arg (R)
аспаргиновая кислота Arg (D)	Glu (E)	Glu (E); Asn (N)
цистеин Cys (C)	Ser (S)	Ser (S); Ala (A)
глутамин Gln (Q)	Asn (N)	Asn (N); Glu (E)
глутаминовая Glu (E)	Asp (D)	Asp (D); Gln (Q)
глицин Gly (G)	Ala (A)	Ala (A)
гистидин His (H)	Arg (R)	Asn (N); Gln (Q); Lys (K); Arg (R)
изолейцин Ile (I)	Leu (L)	Лей (L); Вал (V); Met (M); Ала (A); Phe (F); Норлейцин (Nle)
лейцин Leu (L)	Ile (I)	Норлейцин (Nle); Ile (I); Val (V); Met (M); Ala (A); Phe (F)
лизин Lys (K)	Arg (R)	Arg (R); Gln (Q); Asn (N)
метионин Met (M)	Leu (L)	Leu (L); Phe (F); Ile (I)
фенилаланин Phe (F)	Tyr (Y)	Leu (L); Val (V); Ile (I); Ala (A); Tyer (Y)
пролин Pro (P)	Ala (A)	Ala (A)
серин Ser (S)	Thr (T)	Thr (T)
треонин Thr (T)	Ser (S)	Ser (S)
триптофан Trp (Вт)	Tyr (Y)	Tyr (Y); Phe (F)
тирозин Tyr (Y)	Phe (F)	Trp (W); Phe (F); Thr (T); Ser (S)
валин Val (V)	Leu (L)	Ile (I); Leu (L); Met (M); Phe (F); Ala (A); Норлейцин (Nle)

Существенные модификации биологических свойств молекулы достигаются путем выбора замен, которые значительно различаются по своему влиянию на поддержание: (а) структуры полипептидного остова в области замены, например, в виде бета-листа или спиральной конформации, (b) заряда или гидрофобности молекулы в сайте-мишени или (с) основной части боковой цепи. Встречающиеся в природе остатки делятся на группы на основании общих свойств боковой цепи:

- i) неполярные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- ii) полярные без заряда: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- iii) кислые (отрицательно заряженные): Asp, Glu;
- iv) основные (положительно заряженные): Lys, Arg;
- v) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro; и
- vi) ароматические: Trp, Tyr, Phe, His.

Неконсервативные замены выполняются путем замены представителя одного из этих классов на другой класс.

Например, один тип замены, который может быть осуществлен, заключается в замене одного или нескольких цистеинов в молекуле, которые могут быть химически реактивными, на другой остаток, такой как, без ограничения указанным, аланин или серин. Например, может быть проведена замена на неканонический цистеин. В некоторых воплощениях цистеин является каноническим. Любой остаток цистеина, не участвующий в поддержании надлежащей конформации молекулы, также может быть заменен, обычно серином, для улучшения окислительной стабильности молекулы и предотвращения аберрантного поперечного сшивания. И наоборот, цистеиновая(ые) связь(и) может быть добавлена к молекуле для улучшения ее стабильности.

"Антитело" представляет собой молекулу иммуноглобулина, способную к специфическому связыванию с мишенью, такой как углевод, полинуклеотид, липид, полипептид и т.д. по меньшей мере через

один сайт узнавания антигена, расположенный в варибельной области молекулы иммуноглобулина. В данном контексте термин охватывает не только интактные поликлональные или моноклональные антитела, но также, если не указано иное, любую их антигенсвязывающую часть, которая конкурирует с интактным антителом за специфическое связывание, гибридные белки, содержащие антигенсвязывающую часть, и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая включает сайт узнавания антигена. Антигенсвязывающие части включают, например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, доменные антитела (dAb, например, антитела акул и верблюдов), фрагменты, включая определяющие комплементарность области (CDR), одноцепочечный варибельный фрагмент антитела (scFv), макситела, минитела, интратела, диатела, триатела, тетратела, v-NAR и бис-scFv, а также полипептиды, которые содержат, по меньшей мере, часть иммуноглобулина, достаточную для связывания специфического антигена с полипептидом. Диатело может включать нековалентный димер одноцепочечного фрагмента Fv (scFv), который состоит из варибельной области тяжелой цепи (VH) и варибельной области легкой цепи (VL), соединенных небольшим пептидным линкером. В другом воплощении диатело является одноцепочечным (Fv)₂, в котором два фрагмента scFv ковалентно связаны друг с другом. Триатело представляет собой, например, одноцепочечный (Fv)₂, в котором три фрагмента scFv ковалентно связаны друг с другом.

Антитело включает антитело любого класса, такого как IgG, IgA или IgM (или их подкласс), и антитело не обязательно должно принадлежать к какому-либо конкретному классу. В зависимости от аминокислотной последовательности константной области его тяжелых цепей антитела иммуноглобулины можно отнести к разным классам. Существует пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные области тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются альфа, дельта, эпсилон, гамма и мю, соответственно. Структуры субъединиц и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

Молекула, которая "предпочтительно связывается" или "специфически связывается" (используется в данном документе взаимозаменяемо) с мишенью, является термином, хорошо понятным в данной области, и способы определения такого специфического или предпочтительного связывания также хорошо известны в данной области. Говорят, что молекула проявляет "специфическое связывание" или "предпочтительное связывание", если она реагирует или связывается более часто, быстрее, с большей продолжительностью и/или с большей аффинностью с конкретной клеткой или веществом, чем с альтернативными клетками или веществами. Молекула "специфически связывается" или "предпочтительно связывается" с мишенью, если она связывается с большей аффинностью, авидностью, более легко и/или с большей продолжительностью, чем она связывается с другими веществами. Кроме того, молекула "специфически связывается" или "предпочтительно связывается" с мишенью, если она связывается с большей аффинностью, авидностью, более легко и/или в течение большей продолжительности с этой мишенью в образце, чем она связывается с другими веществами, присутствующими в образце. Например, молекула, которая специфически или предпочтительно связывается с CD2, представляет собой молекулу, которая связывает CD2 с большей аффинностью, авидностью, более легко и/или с большей продолжительностью, чем она связывается с белком, отличным от CD2. Также при чтении этого определения, например, понятно, что молекула, которая специфически или предпочтительно связывается с первой мишенью, может или не может специфически или предпочтительно связываться со второй мишенью. По существу, "специфическое связывание" или "предпочтительное связывание" не обязательно требует (хотя оно может включать) исключительного связывания. Обычно, но не обязательно, ссылка на связывание означает предпочтительное связывание. "Специфическое связывание" или "предпочтительное связывание" включает соединение, например, белок, нуклеиновую кислоту и т.п., которое распознает и связывается с конкретной молекулой, но по существу не распознает или не связывает другие молекулы в образце. Например, молекула, которая распознает родственный лиганд или связывающий партнер (например, молекула полипептида LFA3, которая связывает CD2) и связывается с ним в образце, но по существу не распознает или не связывает другие молекулы в образце, специфически связывается с этим когнатным лигандом или партнером связывания. Таким образом, при определенных условиях анализа указанный связывающий фрагмент предпочтительно связывается с конкретной молекулой-мишенью и не связывается в значительном количестве с другими компонентами, присутствующими в тестируемом образце.

Для выбора молекулы, которая специфически связывает интересующую мишень, можно использовать различные форматы анализа. Например, твердофазный иммуноферментный анализ ELISA, иммунопреципитация, Biacore™ (GE Healthcare, Пискатауэй, штат Нью-Джерси), KinExA, сортировка клеток с активацией флуоресценции (FACS), Octet™ (FortéBio, Inc., Менло-Парк, Калифорния) и Вестерн-блот-анализ являются одними из многих анализов, которые можно использовать для идентификации молекулы, которая специфически взаимодействует с антигеном или рецептором, или их лиганд-связывающей частью, которая специфически связывается с когнатным лигандом или партнером по связыванию. Как правило, конкретная или избирательная реакция будет по меньшей мере вдвое больше фонового сигнала

или шума, например, более чем в 10 раз больше фона, например, более чем в 50 раз больше фона, например, более чем в 100 раз больше фона, например, более чем в 500 раз больше фона, например, более чем в 1000 раз больше фона, например, более чем в 10000 раз больше фона.

Термин "аффинность связывания" используется в данном документе как мера силы нековалентного взаимодействия между двумя молекулами, например, молекулой полипептида, и ее мишенью. Термин "аффинность связывания" используется для описания одновалентных взаимодействий (внутренней активности).

Кроме того, для определения аффинности связывания молекул полипептида LFA3 с CD2-экспрессирующими клетками, можно проводить эксперименты по связыванию клеток для определения кажущейся аффинности. Кажущаяся аффинность связывания полипептидной молекулы с клетками, экспрессирующими мишень, можно рассчитать как EC50 кривых титрования равновесного связывания, в которых средняя геометрическая интенсивность флуоресценции (gMFI) популяции, связывающейся с мишенью, количественно определяется с помощью проточной цитометрии.

Аффинность связывания между двумя молекулами, например, молекула полипептида и ее мишень посредством моновалентного взаимодействия могут быть количественно определены путем определения константы диссоциации (KD). В свою очередь, KD можно определить путем измерения кинетики образования и диссоциации комплексов, используя, например, метод поверхностного плазмонного резонанса (SPR) (Biacore). Константы скорости, соответствующие ассоциации и диссоциации одновалентного комплекса, называются константой скорости ассоциации k_a (или k_{on}) и константой скорости диссоциации k_d (или k_{off}), соответственно. KD связано с k_a и k_d уравнением $KD = k_d/k_a$. Значение константы диссоциации может быть определено непосредственно хорошо известными способами и может быть вычислено даже для сложных смесей такими способами, как, например, изложенные в Sacchi et al. (1984, Byte 9: 340-362). Например, KD можно установить с помощью анализа связывания с нитроцеллюлозным фильтром с двумя фильтрами, таким как способ, описанный Wong & Lohman (1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5428-5432). В данной области известны другие стандартные анализы для оценки связывающей способности лигандов с антигенами-мишенями, включая, например, ELISA, вестерн-блоттинг, RIA и анализ проточной цитометрией, а также другие анализы, примеры которых приведены в другом месте в настоящем документе. Кинетику связывания и аффинность связывания молекулы также можно оценить стандартными анализами, известными в данной области, такими как поверхностный плазменный резонанс (SPR), например, с помощью системы Biacore™ или KinExA.

Может быть проведен анализ конкурентного связывания, в котором связывание молекулы с мишенью сравнивается со связыванием мишени другим лигандом этой мишени, таким как антитело или растворимый рецептор, который в противном случае связывает мишень. Концентрация, при которой происходит 50% ингибирование, известна как K_i . В идеальных условиях K_i эквивалентна KD. Значение K_i никогда не будет меньше KD, поэтому измерение K_i можно удобно заменить, чтобы обеспечить верхний предел для KD.

Следуя приведенному выше определению, аффинности связывания, ассоциированные с различными молекулярными взаимодействиями, например, сравнение аффинности связывания различных молекул для данной мишени, можно сравнивать путем сравнения значений KD для индивидуальных комплексов молекула/мишень. Значения KD для партнеров по связыванию могут быть определены с использованием способов, хорошо известных в данной области. Одним из способов определения KD является применение поверхностного плазмонного резонанса, обычно с использованием биосенсорной системы, такой как система Biacore®.

Точно так же специфичность взаимодействия может быть оценена путем определения и сравнения значения KD для интересующего взаимодействия, например, конкретного взаимодействия между молекулой и мишенью, со значением KD для взаимодействия, не представляющего интереса, например, известно, что контрольная молекула не связывает мишень.

Как указано ранее в другом месте в данном документе, специфическое связывание можно оценивать со путем отсылки на связывание молекулы с контрольной молекулой, которая не является мишенью. Это сравнение может быть выполнено путем сравнения способности молекулы связываться с мишенью и с контрольной молекулой. Это сравнение может быть выполнено, как описано выше, при оценке KD или K_i . Контрольная молекула, используемая в таком сравнении, может быть любой молекулой, не являющейся мишенью. Предпочтительно контрольная молекула не идентична мишени. Предпочтительно контрольная молекула не является фрагментом мишени. Контрольная молекула, используемая для определения специфического связывания, может не иметь отношения к мишени по структуре или функции. Например, контрольная молекула может быть неродственным материалом или сопутствующим материалом в окружающей среде. Контрольная молекула, используемая для определения специфического связывания, может быть молекулой, участвующей в том же пути *in vivo*, что и мишень, то есть CD2. Убедившись, что молекула по изобретению имеет специфичность к CD2 по сравнению с другой такой молекулой, можно избежать нежелательной перекрестной реактивности *in vivo*.

Молекула по изобретению может сохранять способность связываться с некоторыми молекулами,

которые связаны с мишенью.

Альтернативно, молекула изобретения может обладать специфичностью к конкретной молекуле-мишени. Например, он может связываться с одной молекулой-мишенью, как описано в данном документе, но может не связываться или может связываться со значительно сниженной аффинностью с другой молекулой-мишенью, как описано в данном документе. Например, зрелый CD2 человека можно использовать в качестве мишени, но молекула, которая связывается с этой мишенью, может быть неспособна связываться или может связываться с меньшей аффинностью, например, с белками CD2 других видов, например, с CD2 других млекопитающих. В некоторых воплощениях молекула связывается как с CD2 человека, так и с CD2 яванского макака.

"Гибридный" белок или "гибридная" молекула представляет собой белок, в котором первый полипептид функционально связан, например, прямо или косвенно, со вторым полипептидом. В некоторых воплощениях описанная в данном документе молекула полипептида LFA3 представляет собой гибридный белок, включающий домен LFA3, функционально связанный со вторым полипептидом.

Белок "Fc-гибрид" или молекула "Fc-гибрида" представляет собой белок, в котором один или несколько полипептидов функционально связаны, например, прямо или косвенно, с полипептидом Fc. Fc-гибрид включает область Fc иммуноглобулина с партнером слияния. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3, раскрытая в настоящем документе, представляет собой гибридный белок Fc, включающий домен LFA3, функционально связанный с полипептидом Fc.

"Область Fc с нативной последовательностью" включает аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности области Fc, встречающейся в природе. "Вариантная область Fc" включает аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности области Fc с нативной последовательностью по меньшей мере модификацией одной аминокислоты, но сохраняет, по меньшей мере, одну эффекторную функцию области Fc с нативной последовательностью. Предпочтительно вариантная область Fc имеет делецией или вставкой аминокислотную замену по сравнению с областью Fc с нативной последовательностью или с областью Fc исходного полипептида, например, от около одной до около десяти аминокислотных замен и предпочтительно от около одной до около пяти аминокислотных замен в области Fc с нативной последовательностью или в области Fc родительского полипептида. Вариантная область Fc в данном документе предпочтительно будет обладать по меньшей мере около 80% идентичностью последовательности с областью Fc нативной последовательности и/или с областью Fc исходного полипептида и наиболее предпочтительно по меньшей мере около 90% идентичности последовательности, при этом, более предпочтительно по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98%, по меньшей мере около 99% идентичности последовательностей.

Как известно в данной области, "константная область" антитела относится к константной области легкой цепи антитела или константной области тяжелой цепи антитела, отдельно или в комбинации.

Термины "область Fc из IgG", "область Fc", "домен Fc" и "Fc", используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к части молекулы IgG, которая коррелирует с кристаллизующимся фрагментом, полученным гидролизом молекулы IgG папаином. Используемые в данном документе термины относятся к константной области антитела, исключая первый иммуноглобулиновый домен константной области, и, кроме того, относятся к частям этой области. Таким образом, Fc относится к последним двум иммуноглобулиновым доменам константной области IgA, IgD и IgG и последним трем иммуноглобулиновым доменам константной области IgE и IgM и гибкому N-концу шарнирного соединения к этим доменам или их частям. Для IgA и IgM Fc может включать J-цепь. Для IgG Fc включает домены иммуноглобулина C γ 2 и C γ 3 (C гамма 2 и C гамма 3) и шарнир между C γ 1 (C гамма 1) и C γ 2 (C гамма 2). Хотя границы области Fc могут варьировать, область Fc тяжелой цепи человеческого IgG обычно определяется как содержащая остатки C226 или P230 до ее карбоксильного конца, где нумерация соответствует индексу EU Edelman et al., 1969, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63 (1): 78-85, как описано у Kabat et al., 1991. Обычно домен Fc включает около от 236 до 447 аминокислотных остатков константного домена IgG1 человека. примерная аминокислотная последовательность домен Fc_а IgG1 дикого типа человека приведена в SEQ ID NO: 31. Полипептид Fc может относиться к этой области отдельно или к этой области в контексте антитела, или его антигенсвязывающей части, или гибридного белка Fc.

Константный домен тяжелой цепи включает область Fc и дополнительно включает домен CH1 и шарнир, а также домены CH2 и CH3 (и, необязательно, CH4 IgA и IgE) тяжелой цепи IgG.

"Функциональная область Fc" обладает по меньшей мере одной эффекторной функцией области Fc с нативной последовательностью. Примеры "эффекторных функций" включают связывание C1q, комплемент-зависимую цитотоксичность, связывание с рецептором Fc, антителозависимую опосредованную клетками цитотоксичность, фагоцитоз, подавление рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клеток) и т.д. Такие эффекторные функции обычно требуют, чтобы область Fc была объединена со связывающим доменом, и их можно оценить с помощью различных анализов, известных в данной области для оценки таких эффекторных функций.

"Нативная последовательность области Fc" включает аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности области Fc, обнаруженной в естественной среде. Области

Fc человека с нативной последовательностью включают область Fc IgG1 человека с нативной последовательностью (не-A- и A-аллотипы); область Fc человеческого IgG2 с нативной последовательностью, область Fc человеческого IgG3 с нативной последовательностью и область Fc человеческого IgG4 с нативной последовательностью, а также их природные варианты.

"Вариантная область Fc" включает аминокислотную последовательность, которая отличается от последовательности области Fc с нативной последовательностью за счет по меньшей мере одной модификации аминокислоты.

"Рецептор Fc" или "FcR" описывает рецептор, который связывается с областью Fc антитела. В некоторых воплощениях FcγR представляет собой нативный человеческий FcR. В некоторых воплощениях FcR представляет собой тот, который связывает антитело IgG (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, включая аллельные варианты и альтернативно сплайсированные формы этих рецепторов. FcγRII-рецепторы включают FcγRIIA ("активирующий рецептор") и FcγRIIB ("ингибирующий рецептор"), которые имеют похожие аминокислотные последовательности с отличиями, главным образом, в цитоплазматических доменах. Активирующий рецептор FcγRIIA содержит мотив активации на основе тирозина иммунорецептора (IT AM) в своем цитоплазматическом домене. Ингибирующий рецептор FcγRIIB содержит мотив ингибирования на основе тирозина иммунорецептора (ITIM) в своем цитоплазматическом домене (см., например, Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997)). Обзор FcR представлен, например, в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); и de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Другие FcR, включая те, которые будут определены в будущем, в данном документе охватываются термином "FcR".

Термин "рецептор Fc" или "FcR" также включает неонатальный рецептор FcRn, который отвечает за передачу материнских IgG плоду (Guyer et al., *J. Immunol.* 117: 587 (1976) и Kim et al., *J. Immunol.* 24: 249 (1994)) и регуляцию гомеостаза иммуноглобулинов. Способы измерения связывания с FcRn известны (см., например, Ghetie and Ward., *Immunol. Today* 18(12):592-598 (1997); Ghetie et al., *Nature Biotechnology*, 15(7):637- 640 (1997); Hinton et al., *J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6216 (2004); WO 2004/92219 (Hinton et al)).

"Эффекторные функции" относятся к биологической активности, присущей области Fc антитела, которая варьирует в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность (CDC), связывание с рецептором Fc, антителозависимую опосредованную клетками цитотоксичность (ADCC), фагоцитоз, подавление рецепторов клеточной поверхности (например, рецептора В-клеток) и активацию В-клеток.

"Эффекторные клетки человека" представляют собой лейкоциты, которые экспрессируют один или несколько FcR и выполняют эффекторные функции. В некоторых воплощениях клетки экспрессируют, по меньшей мере, FcγRIII и выполняют эффекторную(ые) функцию(ии) ADCC. Примеры лейкоцитов человека, которые опосредуют ADCC, включают мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC), естественные киллеры (NK), моноциты, макрофаги, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы. Эффекторные клетки могут быть выделены из природного источника, например, из крови.

"Антителозависимая опосредованная клетками цитотоксичность" или "ADCC" относится к форме цитотоксичности, при которой секретируемый Ig связывается с рецепторами Fc (FcR), присутствующими на определенных цитотоксических клетках (например, NK-клетках, нейтрофилах и макрофагах), позволяя этим цитотоксическим эффекторным клеткам специфически связываться с антиген-несущей клеткой-мишенью и впоследствии убивать клетку-мишень цитотоксинами. Первичные клетки, опосредующие ADCC, NK-клетки экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гематопозитических клетках приведена в табл. 3 на стр. 464 Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Для оценки активности ADCC представляющей интерес молекулы, анализ ADCC *in vitro*, такой как описанный в патентах США No. № 5500362 или 5821337 или пат. США № 6737056 (Presta), может быть осуществлен. Подходящие эффекторные клетки для таких анализов включают PBMC и NK-клетки. В ином случае или дополнительно активность ADCC представляющей интерес молекулы может быть оценена *in vivo*, например, в модели на животных, такой как описанная в Clynes et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. (США)* 95: 652-656 (1998). Дополнительные антитела с измененными аминокислотными последовательностями области Fc и повышенной или пониженной активностью ADCC описаны, например, в пат. США № 7923538 и пат. США № 7994290.

Молекула (например, гибрид Fc), имеющая "повышенную активность ADCC", относится к молекуле, которая является более эффективной в опосредовании ADCC *in vitro* или *in vivo* по сравнению с референсной молекулой, где молекула и референсная молекула отличаются по меньшей мере одним структурным аспектом, и когда количества такой молекулы и референсной молекулы, используемых в анализе, по существу одинаковы. В некоторых воплощениях активность ADCC будет определяться с использованием анализа ADCC *in vitro*, как описано в настоящем документе, но другие анализы или способы для определения активности ADCC, например, в модели на животных и т.п. В некоторых воплощениях молекула с повышенной активностью ADCC имеет повышенную аффинность к Fc гамма RIIIА. В некоторых воплощениях молекула с повышенной активностью ADCC имеет повышенную аффинность к Fc

гамма R11A (V158). В некоторых воплощениях молекула с повышенной активностью ADCC имеет повышенную аффинность к Fc гамма R11A (F158).

Молекула (например, гибрид Fc) с "измененной" аффинностью связывания FcR или активностью ADCC представляет собой молекулу, которая имеет либо повышенную, либо пониженную активность связывания с FcR и/или активность ADCC по сравнению с референсной молекулой, где молекула и референсная молекула отличаются по меньшей мере по одному структурному аспекту. Молекула, которая "демонстрирует повышенное связывание" с FcR, связывает по меньшей мере один FcR с лучшей аффинностью, чем референсная молекула. Молекула, которая "демонстрирует пониженное связывание" с FcR, связывает по меньшей мере один FcR с более низкой аффинностью, чем референсная молекула. Такие молекулы, которые демонстрируют пониженное связывание с FcR, могут обладать незначительным или отсутствовать заметным связыванием с FcR, например, 0-20% связывания с FcR по сравнению с областью Fc IgG с нативной последовательностью.

"Повышенная аффинность к Fc гамма R11A" относится к молекуле (например, гибриду Fc), которая имеет большую аффинность к Fc гамма R11A (также упоминается в некоторых случаях как CD 16a), чем референсная молекула, где молекула и референсная молекула различаются по меньшей мере в одном структурном аспекте. Можно использовать любой подходящий способ определения аффинности к Fc гамма R11A. В некоторых воплощениях аффинность к Fc гамма R11A определяется способом, описанным в данном документе. В некоторых воплощениях молекула с повышенной аффинностью к Fc гамма R11A обладает повышенной активностью ADCC. В некоторых воплощениях молекула с повышенной аффинностью к Fc гамма R11A имеет повышенную аффинность к Fc гамма R11A (V158). В некоторых воплощениях молекула с повышенной аффинностью к Fc гамма R11A имеет повышенную аффинность к Fc гамма R11A (F158).

L-фукоза, также называемая 6-дезоксид-галактозой, представляет собой моносахарид, который является компонентом некоторых N- и O-связанных гликанов и гликолипидов у животных; см. Becker and Lowe, *Glycobiology* 13: 41R-51R (2003). Фукоза обычно добавляется в качестве конечной модификации гликанов, включая гликаны, присоединенные к антигенам группы крови, селектинам и антителам. Фукоза может быть присоединена к гликанам через $\alpha(1,2)$ -, $\alpha(1,3)$ -, $\alpha(1,4)$ - и $\alpha(1,6)$ -связи с помощью специфических фукозилтрансфераз. Связи $\alpha(1,2)$ -фукозы обычно связаны с антигенами H-группы крови. Связи $\alpha(1,3)$ - и $\alpha(1,4)$ -фукозы связаны с модификацией антигенов LewisX. Связи $\alpha(1,6)$ -фукозы связаны с N-связанными молекулами GlcNAc, такими как молекулы антител.

Углеводные фрагменты настоящего изобретения будут описаны со путем отсылки на обычно используемую номенклатуру для описания олигосахаридов. Обзор химии углеводов, в котором используется эта номенклатура, можно найти у Hubbard and Ivatt (1981) *Ann. Rev. Biochem.* 50: 555-583. Эта номенклатура включает, например, Man, который представляет маннозу; GlcNAc, который представляет собой 2-N-ацетилглюкозамин; Gal, который представляет собой галактозу; Fuc для фукозы; и Glc, который представляет собой глюкозу. Сиаловые кислоты описаны сокращенным обозначением NeuNAc для 5-N-ацетилнейраминовой кислоты и NeuNGc для 5-гликолилнейраминовой кислоты (Объединенная комиссия по биохимической номенклатуре IUB-IUPAC, 1982, *J. Biol. Chem.* 257: 3347-3351; (1982) *J. Biol. Chem.* 257: 3352).

Углеводные структуры по настоящему изобретению встречаются в белке, экспрессированном в виде N-связанных олигосахаридов. "N-связанное гликозилирование" относится к присоединению углеводного фрагмента через GlcNAc к остатку аспарагина в полипептидной цепи. Все N-связанные углеводы включают общую структуру ядра Man 1-6(Man1-3)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc β -R. Следовательно, в описанной структуре ядра R представляет собой остаток аспарагина продуцируемого гликопротеина. Последовательность продуцируемого белка будет содержать аспарагин-X-серин, аспарагин-X-треонин и аспарагин-X-цистеин, где X представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина (Asn-Xaa-Ser/Thr). "O-связанные" углеводы, напротив, характеризуются общей структурой ядра, которая представляет собой GalNAc, присоединенный к гидроксильной группе треонина или серина, но консенсусная последовательность не требуется. Из N-связанных углеводов наиболее важными являются "сложные" N-связанные углеводы, такие как описанные в данном документе "двухантенарные" структуры.

Квалифицированный специалист поймет, что гликопротеин иммуноглобулин G (IgG) связан с тремя типами сложных двухантенарных структур, содержащих ноль, один или два остатка галактозы (Wormland et al., 1997, *Biochemistry* 36: 1370-1380), обычно известных как G0, G1 и G2, соответственно. Что касается молекул человеческих антител класса IgG, каждая имеет N-связанный олигосахарид, присоединенный к амидной боковой цепи Asn 297 изгиба β -4 внутренней поверхности домена CH2 области Fc (Beale and Feinstein, 1976, *Q. Rev. Biophys.* 9:253-259; Jefferis et al., 1995, *Immunol. Letts.* 44:111-117). Фрагмент олигосахарида, присоединенный к Asn 297 домена IgG CH2, имеет сложный двухантенарный тип, имеющий идентифицированную структуру ядра гексасахарида и переменные внешние сахарные остатки (см. Jefferis et al., 1997, выше; Wyss and Wagner, 1996, *Current Opinions in Biotech.* 7: 409-416). Структура ядра (GlcNAc2Man3GlcNAc) типична для двухантенарных олигосахаридов и схематически представлена на фиг. 1.

Поскольку каждая структура ядра может иметь разделенный пополам N-ацетилглюкозамин, фукозу ядра и внешние сахара либо галактозы, либо сиаловой кислоты, всего существует 36 структурно уникальных олигосахаридов, которые могут занимать сайт Asn 297 (Jefferis and Lund, см. выше). Также будет понятно, что в конкретном домене CH2 гликозилирование по Asn 297 может быть асимметричным из-за различных олигосахаридных цепей, присоединенных к любому остатку Asn 297 внутри двухцепочечного домена Fc. Например, хотя тяжелая цепь, синтезируемая в одной секретирующей антитела клетке, может быть гомогенной по своей аминокислотной последовательности, она, как правило, дифференцированно гликозилирована, приводя к большому количеству структурно уникальных гликоформ Ig.

Основные типы сложных олигосахаридных структур, также называемые "гликоформами", обнаруженные в домене CH2 IgG, отображены в международной патентной публикации № WO 99/22764 на странице 7.

Согласно настоящему изобретению G0 относится к двухантенарной структуре, в которой отсутствуют концевые сиаловые кислоты (NeuAcs) или Gals, G1 относится к двухантенарной структуре, имеющей один Gal и не содержит NeuAcs, а G2 относится к двухантенарной структуре с двумя концевыми Gal и без NeuAc; см., например, фиг. 2, на которой показаны примерные структуры G0, G1, G-1 и G2.

"Афукозилированная" молекула (например, гибрид Fc) или молекула (например, гибрид Fc), "лишенная фукозы", относится к молекуле изотипа IgG1 или IgG3 (например, гибриду Fc), в которой фукоза отсутствует в ее константной области гликозилирования. Гликозилирование IgG1 человека или IgG3 происходит по Asn297 в виде гликозилирования фукозилированного двухантенарного комплекса олигосахарида ядра, заканчивающегося в пределах 2 остатков Gal. В некоторых воплощениях в афукозилированном антителе отсутствует фукоза по Asn297. Эти структуры обозначаются как гликановые остатки G0, G1 (а 1,6 или 1,3) или G2, в зависимости от количества концевых остатков Gal; см., например, Raju, T.S., *BioProcess Int.* 1: 44-53 (2003). Гликозилирование Fc антитела по типу CHO описано, например, в Routier, F. FL, *Glycoconjugate J.* 14: 201-207 (1997).

В некоторых воплощениях термины "фукозил" или "афукозилированный", используемые в данном документе взаимозаменяемо, молекула (например, гибрид Fc) относится к молекуле (например, гибриду Fc), которая была сконструирована гликозилированной так, чтобы не иметь центральной фукозы. Молекулы (например, гибриды Fc) с пониженным содержанием фукозы в гликановых фрагментах обладают повышенной аффинностью к FcγRIIIa (CD16) и, как результат, обладают повышенной антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC). Афукозилированные молекулы (например, гибриды Fc) могут быть получены с использованием линии клеток Potelligent® CHOK1SV (Lonza Biologies), в которой отсутствуют оба аллеля гена, ответственного за добавление фукозы (α 1,6-фукозилтрансферазы). Афукозилированные молекулы или молекулы с пониженным содержанием фукозы (например, гибриды Fc) также могут быть получены путем модификации активностей биосинтеза олигосахаридов различными способами. Например, сверхэкспрессия N-ацетилглюкозаминтрансферазы III (GnTIII) в аппарате Гольджи линии продуцирующих клеток генерирует разветвленные олигосахаридные структуры, ассоциированные с константной областью Fc молекулы, и супрессирует фукозилирование. В таких системах экспрессии уровень экспрессии GnTIII коррелирует с образованием афукозилированных гликоформ IgG1 и, как следствие, повышенной активностью ADCC. Фукозилирование также можно снизить в культуре клеток с помощью аналогов сахара, таких как, без ограничения указанным, аналоги фукозы, описанные в WO 2012/019165. Таким образом, афукозилированные молекулы или молекулы с пониженным содержанием фукозы (например, гибриды Fc) могут быть получены с использованием широкого круга способов, хорошо известных в данной области.

В некоторых воплощениях афукозилированная молекула (например, гибрид Fc) обладает повышенной аффинностью к Fc гамма RIIIa. В некоторых воплощениях афукозилированная молекула (например, гибрид Fc) обладает повышенной аффинностью к Fc гамма RIIIa (V158). В некоторых воплощениях афукозилированная молекула (например, гибрид Fc) обладает повышенной аффинностью к Fc гамма RIIIa (F158).

"Гликоформа" относится к сложной структуре олигосахарида, включающей связи различных углеводных единиц. Такие структуры описаны, например, в *Essentials of Glycobiology* Varki et al., Eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1999), где также представлен обзор стандартной номенклатуры гликобиологии. Такие гликоформы включают, без ограничения указанным, G2, G1, G0, G-1 и G-2 (см., например, публикацию международного патента No. WO 99/22764).

"Паттерн гликозилирования" определяется как паттерн углеводных единиц, которые ковалентно присоединены к белку (например, гликоформе), а также к сайту(ам), к которому гликоформа(ы) ковалентно присоединены к пептидному каркасу белка, более конкретно, белка иммуноглобулина.

"Комплемент-зависимая цитотоксичность" или "CDC" относится к лизису клетки-мишени в присутствии комплемента. Активация классического пути комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с антителами (соответствующего подкласса), которые связаны с их родственным антигеном. Для оценки активации комплемента анализ CDC, например, описанный в Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Методы* 202: 163 (1996), может быть осуществлен. Антитела с изме-

ненными аминокислотными последовательностями области Fc и повышенной или пониженной способностью связывания с C1q описаны, например, в патенте США № 6194551 В 1, Патенте США № 7923538, Патенте США No. 7994290 и WO 1999/51642; см. также, например, Idusogie et al., J.

В контексте настоящего описания термины "аминокислота дикого типа" и "последовательность дикого типа" относятся к последовательности аминокислот или нуклеиновых кислот, которая встречается в природе в определенной популяции (например, человека, мыши, крысы, клетки и т.д.).

"Антиген 3, ассоциированный с функцией лимфоцитов" или "LFA3", используемые в данном документе взаимозаменяемо, также называемый в данной области как "CD58", является представителем суперсемейства иммуноглобулинов. Термин LFA3 включает гомологи и ортологи LFA3, например, из человека, яванского макака, крысы, кролика и мыши, среди прочих. Используемый в данном документе термин "LFA3" относится к LFA3 млекопитающих, таких как человек, крыса или мышь, а также к LFA3 приматов, не относящихся к человеку, коровы, овцы или свиньи. Неограничивающим примером LFA3 является человеческий LFA3 (см., например, учетный номер UniProtKB P19256, SEQ ID NO: 2). Термин "LFA3" также включает фрагменты, варианты, изоформы и другие гомологи таких молекул LFA3. Вариантные молекулы LFA3 обычно характеризуются тем же типом активности, что и природный LFA3, например, способностью связывать CD2.

"Домен LFA3" относится к фрагменту LFA3 или его варианту. В некоторых воплощениях домен LFA3 составляет не более 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 или 180 аминокислот в длину. В некоторых воплощениях домен LFA3 происходит из первого внеклеточного домена LFA3. В некоторых воплощениях домен LFA3 содержит не более 6, 10, 15, 20 или 30 аминокислотных мутаций (например, замен, вставок или делеций) относительно последовательности LFA3 дикого типа.

"CD2", также называемый в данной области "рецептором эритроцитов", "рецептором LFA-3", "рецептором для розеткообразующих клеток" или "антигеном Т-клеточной поверхности T11/Leu-5" представляет собой молекулу, экспрессируемую на клетках, таких как Т-клетки и НК-клетки. Термин CD2 включает гомологи и ортологи CD2, например, из человека, яванского макака, крысы, кролика и мыши, среди прочих. Используемый в данном документе термин "CD2" относится к CD2 млекопитающего, такого как человек, крыса или мышь, а также CD2 приматов, не относящихся к человеку, коровы, овцы или свиньи. Неограничивающим примером CD2 является CD2 человека (см., например, учетный номер UniProtKB P06729, SEQ ID NO: 121). Термин "CD2" также включает фрагменты, варианты, изоформы и другие гомологи таких молекул CD2. Вариантные молекулы CD2 обычно характеризуются тем же типом активности, что и природный CD2.

```
KEITNALETW GALGQDINLDIPSFQMSDDIDDIKWEKTS DKKKIAQFRKEKETFK
EKDITYKLFKNGTLKIKHLKTDDQDIYKVSIDYTKGKNVLEKIFDLKIQERVSKPKISWTC
INTTLTCEVMNGTDPENLYQDGKHLKLSQRVITHKWTTSLSAKFKCTAGNKVSKESSV
EPVSCPEKGLDIYLIIGICGGGSLLMV FV ALL VFYITKRKKQRSRRNDEELETRAHRVATE
ERGRKPHQIPASTPQN PATSQHP PPPPGHRSQAPSHRPPPGHRVQHQPQRPPAPSGTQ
VHQQKGPPLPRPRVQPKPPHGA AENSLSPSSN (SEQ ID NO: 121).
```

Как указано в другом месте в настоящем документе, некоторые положения молекулы полипептида могут быть изменены. Под "положением" в данном описании подразумевается местоположение в последовательности белка. Позиции могут быть пронумерованы последовательно или в соответствии с установленным форматом, например, индексом EU и индексом Кабата могут быть использованы для нумерации аминокислотных остатков антитела.

Как известно в данной области, "полинуклеотид" или "нуклеиновая кислота", используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к цепочкам нуклеотидов любой длины и включают ДНК и РНК. Нуклеотиды могут быть дезоксирибонуклеотидами, рибонуклеотидами, модифицированными нуклеотидами или основаниями и/или их аналогами, или любым субстратом, который может быть включен в цепь с помощью ДНК или РНК-полимеразы. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. В случае наличия модификация нуклеотидной структуры может быть внесена до или после сборки цепи. Последовательность нуклеотидов может прерываться нуклеотидными компонентами. Полинуклеотид можно дополнительно модифицировать после полимеризации, например, путем конъюгации с метящим компонентом. Другие типы модификаций включают, например, "кэп", замену одного или нескольких встречающихся в природе нуклеотидов аналогом, межнуклеотидными модификациями, такими как, например, с незаряженными связями (например, метилфосфонаты, фосфотриэфиры, фосфоамидаты, карбаматы и т.д.) и с заряженными связями (например, фосфоротиоаты, фосфородитиоаты и т.д.), содержащие боковые части, такие как, например, белки (например, нуклеазы, токсины, антитела, сигнальные пептиды, поли-L-лизин и т.д.), с интеркаляторами (например, акридином, псораленом и т.д.), с хелаторами (например, металлы, радиоактивные металлы, бор, окислительные металлы и т.д.), с алкиляторами, с модифицированными связями (например, альфа-аномерными нуклеиновыми кислотами и т.д.), а также немодифицированными форма-

ми полинуклеотида(ов). Кроме того, любые гидроксильные группы, обычно присутствующие в сахарах, могут быть заменены, например, фосфонатными группами, фосфатными группами, защищены стандартными защитными группами или активированы для получения дополнительных связей с дополнительными нуклеотидами, или могут быть конъюгированы с твердыми носителями. 5'- и 3'-концевые ОН могут быть фосфорилированы или замещены аминами или остатками органической блокирующей группы, содержащей от 1 до 20 атомов углерода. Другие гидроксилы также могут быть преобразованы в стандартные защитные группы. Полинуклеотиды могут также содержать аналогичные формы сахаров рибозы или дезоксирибозы, которые обычно известны в данной области, включая, например, 2'-О-метил-, 2'-О-аллил-, 2'-фтор- или 2'-азидо-рибозу, карбоциклические аналоги сахаров, альфа- или бета-аномерные сахара, эпимерные сахара, такие как арабиноза, ксилозы или ликсозы, пиранозные сахара, фуранозные сахара, седогептулозы, ациклические аналоги и базовые аналоги нуклеозидов, такие как метил рибозид. Одна или несколько фосфодиэфирных связей могут быть заменены альтернативными связывающими группами. Эти альтернативные связывающие группы включают, без ограничения указанным, воплощения, в которых фосфат заменен на P(O)S ("тиоат"), P(S)S ("дитиоат"), (O)NR₂ ("амидат"), P(O)R, P(O)OR', CO или CH₂ ("формацеталь"), в котором каждый R или R' независимо представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил (1-20 C), необязательно содержащий простую эфирную связь (-O-), арил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил или аралдил. Не все связи в полинуклеотиде должны быть идентичными. Предыдущее описание применимо ко всем полинуклеотидам, упомянутым в данном документе, включая РНК и ДНК.

Используемый в данном документе термин "вектор" означает конструкцию, которая способна доставлять и, предпочтительно, экспрессировать один или несколько представляющих интерес генов или последовательностей в клетке-хозяине. Примеры векторов включают, без ограничения указанным, вирусные векторы, экспрессирующие векторы на основе "голой" ДНК или РНК, векторы на основе плазмид, космид или фагов, экспрессирующие векторы на основе ДНК или РНК, связанные с катионными конденсирующими агентами, экспрессирующие векторы на основе ДНК или РНК, инкапсулированные в липосомы, и некоторые эукариотические клетки, такие как клетки-продуценты.

"Клетка-хозяин" включает индивидуальную клетку или клеточную культуру, которая может быть или была реципиентом вектора(ов) для включения полинуклеотидных вставок. Клетки-хозяева включают потомство единственной клетки-хозяина, и потомство необязательно может быть полностью идентичным (по морфологии или комплементарной геномной ДНК) исходной родительской клетке благодаря естественной, случайной или преднамеренной мутации. Клетка-хозяин включает клетки, трансфицированные и/или трансформированные *in vivo* полинуклеотидом по настоящему изобретению.

Клетки-хозяева могут быть прокариотическими клетками или эукариотическими клетками. Примеры эукариотических клеток включают клетки млекопитающих, такие как клетки животных приматов или неprimатов, грибные клетки, такие как дрожжи, клетки растений и клетки насекомых.

Любая клетка-хозяин, чувствительная к культуре клеток и к экспрессии белка или полипептидов, может использоваться в соответствии с настоящим изобретением. В некоторых воплощениях клетка-хозяин является клеткой млекопитающего. Клеточные линии млекопитающих, доступные в качестве хозяев для экспрессии, хорошо известны в данной области и включают множество иммортализованных клеточных линий, доступных из Американской коллекции типовых культур (ATCC). Неограничивающие примеры клеток млекопитающих включают, без ограничения указанным, клетки NS0, HEK 293 и клетки яичников китайского хомяка (CHO) и их производные, такие как клетки 293-6E и CHO DG44, клетки CHO DXB11 и Potelligent® CHOK1SV (BioWa/Lonza, Аллендейл, Нью-Джерси). Клетки-хозяева млекопитающих также включают, без ограничения указанным, клетки карциномы шейки матки человека (HeLa, ATCC CCL 2), клетки почки новорожденного хомяка (BHK, ATCC CCL 10), клетки почки обезьяны (COS) и клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (например, Hep G2). Другие неограничивающие примеры клеток млекопитающих, которые можно использовать в соответствии с настоящим изобретением, включают ретинобласты человека (PER.C6®; CruCell, Лейден, Нидерланды); линию CV1 почки обезьяны, трансформированной SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); линию 293 (HEK 293) или клетки 293 почки эмбриона человека, субклонированные для роста в суспензионной культуре (Graham et al., 1977, J. Gen Virol. 36:59); мышинные клетки Сертоли (TM4, Mather, 1980, Biol. Reprod. 23: 243-251); клетки почки обезьяны (CV1 ATCC CCL 70); клетки почки африканской зеленой мартышки (VERO-76, ATCC CRL-1 587); клетки почек собак (MDCK, ATCC CCL 34); клетки печени буйволловой крысы (BRL 3A, ATCC CRL 1442); клетки легких человека (W138, ATCC CCL 75); клетки печени человека (Hep G2, HB 8065); опухоль молочной железы мыши (MMT 060562, ATCC CCL51); Клетки TR1 (Mather et al., 1982, Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68); клетки MRC 5; клетки FS4; линию гепатомы человека (Hep G2); и многочисленные линии миеломных клеток, включая, без ограничения указанным, линию миеломы мыши BALB/c (NS0/1, ECACC №: 85110503), клетки NS0 и клетки Sp2/0.

Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением можно использовать любое количество коммерчески и некоммерчески доступных клеточных линий, которые экспрессируют полипептиды или белки. Специалист в данной области поймет, что разные клеточные линии могут иметь разные потребно-

сти в питании и/или могут потребовать разных условий культивирования для оптимального роста и экспрессии полипептида или белка, и сможет при необходимости изменить условия.

Изобретение включает любую эукариотическую экспрессионную систему, известную в данной области или описанную в настоящем документе для выработки представляющих интерес белков, таких как экспрессия в системе клеток насекомых, системе экспрессии в дрожжах или системе клеток млекопитающих, такой как, без ограничения указанным, клетки СНО.

Используемый в данном документе термин "последовательность контроля экспрессии" означает последовательность нуклеиновой кислоты, которая управляет транскрипцией нуклеиновой кислоты. Последовательность контроля экспрессии может представлять собой промотор, такой как конститутивный или индуцибельный промотор, или энхансер. Последовательность контроля экспрессии функционально связана с транскрибируемой последовательностью нуклеиновой кислоты.

Под термином "лидерный пептид", "лидерная последовательность" или "лидерная сигнальная последовательность", используемых в данном документе взаимозаменяемо, подразумевается любая последовательность нуклеиновой кислоты или кодируемая им аминокислотная последовательность, которая может присутствовать на 5'-конце нуклеиновой кислоты, молекула кислоты и/или на N-конце полипептида или рядом с ним, которая, когда она присутствует, может опосредовать транспорт полипептида к органелле назначения, включая, помимо прочего, секрецию полипептида из клетки. Такие лидерные последовательности включают, без ограничения указанным, последовательность нуклеиновой кислоты, содержащей, например, ATGGGCTGGTCCTGTATCATCCTCTTTCTGGTGGCCACAGCTACCGGAGTGCATAGC (SEQ ID NO: 42), и ATGGTTGCTGGGAGCGACGCGGGGCGGGCCCTGGGGTTCCTCAGCGTGGTCTGCCT GCTGCACTGCTTTGGTTTCATCAGCTGT (SEQ ID NO: 130), и аминокислотные последовательности, кодируемые ими, например, без ограничения указанным, mgwscilflvatatgvhs (SEQ ID NO: 15) и mvagsdagralgvsvvcllhcfgfisc (SEQ ID NO: 129). Изобретение охватывает эти и любые другие лидерные сигналы (нуклеиновые и аминокислотные последовательности), известные в данной области или подлежащие идентификации, которые могут привести к транспорту полипептида к желаемой органелле, например, эндоплазматическому ретикулуму, и/или секреции из клетки. Обычно сигнальный пептид удаляется из зрелого полипептида.

Используемый в данном документе термин "лечение" представляет собой подход для получения полезных или желаемых клинических результатов. Для целей данного изобретения полезные или желаемые клинические результаты включают, без ограничения указанным, одни или несколько из следующих: улучшенная выживаемость (снижение смертности), уменьшение воспалительной реакции на заболевание, уменьшение степени фиброза тканей, улучшение внешнего вида очагов заболевания, ограничение патологических поражений очаговыми участками, уменьшение степени повреждения от болезни, сокращение продолжительности заболевания и/или уменьшение количества, степени или продолжительности симптомов, связанных с заболеванием. Термин включает введение соединений или агентов по настоящему изобретению для предотвращения или отсрочки появления симптомов, осложнений или биохимических признаков заболевания, облегчения симптомов или остановки или ингибирования дальнейшего развития заболевания, состояния или расстройства. Лечение может быть профилактическим (для предотвращения или отсрочки начала заболевания или для предотвращения проявления его клинических или субклинических симптомов) или терапевтическим подавлением или облегчением симптомов после проявления заболевания.

"Улучшение" означает ослабление или положительную динамику одного или нескольких симптомов по сравнению с отсутствием введения молекулы полипептида LFA3. "Улучшение" также включает сокращение или уменьшение продолжительности симптома.

Используемый в данном документе термин "эффективная доза" или "эффективное количество" лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции представляет собой количество, достаточное для воздействия на один или несколько полезных или желаемых результатов. В более конкретных аспектах эффективное количество предотвращает, смягчает или облегчает симптомы заболевания или инфекции и/или продлевает выживаемость объекта, подвергаемого лечению. Для профилактического применения полезные или желаемые результаты включают устранение или снижение риска, уменьшение тяжести или отсрочку начала заболевания, включая биохимические, гистологические и/или поведенческие симптомы заболевания, его осложнения и промежуточные патологические фенотипы, проявляющиеся во время развития болезни. Для терапевтического применения полезные или желаемые результаты включают клинические результаты, такие как уменьшение одного или нескольких симптомов заболевания, расстройства или состояния, уменьшение дозы других лекарств, необходимых для лечения заболевания, усиление эффекта другого лекарства и/или отсрочка прогрессирования заболевания у пациента. Эффективная дозировка может быть введена за одно или несколько введений. Для целей данного изобретения эффективная дозировка лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции представляет собой количество, достаточное для осуществления профилактического или терапевтического лечения прямо или косвенно. Как понятно в клиническом контексте, эффективная дозировка лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции может быть достигнута или не достигнута в сочетании с другим лекарственным средством, соединением или фармацевтической компо-

зией. Таким образом, "эффективная дозировка" может рассматриваться в контексте введения одного или нескольких терапевтических агентов, и единичный агент может считаться введенным в эффективном количестве, если в сочетании с одним или несколькими другими агентами желаемый результат может быть достигнут или достигается.

"Индивидуум" или "объект" представляет собой млекопитающее, более предпочтительно человек. Млекопитающие также включают, без ограничения указанным, сельскохозяйственных животных (например, коров, свиней, лошадей, кур и т.д.), спортивных животных, домашних животных, приматов, лошадей, собак, кошек, мышей и крыс. В некоторых воплощениях у объекта имеется аутоиммунное заболевание, нарушение или состояние, такое как диабет 1 типа или псориазический артрит. В некоторых воплощениях объект нуждается в иммуносупрессивной терапии.

Используемые в данном документе термины "фармацевтически приемлемый носитель" или "фармацевтически приемлемый эксципиент" включают любой материал, который в сочетании с активным ингредиентом позволяет ингредиенту сохранять биологическую активность и не реагирует с иммунной системой объекта. Примеры включают, без ограничения указанным, любые стандартные фармацевтические носители, такие как фосфатно-солевой буферный раствор, вода, эмульсии, такие как эмульсия масло/вода, и различные типы смачивающих агентов. Предпочтительными разбавителями для аэрозольного или парентерального введения являются фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ) или нормальный (0,9%) физиологический раствор. Композиции, содержащие такие носители, получают с помощью хорошо известных традиционных способов (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; and Remington, The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed. Mack Publishing, 2000).

В данном документе описаны типичные способы и материалы, хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, также могут быть использованы при практическом осуществлении или при тестировании настоящего изобретения. Материалы, способы и примеры являются иллюстративными и не предназначены для ограничения.

11. Варианты LFA3.

Настоящее изобретение относится к вариантам LFA3, например, вариантам LFA3 человека, которые связываются с CD2 человека. В некоторых воплощениях варианты LFA3 содержат одну или несколько мутаций, которые повышают их стабильность и свойства технологичности. В некоторых воплощениях варианты LFA3 содержат одну или несколько мутаций, которые увеличивают их аффинность связывания с CD2. В некоторых воплощениях варианты LFA3 (например, вариант гибридных белков LFA3-Fc) содержат одну или несколько мутаций, которые усиливают цитотоксичность в отношении CD2-экспрессирующих клеток. В некоторых воплощениях варианты LFA3 (например, вариант гибридных белков LFA3-Fc) содержат одну или несколько мутаций, которые усиливают ингибирование аллогенного ответа Т-клеток. В некоторых воплощениях варианты LFA3 содержат одну или несколько мутаций, которые приводят к более медленному клиренсу молекул *in vivo*. Типичные последовательности вариантов LFA3 и LFA3 дикого типа, включая гибридные белки LFA3-Fc, представлены в табл. 2 и 3.

В других воплощениях, когда сконструированный полипептид Fc содержит С-концевой аминокислотный остаток лизина (K) (например, тяжелая цепь IgG1 человека содержит концевой лизин), специалист в данной области поймет, что остаток лизина может быть обрезан, что приведет к гибриднему белку, лишенному С-концевого остатка лизина. Таким образом, в некоторых воплощениях гибридный белок Fc, содержащий сконструированный полипептид Fc, содержит полипептид, в котором отсутствует концевой лизин, который в другом случае присутствует.

SEQ ID NO: 20	M4	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVRVFSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDED EYEFESPNITDTFKFFLYV
SEQ ID NO: 21	M5	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEIRVFSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDED EYEFESPNITDTFKFFLYV
SEQ ID NO: 22	M6	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKVL EFENSELRVFSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDEDE YEFESPNITDTFKFFLYV
SEQ ID NO: 23	M7	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVRAFSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDED EYEMESPNITDTMKFFLYV
SEQ ID NO: 24	d1	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKV AELENSEFRAFSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDED EYEMESPNITDTMKFFLYVL
SEQ ID NO: 25	d3	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKV AELENSEFRAFSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDED EYEMESPNITDTMKFFLYVLESLS
SEQ ID NO: 26	M1d1	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVRAFSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDED EYEMESPNITDTFKFFLYVL
SEQ ID NO: 27	M1d3	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVRAFSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDED EYEMESPNITDTFKFFLYVLESLS
SEQ ID NO: 28	M4d1	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVRVFSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDED EYEFESPNITDTFKFFLYVL
SEQ ID NO: 29	M7d1	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVRAFSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDED EYEMESPNITDTMKFFLYVL
SEQ ID NO: 30	CM1d1	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVRAFSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDED EYEMESRNGGPDFKFFLYVL
SEQ ID NO: 31	CM2d1	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVRAFSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDED EYEMESRNPYRRFKFFLYVL
SEQ ID NO: 32	CM3d1	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVRAFSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDED EYEMESRNPYRDFKFFLYVL
SEQ ID NO: 33	CM4d1	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVRAFSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDED EYEMESWNGGPDFKFFLYVL
SEQ ID NO: 34	CM5d1	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVRAFSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDED EYEMESWNPYRRFKFFLYVL
SEQ ID NO: 35	CM6d1	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVRAFSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDED EYEMESWNPYRDFKFFLYVL
SEQ ID NO: 36	ML1d1	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVRAFSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDED EYEMEGRYPYESFKFFLYVL
SEQ ID NO: 37	ML2d1	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVRVFSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDED EYEFESWEPGREFKFFLYVL
SEQ ID NO: 38	ML3d1	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVRAFSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDED

		EYEMEARYPYRQFKFFLYVL
SEQ ID NO: 39	ML4d1	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVRAFSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDED EYEMEMRNGGPDFKFFLYVL
SEQ ID NO: 40	ML5d1	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVRAFSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDED EYEMEARDGGPDFKFFLYVL
SEQ ID NO: 41	ML6d1	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVRAFSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDED EYEMESWSPYKAFKFFLYVL
SEQ ID NO: 69	Гибридный белок M1d1 LFA3-Fc (также упоминается как "LFA3-Fc M1d1", "M1d1", "M1-d1" или "M1d1-Pfe")	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVRAFSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDED EYEMESPNITDTFKFFLYVLdkthtppcpapellggpsvflfppkpk kdtlmisrtpvctvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynsty rvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepvytlppsr eemtknqvsltlvkgfypsdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskl tvdksrwqqgnvfscsvmhcalhnhytqkslspsg
SEQ ID NO: 70	Консенсус контактной библиотеки #1	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKX ₁ VX ₂ WX ₃ KQX ₄ X ₅ X ₆ VAX ₇ LX ₈ NSX ₉ FX ₁₀ AX ₁₁ X ₁₂ SFKNRVYLDTVSGSLTIY NLTSSDEDEYEMESX ₁₃ NX ₁₄ TX ₁₅ TMKFFLYVX ₁₆ , где: X ₁ представляет собой любую аминокислоту, X ₂ представляет собой любую аминокислоту, X ₃ представляет собой любую аминокислоту, X ₄ представляет собой любую аминокислоту, X ₅ представляет собой любую аминокислоту, X ₆ представляет собой любую аминокислоту, X ₇ представляет собой любую аминокислоту, X ₈ представляет собой любую аминокислоту, X ₉ представляет собой любую аминокислоту, X ₁₀ представляет собой любую аминокислоту, X ₁₁ представляет собой любую аминокислоту, X ₁₂ представляет собой любую аминокислоту, X ₁₃ представляет собой любую аминокислоту, X ₁₄ представляет собой любую аминокислоту, X ₁₅ представляет собой любую аминокислоту, и X ₁₆ отсутствует или представляет собой L, или LESLPS
SEQ ID NO: 71	Консенсус контактной библиотеки #2	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKX ₁ VX ₂ WX ₃ KQX ₄ X ₅ X ₆ VAX ₇ LX ₈ NSX ₉ FX ₁₀ AX ₁₁ X ₁₂ SFKNRVYLDTVSGSLTIY NLTSSDEDEYEMESX ₁₃ NX ₁₄ TX ₁₅ TMKFFLYVX ₁₆ , где: X ₁ представляет собой D, E, N, K, Q или H, X ₂ представляет собой F, I, L, V, Nle, M или A, X ₃ представляет собой K, R, M, T, Q или N, X ₄ представляет собой K, R, M, T, Q или N, X ₅ представляет собой D, E, N, K, Q или H, X ₆ представляет собой K, R, M, T, Q или N, X ₇ представляет собой D, E, N, K, Q или H, X ₈ представляет собой D, E, N, K, Q или H, X ₉ представляет собой D, E, N, K, Q или H, X ₁₀ представляет собой K, R, M, T, Q или N, X ₁₁ представляет собой F, Y, L, H, I, N, V, D, A или Y, X ₁₂ представляет собой S, T, A или G, X ₁₃ представляет собой P, L, H, R или A, X ₁₄ представляет собой F, I, L, V, M, A или Nle, X ₁₅ представляет собой D, E, N, K, Q или H, и

SEQ ID NO: 72	Консенсус контактной библиотеки #3	<p>X₁₆ отсутствует или представляет собой L или LESLPS</p> <p>FSQQIYGVVYGNVTFHVPNSVPLKX₁VX₂WX₃KQX₄X₅X₆VAX₇LX₈NSX₉FX₁₀AX₁₁X₁₂SFKNRVYLDTVSGSLTIY NLTSSDEDEYEMESX₁₃NX₁₄TX₁₅TMKFFLYVX₁₆, где:</p> <p>X₁ представляет собой D, E, N, K, Q или H, X₂ представляет собой F, I, L или V, X₃ представляет собой K, R, M или T, X₄ представляет собой K, R, M или T, X₅ представляет собой D, E, N, K, Q или H, X₆ представляет собой K, R, M или T, X₇ представляет собой D, E, N, K, Q или H, X₈ представляет собой D, E, N, K, Q или H, X₉ представляет собой D, E, N, K, Q или H, X₁₀ представляет собой K, R, M или T, X₁₁ представляет собой F, Y, L, H, I, N, V или D, X₁₂ представляет собой S, T, A или G, X₁₃ представляет собой P, L, H или R, X₁₄ представляет собой F, I, L или V, X₁₅ представляет собой D, E, N, K, Q или H, и X₁₆ отсутствует или представляет собой L или LESLPS</p>
SEQ ID NO: 73	Консенсус ядерной библиотеки #1	<p>FSQQIYGVVYGNVTX₁HX₂PSNVXPX₃KEX₄LX₅KKQKD KX₆X₇EX₈ENSEX₉RX₁₀FSSFKNRVYX₁₁DTV SX₁₂SX₁₃TI YNLTSSDEDEYEX₁₄ESPNITDTX₁₅KX₁₆FLYVX₁₇, где:</p> <p>X₁ представляет собой любую аминокислоту, X₂ представляет собой любую аминокислоту, X₃ представляет собой любую аминокислоту, X₄ представляет собой любую аминокислоту, X₅ представляет собой любую аминокислоту, X₆ представляет собой любую аминокислоту, X₇ представляет собой любую аминокислоту, X₈ представляет собой любую аминокислоту, X₉ представляет собой любую аминокислоту, X₁₀ представляет собой любую аминокислоту, X₁₁ представляет собой любую аминокислоту, X₁₂ представляет собой любую аминокислоту, X₁₃ представляет собой любую аминокислоту, X₁₄ представляет собой любую аминокислоту, X₁₅ представляет собой любую аминокислоту, X₁₆ представляет собой любую аминокислоту, и X₁₇ отсутствует или представляет собой L или LESLPS</p>
SEQ ID NO: 74	Консенсус ядерной библиотеки #2	<p>FSQQIYGVVYGNVTX₁HX₂PSNVXPX₃KEX₄LX₅KKQKD KX₆X₇EX₈ENSEX₉RX₁₀FSSFKNRVYX₁₁DTV SX₁₂SX₁₃TI YNLTSSDEDEYEX₁₄ESPNITDTX₁₅KX₁₆FLYVX₁₇, где:</p> <p>X₁ представляет собой F, I, L, V, A или Y, X₂ представляет собой F, I, L, V, M, A или Nle, X₃ представляет собой F, I, L, V, Nle, M или A, X₄ представляет собой F, I, L, V, M, A или Nle, X₅ представляет собой W, F, L, C или Y, X₆ представляет собой F, I, L, V, M, A или Nle, X₇ представляет собой A, V, S, L или I, X₈ представляет собой F, I, L, V, Nle, M или A, X₉ представляет собой F, I, L, V, A или Y, X₁₀ представляет собой A, V, S, L или I, X₁₁ представляет собой F, I, L, V, Nle, M или A, X₁₂ представляет собой S, T, A или G, X₁₃ представляет собой F, I, L, V, Nle, M или A, X₁₄ представляет собой M, L, I или F,</p>

		X ₁₅ представляет собой M, L, I или F, X ₁₆ представляет собой F, I, L, V, A или Y, и X ₁₇ отсутствует или представляет собой L или LESLPS
SEQ ID NO: 75	Консенсус ядерной библиотеки #3	FSQQIYGVVYGNVTX ₁ HX ₂ PSNVPX ₃ KEX ₄ LX ₅ KKQKD KX ₆ X ₇ EX ₈ ENSEX ₉ RX ₁₀ FSSFKNRVYX ₁₁ DTVX ₁₂ SX ₁₃ TI YNLTSSDEDEYEX ₁₄ ESPNITDTX ₁₅ KX ₁₆ FLYVX ₁₇ , где: X ₁ представляет собой F, I, L или V, X ₂ представляет собой F, I, L или V, X ₃ представляет собой F, I, L или V, X ₄ представляет собой F, I, L или V, X ₅ представляет собой W, F, L или C, X ₆ представляет собой F, I, L или V, X ₇ представляет собой A, V, S или L, X ₈ представляет собой F, I, L или V, X ₉ представляет собой F, I, L или V, X ₁₀ представляет собой A, V, S или L, X ₁₁ представляет собой F, I, L или V, X ₁₂ представляет собой S, T, A или G, X ₁₃ представляет собой F, I, L или V, X ₁₄ представляет собой M, L, I или F, X ₁₅ представляет собой M, L, I или F, X ₁₆ представляет собой F, I, L или V, и X ₁₇ отсутствует или представляет собой L или LESLPS
SEQ ID NO: 76	Консенсус «горячей точки» #1	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKV X ₁ EX ₂ ENSEX ₃ RX ₄ FSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSD EDEYEX ₅ ESPNITDTX ₆ KFFLYVX ₇ , где: X ₁ представляет собой любую аминокислоту, X ₂ представляет собой любую аминокислоту, X ₃ представляет собой любую аминокислоту, X ₄ представляет собой любую аминокислоту, X ₅ представляет собой любую аминокислоту, X ₆ представляет собой любую аминокислоту, и X ₇ отсутствует или представляет собой L или LESLPS
SEQ ID NO: 77	Консенсус «горячей точки» #2	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKV X ₁ EX ₂ ENSEX ₃ RX ₄ FSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSD EDEYEX ₅ ESPNITDTX ₆ KFFLYVX ₇ , где: X ₁ представляет собой A, V, S, L или I, X ₂ представляет собой F, I, L, V, Nle, M или A, X ₃ представляет собой F, I, L, V, A или Y, X ₄ представляет собой A, V, S, L или I, X ₅ представляет собой M, L, I или F, X ₆ представляет собой M, L, I или F, и X ₇ отсутствует или представляет собой L или LESLPS
SEQ ID NO: 78	Консенсус «горячей точки» #3	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKV X ₁ EX ₂ ENSEX ₃ RX ₄ FSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSD EDEYEX ₅ ESPNITDTX ₆ KFFLYVX ₇ , где: X ₁ представляет собой A, V, S или L, X ₂ представляет собой F, I, L или V, X ₃ представляет собой F, I, L или V, X ₄ представляет собой A, V, S или L, X ₅ представляет собой M, L, I или F, X ₆ представляет собой M, L, I или F, и X ₇ отсутствует или представляет собой L или LESLPS
SEQ ID NO: 79	Консенсус «горячей точки» #4	FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKV X ₁ EX ₂ ENSEX ₃ RX ₄ FSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSD EDEYEX ₅ ESPNITDTX ₆ KFFLYVX ₇ , где: X ₁ представляет собой V, L или A,

		X ₂ представляет собой F или L, X ₃ представляет собой V, I, L или F, X ₄ представляет собой A, V или S, X ₅ представляет собой M, F, I или L, X ₆ представляет собой F, M, I или L, и X ₇ отсутствует или представляет собой L или LESLPS
SEQ ID NO: 80	Консенсус «горячей точки» #5	FSQQIYGVVYGNVTFHVP SNVPLKEVLWKKQKDKV X ₁ EFENSEX ₂ RX ₃ FSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSD EDEYEX ₄ ESPNITDTX ₅ KFFLYVX ₆ , где: X ₁ представляет собой V или L, X ₂ представляет собой V, I или L, X ₃ представляет собой A или V, X ₄ представляет собой M или F, X ₅ представляет собой F или M, и X ₆ отсутствует или представляет собой L или LESLPS
SEQ ID NO: 81	Консенсус «горячей точки» #6	FSQQIYGVVYGNVTFHVP SNVPLKEVLWKKQKDKV X ₁ EFENSEX ₂ RX ₃ FSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSD EDEYEX ₄ ESPNITDTFKFFLYVX ₅ , где: X ₁ представляет собой V или L, X ₂ представляет собой V, I или L, X ₃ представляет собой A или V, X ₄ представляет собой M или F, и X ₅ отсутствует или представляет собой L или LESLPS
SEQ ID NO: 82	Консенсус «горячей точки» #7	FSQQIYGVVYGNVTFHVP SNVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEX ₁ RX ₂ FSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDE DEYEX ₃ ESPNITDTFKFFLYVX ₄ , где: X ₁ представляет собой V или I, X ₂ представляет собой A или V, X ₃ представляет собой M или F, и X ₄ отсутствует или представляет собой L или LESLPS
SEQ ID NO: 83	Область петли LFA3 дикого типа	SPNITDT
SEQ ID NO: 84	Консенсус петли #1	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ , где: X ₁ представляет собой S, G, A, M или T, X ₂ представляет собой R, W, P или A, X ₃ представляет собой N, Y, S, E, D, Q, H, K или R X ₄ представляет собой P, G, I, L, V, M, A, F или Nle, X ₅ представляет собой Y, G, T или S, X ₆ представляет собой R, E, K, P, D или N, и X ₇ представляет собой R, D, S, Q, A, E, T или S
SEQ ID NO: 85	Консенсус петли #2	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ , где: X ₁ представляет собой S, G, A или M, X ₂ представляет собой R, W или P, X ₃ представляет собой N, Y, S, E или D, X ₄ представляет собой P, G или I, X ₅ представляет собой Y, G или T, X ₆ представляет собой R, E, K, P или D, и X ₇ представляет собой R, D, S, Q, A, E или T
SEQ ID NO: 86	Консенсус петли #3	X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ , где: X ₁ представляет собой S, G, A или M, X ₂ представляет собой R или W, X ₃ представляет собой N, Y, S, E или D, X ₄ представляет собой P или G, X ₅ представляет собой Y или G, X ₆ представляет собой R, E, K или P, и X ₇ представляет собой R, D, S, Q, A или E

SEQ ID NO: 87	Консенсус петли #4	$SX_1NX_2X_3X_4X_5$, где: X ₁ представляет собой R, W, P или A, X ₂ представляет собой P, G, I, L, V, M, A, F или Nle, X ₃ представляет собой Y, G, T или S, X ₄ представляет собой R, P, D или N, и X ₅ представляет собой R, D, T или S
SEQ ID NO: 88	Консенсус петли #5	$SX_1NX_2X_3X_4X_5$, где: X ₁ представляет собой R, W или P, X ₂ представляет собой P, G или I, X ₃ представляет собой Y, G или T, X ₄ представляет собой R, P или D, и X ₅ представляет собой R, D или T
SEQ ID NO: 89	Консенсус петли #6	$SX_1NX_2X_3X_4X_5$, где: X ₁ представляет собой R или W, X ₂ представляет собой P или G, X ₃ представляет собой Y или G, X ₄ представляет собой R или P, и X ₅ представляет собой R или D
SEQ ID NO: 90	Консенсус петли #7	$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$, где: X ₁ представляет собой S, G, A, M или T, X ₂ представляет собой R, W, P или A, X ₃ представляет собой N, Y, S, E, D, Q, H, K или R, X ₄ представляет собой P, G, I, L, V, M, A, F или Nle, X ₅ представляет собой Y, G, T или S, X ₆ представляет собой R, E, K, P, D или N, и X ₇ представляет собой D, S, Q, A, E, T или S
SEQ ID NO: 91	Консенсус петли #8	$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$, где: X ₁ представляет собой S, G, A или M, X ₂ представляет собой R, W или P, X ₃ представляет собой N, Y, S, E или D, X ₄ представляет собой P, G или I, X ₅ представляет собой Y, G или T, X ₆ представляет собой R, E, K, P или D, и X ₇ представляет собой D, S, Q, A, E или T
SEQ ID NO: 92	Консенсус петли #9	$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7$, где: X ₁ представляет собой S, G, A или M, X ₂ представляет собой R или W, X ₃ представляет собой N, Y, S, E или D, X ₄ представляет собой P или G, X ₅ представляет собой Y или G, X ₆ представляет собой R, E, K или P, и X ₇ представляет собой D, S, Q, A или E
SEQ ID NO: 93	Консенсус петли #10	FSQQIYGVVYGNVTFHVPNSNVLKEVLWKKQKDKV X ₁ EX ₂ ENSEX ₃ RX ₄ FSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSD EDEYEX ₅ EX ₆ X ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ X ₁₃ KFFLYVX ₁₄ , где: X ₁ представляет собой V, L или A, X ₂ представляет собой F или L, X ₃ представляет собой V, I, L или F, X ₄ представляет собой A, V или S, X ₅ представляет собой M, F, I или L, X ₆ представляет собой S, G, A или M, X ₇ представляет собой R или W, X ₈ представляет собой N, Y, S, E или D, X ₉ представляет собой P или G, X ₁₀ представляет собой Y или G, X ₁₁ представляет собой R, E, K или P, X ₁₂ представляет собой R, D, S, Q, A или E,

		X ₁₃ представляет собой F, M, I или L, и X ₁₄ отсутствует или представляет собой L или LESLPS
SEQ ID NO: 94	Консенсус петли #11	FSQQIYGVVYGNVTFHVPNSVPLKEVLWKKQKDKV X ₁ EX ₂ ENSEX ₃ RX ₄ FSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSD EDEYEX ₅ EX ₆ X ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁ X ₁₂ X ₁₃ KFFLYVX ₁₄ , где: X ₁ представляет собой V или A, X ₂ представляет собой F или L, X ₃ представляет собой V, I или F, X ₄ представляет собой A или V, X ₅ представляет собой M или F, X ₆ представляет собой S, G, A или M, X ₇ представляет собой R или W, X ₈ представляет собой N, Y, S, E или D, X ₉ представляет собой P или G, X ₁₀ представляет собой Y или G, X ₁₁ представляет собой R, E, K или P, X ₁₂ представляет собой R, D, S, Q, A или E, X ₁₃ представляет собой F или M, и X ₁₄ отсутствует или представляет собой L или LESLPS
SEQ ID NO: 95	Консенсус петли #12	FSQQIYGVVYGNVTFHVPNSVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVRX ₁ FSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDE DEYEX ₂ EX ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ FKFFLYVX ₁₀ , где: X ₁ представляет собой любую аминокислоту, X ₂ представляет собой любую аминокислоту, X ₃ представляет собой любую аминокислоту, X ₄ представляет собой любую аминокислоту, X ₅ представляет собой любую аминокислоту, X ₆ представляет собой любую аминокислоту, X ₇ представляет собой любую аминокислоту, X ₈ представляет собой любую аминокислоту, X ₉ представляет собой любую аминокислоту, и X ₁₀ отсутствует или представляет собой L или LESLPS
SEQ ID NO: 96	Консенсус петли #13	FSQQIYGVVYGNVTFHVPNSVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVRX ₁ FSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDE DEYEX ₂ EX ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ FKFFLYVX ₁₀ , где: X ₁ представляет собой A, V, L или I, X ₂ представляет собой M, F, L или I, X ₃ представляет собой S, G, A, M или T, X ₄ представляет собой R, W, P или A, X ₅ представляет собой N, Y, S, E, D, Q, H, K или R, X ₆ представляет собой P, G, I, L, V, M, A, F или Nle, X ₇ представляет собой Y, G, T или S, X ₈ представляет собой R, E, K, P, D или N, X ₉ представляет собой R, D, S, Q, A, E, T или S X ₁₀ отсутствует или представляет собой L или LESLPS
SEQ ID NO: 97	Консенсус петли #14	FSQQIYGVVYGNVTFHVPNSVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVRX ₁ FSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDE DEYEX ₂ EX ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ FKFFLYVX ₁₀ , где: X ₁ представляет собой A или V, X ₂ представляет собой M или F, X ₃ представляет собой S, G, A или M, X ₄ представляет собой R, W или P, X ₅ представляет собой N, Y, S, E или D, X ₆ представляет собой P, G или I, X ₇ представляет собой Y, G или T, X ₈ представляет собой R, E, K, P или D, X ₉ представляет собой R, D, S, Q, A, E или T, и

SEQ ID NO: 98	Консенсус петли #15	X ₁₀ отсутствует или представляет собой L или LESLPS FSQQIYGVVYGNVTFHVPNSVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVXR ₁ FSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDE DEYEX ₂ EX ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ FKFFLYVX ₁₀ , где: X ₁ представляет собой A или V, X ₂ представляет собой M или F, X ₃ представляет собой S, G, A или M, X ₄ представляет собой R или W, X ₅ представляет собой N, Y, S, E или D, X ₆ представляет собой P или G, X ₇ представляет собой Y или G, X ₈ представляет собой R, E, K или P, X ₉ представляет собой R, D, S, Q, A или E, и X ₁₀ отсутствует или представляет собой L или LESLPS
SEQ ID NO: 99	Консенсус петли #16	FSQQIYGVVYGNVTFHVPNSVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVRAFSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDED EYEMESX ₁ NX ₂ X ₃ X ₄ X ₅ FKFFLYVX ₆ , где: X ₁ представляет собой любую аминокислоту, X ₂ представляет собой любую аминокислоту, X ₃ представляет собой любую аминокислоту, X ₄ представляет собой любую аминокислоту, X ₅ представляет собой любую аминокислоту, и X ₆ отсутствует или представляет собой L или LESLPS
SEQ ID NO: 100	Консенсус петли #17	FSQQIYGVVYGNVTFHVPNSVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVRAFSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDED EYEMESX ₁ NX ₂ X ₃ X ₄ X ₅ FKFFLYVX ₆ , где: X ₁ представляет собой R, W, P или A, X ₂ представляет собой P, G, I, L, V, M, A, F или Nle, X ₃ представляет собой Y, G, T или S, X ₄ представляет собой R, P, D или N, X ₅ представляет собой R, D, T или S, и X ₆ отсутствует или представляет собой L или LESLPS
SEQ ID NO: 101	Консенсус петли #18	FSQQIYGVVYGNVTFHVPNSVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVRAFSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDED EYEMESX ₁ NX ₂ X ₃ X ₄ X ₅ FKFFLYVX ₆ , где: X ₁ представляет собой R, W или P, X ₂ представляет собой P, G или I, X ₃ представляет собой Y, G или T, X ₄ представляет собой R, P или D, X ₅ представляет собой R, D или T, и X ₆ отсутствует или представляет собой L или LESLPS
SEQ ID NO: 102	Консенсус петли #19	FSQQIYGVVYGNVTFHVPNSVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVRAFSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDED EYEMESX ₁ NX ₂ X ₃ X ₄ X ₅ FKFFLYVX ₆ , где: X ₁ представляет собой R или W, X ₂ представляет собой P или G, X ₃ представляет собой Y или G, X ₄ представляет собой R или P, X ₅ представляет собой R или D, и X ₆ отсутствует или представляет собой L или LESLPS
SEQ ID NO: 103	Консенсус петли #20	FSQQIYGVVYGNVTFHVPNSVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVXR ₁ FSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDE DEYEX ₂ EX ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ FKFFLYVX ₁₀ , где: X ₁ представляет собой A, V, L или I, X ₂ представляет собой M, F, L или I, X ₃ представляет собой S, G, A, M или T, X ₄ представляет собой R, W, P или A,

		X ₅ представляет собой N, Y, S, E, D, Q, H, K или R, X ₆ представляет собой P, G, I, L, V, M, A, F или Nle, X ₇ представляет собой Y, G, T или S, X ₈ представляет собой R, E, K, P, D или N, X ₉ представляет собой D, S, Q, A, E, T или S, и X ₁₀ отсутствует или представляет собой L или LESLPS
SEQ ID NO: 104	Консенсус петли #21	FSQQIYGVVYGNVTFHVPNSVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVRX ₁ FSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDE DEYEX ₂ EX ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ FKFFLYVX ₁₀ , где: X ₁ представляет собой A или V, X ₂ представляет собой M или F, X ₃ представляет собой S, G, A или M, X ₄ представляет собой R, W или P, X ₅ представляет собой N, Y, S, E или D, X ₆ представляет собой P, G или I, X ₇ представляет собой Y, G или T, X ₈ представляет собой R, E, K, P или D, X ₉ представляет собой D, S, Q, A, E или T, и X ₁₀ отсутствует или представляет собой L или LESLPS
SEQ ID NO: 105	Консенсус петли #22	FSQQIYGVVYGNVTFHVPNSVPLKEVLWKKQKDKV VEFENSEVRX ₁ FSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDE DEYEX ₂ EX ₃ X ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈ X ₉ FKFFLYVX ₁₀ , где: X ₁ представляет собой A или V, X ₂ представляет собой M или F, X ₃ представляет собой S, G, A или M, X ₄ представляет собой R или W, X ₅ представляет собой N, Y, S, E или D, X ₆ представляет собой P или G, X ₇ представляет собой Y или G, X ₈ представляет собой R, E, K или P, X ₉ представляет собой D, S, Q, A или E, и X ₁₀ отсутствует или представляет собой L или LESLPS
SEQ ID NO: 106	CM1d1	SRNGGPD
SEQ ID NO: 107	Петля CM2d1	SRNPYRR
SEQ ID NO: 108	Петля CM3d1	SRNPYRD
SEQ ID NO: 109	Петля CM4d1	SWNGGPD
SEQ ID NO: 110	Петля CM5d1	SWNPYRR
SEQ ID NO: 111	Петля CM6d1	SWNPYRD
SEQ ID NO: 112	Петля ML1d1	GRYPYES
SEQ ID NO: 113	Петля ML2d1	SWEPGRE
SEQ ID NO: 114	Петля ML3d1	ARYPYRQ
SEQ ID NO: 115	Петля ML4d1	MRNGGPD
SEQ ID NO: 116	Петля ML5d1	ARDGGPD
SEQ ID NO: 117	Петля ML6d1	SWSPYKA
SEQ ID NO: 118	С-концевая граница	LESLPS
SEQ ID NO: 119	С-концевая граница	LESLPSPTLTALTNCSIEV
SEQ ID NO: 128	Домен Fc из IgG1	dkthtccppcpapellggpsvflfppkpkdtlmsrtpcvvvdvshedpevkf nwyvdgvevhnaktkpreeqynstvrsvltvlhqdwlngkeyckvsnkal papiektiskakgqprepqvylppsrdeltnqvsitclvkgfypsdiavewesn gqpennykttppvlidsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhcalhnhytq kslspspgk
SEQ ID NO: 129	лидер	<i>mvagsdagralgvlsvellhcfgfisc</i>

Типичные нуклеотидные последовательности LFA3 дикого типа и вариантов LFA3

SEQ ID NO	Описание	Последовательность
SEQ ID NO: 42	Лидерная последовательность из гибридных белков LFA3-Fc	<i>ATGGGCTGGTCCTGTATCATCCTCTTTCTGGTGGCCAC AGTACCGGAGTGCATAGC</i>
SEQ ID NO: 43	Шарнир-Pfe	GACAAAАСТСАСАТGСССАССGTGСССАСGACC TGAАСТССТGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCC СССAAAАСССАAGGACACCCTCATGATCTСССGGA ССССТGAGGTСАСАТGСGTGGTGGACGTGAGC САСGAAGACCCTGAGGTСAAGTTCAАСТGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG ССGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGTACCGTGT GGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAA GAACCAGGTСAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACAАСТACAAGACCACGC CTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCT ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCАСТACACGCAGAAGAGCCTC TCCCTGTCTCCGGGT
SEQ ID NO: 44	M1	TTTTСАСGСAGATTTACGGTGTGTTTACGGTAAT GTGACTTTTСАСGTCCGAGTAAСGTTCCTTTGAAG GAAGTCTTATGGAAAAАСAAAAAGATAAAGTTGT AGAATTTGAGAATAGTGAGGTTAGGGCATTAGTT CATTТАAGAAATAGGGTCTATTTGGATACTGTATCCG GTTCTTTGACCATTТАAATTTAACAAGTAGTGATG AAGACGAGTACGAAATGGAGTCCCCTAATATTACA GACACATTCАAGTTTTTTTTTGTACGTT
SEQ ID NO: 45	M2	TTTTСАСGСAGATTTACGGTGTGTTTACGGTAAT GTGACTTTTСАСGTCCGAGTAAСGTTCCTTTGAAG GAAGTCTTATGGAAAAАСAAAAAGATAAAGTTGT AGAATTTGAGAATAGTGAGGTTAGGGCATTAGTT CATTТАAGAAATAGGGTCTATTTGGATACTGTATCCG GTTCTTTGACCATTТАAATTTAACAAGTAGTGATG AAGACGAGTACGAAATCGAGTCCCCTAATATTACA GACACATTCАAGTTTTTTTTTGTACGTT
SEQ ID NO: 46	M3	TTTTСАСGСAGATTTACGGTGTGTTTACGGTAAT GTGACTTTTСАСGTCCGAGTAAСGTTCCTTTGAAG GAAGTCTTATGGAAAAАСAAAAAGATAAAGTTGT AGAATTTGAGAATAGTGAGGTTAGGGTATTAGTT CATTТАAGAAATAGGGTCTATTTGGATACTGTATCCG GTTCTTTGACCATTТАAATTTAACAAGTAGTGATG AAGACGAGTACGAAATGGAGTCCCCTAATATTACA GACACATTCАAGTTTTTTTTTGTACGTT

SEQ ID NO: 47	M4	TTTTACAGCAGATTTACGGTGTGTTTACGGTAAT GTGACTTTTCACGTTCCGAGTAACGTTCCTTTGAAG GAAGTCTTATGGAAAAACAAAAAGATAAAAGTTGT AGAATTTGAGAATAGTGAGGTTAGGGTATTTAGTT CATTTAAGAATAGGGTCTATTTGGATACTGTATCCG GTTCTTTGACCATTTATAATTTAACAAGTAGTGATG AAGACGAGTACGAATTCGAGTCCCCTAATATTACA GACACATTCAAGTTTTTTTTTGTACGTT
SEQ ID NO: 48	M5	TTTTACAGCAGATTTACGGTGTGTTTACGGTAAT GTGACTTTTCACGTTCCGAGTAACGTTCCTTTGAAG GAAGTCTTATGGAAAAACAAAAAGATAAAAGTTGT AGAATTTGAGAATAGTGAGATTAGGGTATTTAGTT CATTTAAGAATAGGGTCTATTTGGATACTGTATCCG GTTCTTTGACCATTTATAATTTAACAAGTAGTGATG AAGACGAGTACGAATTCGAGTCCCCTAATATTACA GACACATTCAAGTTTTTTTTTGTACGTT
SEQ ID NO: 49	M6	TTTTACAGCAGATTTACGGTGTGTTTACGGTAAT GTGACTTTTCACGTTCCGAGTAACGTTCCTTTGAAG GAAGTCTTATGGAAAAACAAAAAGATAAAAGTTT AGAATTTGAGAATAGTGAGCTTAGGGTATTTAGTT CATTTAAGAATAGGGTCTATTTGGATACTGTATCCG GTTCTTTGACCATTTATAATTTAACAAGTAGTGATG AAGACGAGTACGAATTCGAGTCCCCTAATATTACA GACACATTCAAGTTTTTTTTTGTACGTT
SEQ ID NO: 50	M7	TTTTACAGCAGATTTACGGTGTGTTTACGGTAAT GTGACTTTTCACGTTCCGAGTAACGTTCCTTTGAAG GAAGTCTTATGGAAAAACAAAAAGATAAAAGTTGT AGAATTTGAGAATAGTGAGGTTAGGGCATTTAGTT CATTTAAGAATAGGGTCTATTTGGATACTGTATCCG GTTCTTTGACCATTTATAATTTAACAAGTAGTGATG AAGACGAGTACGAAATGGAGTCCCCTAATATTACA GACACAATGAAGTTTTTTTTTGTACGTT
SEQ ID NO: 51	d1	TTTTCCAACAAATATATGGTGTGTTGTATGGGAAT GTAACTTTCCATGTACCAAGCAATGTGCCTTTAAAA GAGGTCCTATGGAAAAACAAAAGGATAAAAGTTG CAGAACTGGAAAATTCTGAATTCAGAGCTTTCTCA TCTTTTAAAAATAGGGTTTATTTAGACTGTGTCA GGTAGCCTCACTATCTACAACCTAACATCATCAGAT GAAGATGAGTATGAAATGGAATCGCCAAATATTAC TGATACCATGAAGTTCTTTCTTTATGTCTC
SEQ ID NO: 52	d3	TTTTCCAACAAATATATGGTGTGTTGTATGGGAAT GTAACTTTCCATGTACCAAGCAATGTGCCTTTAAAA GAGGTCCTATGGAAAAACAAAAGGATAAAAGTTG CAGAACTGGAAAATTCTGAATTCAGAGCTTTCTCA TCTTTTAAAAATAGGGTTTATTTAGACTGTGTCA GGTAGCCTCACTATCTACAACCTAACATCATCAGAT GAAGATGAGTATGAAATGGAATCGCCAAATATTAC TGATACCATGAAGTTCTTTCTTTATGTCTTGAGAG TCTGCCAGC
SEQ ID NO: 53	M1d1	TTTTACAGCAGATTTACGGTGTGTTTACGGTAAT GTGACTTTTCACGTTCCGAGTAACGTTCCTTTGAAG GAAGTCTTATGGAAAAACAAAAAGATAAAAGTTGT AGAATTTGAGAATAGTGAGGTTAGGGCATTAGTT CATTTAAGAATAGGGTCTATTTGGATACTGTATCCG GTTCTTTGACCATTTATAATTTAACAAGTAGTGATG AAGACGAGTACGAAATGGAGTCCCCTAATATTACA

		GACACATTCAAGTTTTTTTTGTACGTTCTC
SEQ ID NO: 54	M1d3	TTTTACAGCAGATTTACGGTGTGTTTACGGTAAT GTGACTTTTACGTTCCGAGTAACGTTCCTTTGAAG GAAGTCTTATGGAAAAAACAAAAAGATAAAAGTTGT AGAATTTGAGAATAGTGAGGTTAGGGCATTAGTT CATTTAAGAATAGGGTCTATTTGGATACTGTATCCG GTTCTTTGACCATTTATAATTTAACAAGTAGTGATG AAGACGAGTACGAAATGGAGTCCCCTAATATTACA GACACATTCAAGTTTTTTTTGTACGTTCTTGAGAGT CTGCCCAGC
SEQ ID NO: 55	M4d1	TTTTACAGCAGATTTACGGTGTGTTTACGGTAAT GTGACTTTTACGTTCCGAGTAACGTTCCTTTGAAG GAAGTCTTATGGAAAAAACAAAAAGATAAAAGTTGT AGAATTTGAGAATAGTGAGGTTAGGGTATTTAGTT CATTTAAGAATAGGGTCTATTTGGATACTGTATCCG GTTCTTTGACCATTTATAATTTAACAAGTAGTGATG AAGACGAGTACGAAATCGAGTCCCCTAATATTACA GACACATTCAAGTTTTTTTTGTACGTTCTC
SEQ ID NO: 56	M7d1	TTTTACAGCAGATTTACGGTGTGTTTACGGTAAT GTGACTTTTACGTTCCGAGTAACGTTCCTTTGAAG GAAGTCTTATGGAAAAAACAAAAAGATAAAAGTTGT AGAATTTGAGAATAGTGAGGTTAGGGCATTAGTT CATTTAAGAATAGGGTCTATTTGGATACTGTATCCG GTTCTTTGACCATTTATAATTTAACAAGTAGTGATG AAGACGAGTACGAAATGGAGTCCCCTAATATTACA GACACAATGAAGTTTTTTTTGTACGTTCTC
SEQ ID NO: 57	CM1d1	TTTTACAGCAGATTTACGGTGTGTTTACGGTAAT GTGACTTTTACGTTCCGAGTAACGTTCCTTTGAAG GAAGTCTTATGGAAAAAACAAAAAGATAAAAGTTGT AGAATTTGAGAATAGTGAGGTTAGGGCATTAGTT CATTTAAGAATAGGGTCTATTTGGATACTGTATCCG GTTCTTTGACCATTTATAATTTAACAAGTAGTGATG AAGACGAGTACGAAATGGAGTCCAGGAATGGTGG ACCTGATTTCAAGTTTTTTTTGTACGTTTTG
SEQ ID NO: 58	CM2d1	TTTTACAGCAGATTTACGGTGTGTTTACGGTAAT GTGACTTTTACGTTCCGAGTAACGTTCCTTTGAAG GAAGTCTTATGGAAAAAACAAAAAGATAAAAGTTGT AGAATTTGAGAATAGTGAGGTTAGGGCATTAGTT CATTTAAGAATAGGGTCTATTTGGATACTGTATCCG GTTCTTTGACCATTTATAATTTAACAAGTAGTGATG AAGACGAGTACGAAATGGAGTCCAGGAATCCTTAT AGAAGGTTCAAGTTTTTTTTGTACGTTTTG
SEQ ID NO: 59	CM3d1	TTTTACAGCAGATTTACGGTGTGTTTACGGTAAT GTGACTTTTACGTTCCGAGTAACGTTCCTTTGAAG GAAGTCTTATGGAAAAAACAAAAAGATAAAAGTTGT AGAATTTGAGAATAGTGAGGTTAGGGCATTAGTT CATTTAAGAATAGGGTCTATTTGGATACTGTATCCG GTTCTTTGACCATTTATAATTTAACAAGTAGTGATG AAGACGAGTACGAAATGGAGTCCAGGAATCCTTAT AGAGACTTCAAGTTTTTTTTGTACGTTTTG
SEQ ID NO: 60	CM4d1	TTTTACAGCAGATTTACGGTGTGTTTACGGTAAT GTGACTTTTACGTTCCGAGTAACGTTCCTTTGAAG GAAGTCTTATGGAAAAAACAAAAAGATAAAAGTTGT AGAATTTGAGAATAGTGAGGTTAGGGCATTAGTT CATTTAAGAATAGGGTCTATTTGGATACTGTATCCG GTTCTTTGACCATTTATAATTTAACAAGTAGTGATG AAGACGAGTACGAAATGGAGTCCAGGAATGGTGG

		ACCTGATTTCAAGTTTTTTTTGTACGTTTTG
SEQ ID NO: 61	CM5d1	TTTTACAGCAGATTTACGGTGTGTTTACGGTAAT GTGACTTTTACGTTCCGAGTAACGTTCCTTTGAAG GAAGTCTTATGGAAAAACAAAAAGATAAAAGTTGT AGAATTTGAGAATAGTGAGGTTAGGGCATTAGTT CATTTAAGAATAGGGTCTATTTGGATACTGTATCCG GTTCTTTGACCATTATAATTTAACAAGTAGTGATG AAGACGAGTACGAAATGGAGTCCTGGAATCCTTAT AGAAGGTTCAAGTTTTTTTTGTACGTTTTG
SEQ ID NO: 62	CM6d1	TTTTACAGCAGATTTACGGTGTGTTTACGGTAAT GTGACTTTTACGTTCCGAGTAACGTTCCTTTGAAG GAAGTCTTATGGAAAAACAAAAAGATAAAAGTTGT AGAATTTGAGAATAGTGAGGTTAGGGCATTAGTT CATTTAAGAATAGGGTCTATTTGGATACTGTATCCG GTTCTTTGACCATTATAATTTAACAAGTAGTGATG AAGACGAGTACGAAATGGAGTCCTGGAATCCTTAT AGAGACTTCAAGTTTTTTTTGTACGTTTTG
SEQ ID NO: 63	ML1d1	TTTTACAGCAGATTTACGGTGTGTTTACGGTAAT GTGACTTTTACGTTCCGAGTAACGTTCCTTTGAAG GAAGTCTTATGGAAAAACAAAAAGATAAAAGTTGT AGAATTTGAGAATAGTGAGGTTAGGGCATTAGTT CATTTAAGAATAGGGTCTATTTGGATACTGTATCCG GTTCTTTGACCATTATAATTTAACAAGTAGTGATG AAGACGAGTACGAAATGGAGGTCGGTATCCGTAT GAGTCGTTCAAGTTTTTTTTGTACGTTTTG
SEQ ID NO: 64	ML2d1	TTTTACAGCAGATTTACGGTGTGTTTACGGTAAT GTGACTTTTACGTTCCGAGTAACGTTCCTTTGAAG GAAGTCTTATGGAAAAACAAAAAGATAAAAGTTGT AGAATTTGAGAATAGTGAGGTTAGGGTATTTAGTT CATTTAAGAATAGGGTCTATTTGGATACTGTATCCG GTTCTTTGACCATTATAATTTAACAAGTAGTGATG AAGACGAGTACGAAATCGAGAGTTGGGAGCCTGGG AGGGAGTTCAAGTTTTTTTTGTACGTTTTG
SEQ ID NO: 65	ML3d1	TTTTACAGCAGATTTACGGTGTGTTTACGGTAAT GTGACTTTTACGTTCCGAGTAACGTTCCTTTGAAG GAAGTCTTATGGAAAAACAAAAAGATAAAAGTTGT AGAATTTGAGAATAGTGAGGTTAGGGCATTAGTT CATTTAAGAATAGGGTCTATTTGGATACTGTATCCG GTTCTTTGACCATTATAATTTAACAAGTAGTGATG AAGACGAGTACGAAATGGAGGCTCGGTATCCTTAT CGGCAGTTCAAGTTTTTTTTGTACGTTTTG
SEQ ID NO: 66	ML4d1	TTTTACAGCAGATTTACGGTGTGTTTACGGTAAT GTGACTTTTACGTTCCGAGTAACGTTCCTTTGAAG GAAGTCTTATGGAAAAACAAAAAGATAAAAGTTGT AGAATTTGAGAATAGTGAGGTTAGGGCATTAGTT CATTTAAGAATAGGGTCTATTTGGATACTGTATCCG GTTCTTTGACCATTATAATTTAACAAGTAGTGATG AAGACGAGTACGAAATGGAGATGCGGAATGGTGG TCCTGATTTCAAGTTTTTTTTGTACGTTTTG
SEQ ID NO: 67	ML5d1	TTTTACAGCAGATTTACGGTGTGTTTACGGTAAT GTGACTTTTACGTTCCGAGTAACGTTCCTTTGAAG GAAGTCTTATGGAAAAACAAAAAGATAAAAGTTGT AGAATTTGAGAATAGTGAGGTTAGGGCATTAGTT CATTTAAGAATAGGGTCTATTTGGATACTGTATCCG GTTCTTTGACCATTATAATTTAACAAGTAGTGATG AAGACGAGTACGAAATGGAGGCGGGATGGGG TCCTGATTTCAAGTTTTTTTTGTACGTTTTG

SEQ ID NO: 68	ML6d1	TTTTACAGCAGATTTACGGTGTGTTTACGGTAAT GTGACTTTTACAGTTCCGAGTAACGTTCCCTTGAAG GAAGTCTTATGGAAAAACAAGATAAAGTTGT AGAATTTGAGAATAGTGAGGTTAGGGCATTAGTT CATTTAAGAATAGGGTCTATTTGGATACTGTATCCG GTTCTTTGACCATTTATAATTTAACAAAGTAGTGATG AAGACGAGTACGAAATGGAGTCGTGGTCTCCTTAT AAGGCGTTCAAGTTTTTTTTGTACGTTTTG
SEQ ID NO: 122	нуклеотидная последовательность LFA3-Fc M1-d1 (включая лидерную последовательность, подчеркнута и выделена курсивом)	<i>ATGGGCTGGTCCTGTATCATCCTCTTTCTGGTGGCCAC</i> <i>AGCTACCGGAGTGCATAGCTTTTACAGCAGATTTA</i> CGGTGTTGTTTACGGTAATGTGACTTTTACGTTCC GAGTAACGTTCCCTTGAAGGAAGTCTTATGGAAAA AACAAAAAGATAAAGTTGTAGAATTTGAGAATAGT GAGGTTAGGGCATTAGTTTCAATTAAGAATAGGGT CTATTTGGATACTGTATCCGGTTCTTTGACCATTTA TAATTTAACAAAGTAGTGATGAAGACGAGTACGAAA TGGAGTCCCCTAATATTACAGACACATTCAAGTTTT TTTTGTACGTTCTCGACAAAACACACATGCCAC CGTGCCACGACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCA GTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTC ATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGT GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACA GCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGA GAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGA AGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCC TGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTG GAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC ACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGC TCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAG AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTC CGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT
SEQ ID NO: 123	нуклеотидная последовательность LFA3-Fc M1-d1 (также упоминается как "LFA3-Fc M1d1", "M1d1", "M1-d1" или "M1d1-Pfe") (без лидерной последовательности)	TTTTACAGCAGATTTACGGTGTGTTTACGGTAAT GTGACTTTTACAGTTCCGAGTAACGTTCCCTTGAAG GAAGTCTTATGGAAAAACAAGATAAAGTTGT AGAATTTGAGAATAGTGAGGTTAGGGCATTAGTT CATTTAAGAATAGGGTCTATTTGGATACTGTATCCG GTTCTTTGACCATTTATAATTTAACAAAGTAGTGATG AAGACGAGTACGAAATGGAGTCCCCTAATATTACA GACACATTCAAGTTTTTTTTGTACGTTCTCGACAAA ACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACT CCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTCCCCCAAA ACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGACCCCTG AGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG CGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGG GAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAG CGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGCC CTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCC CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC TGCCCCATCCCGGAAGAGATGACCAAGAACCAG

		GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCC AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGC AGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTG TTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAG CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGC ACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT CCGGGT
SEQ ID NO: 124	LFA3-Fc WT (включая лидерную последова- тельность, подчеркнута)	<u>ATGGTTGCTGGGAGCGACGCGGGGGCGGGCCCTGGG</u> <u>GGTCCCTCAGCGTGGTCTGCCTGCTGACTGCTTGGT</u> <u>TTCATCAGCTGTTTTTCCCAACAAATATATGGTGTTG</u> TGTATGGGAATGTAACCTTCCATGTACCAAGCAAT GTGCCTTTAAAAGAGGTCTATGGAAAAACA GGATAAAGTTGCAGAACTGGAAAATTCTGAATCA GAGCTTCTCATCTTTAAAAATAGGGTTTATTAG ACACTGTGTCAGGTAGCCTCACTATCTACAACCTAA CATCATCAGATGAAGATGAGTATGAAATGGAATCG CCAAATATTACTGATACCATGAAGTTCTTTCTTAT GTCGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGC ACCTGAACCTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTT CCCCCAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCC GGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTG AGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTA CGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG TGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACT GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC AACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCAT CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG GTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGAC CAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAG GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCA CGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCA TGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCC TCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
SEQ ID NO: 125	LFA3-Fc WT (без лидера)	TTTTCCCAACAAATATATGGTGTTGTGTATGGGAAT GTAACCTTCCATGTACCAAGCAATGTGCCTTTAAAA GAGGTCTATGGAAAAACAAGGATAAAGTTG CAGAAGTGGAAAATTCTGAATTCAGAGCTTTCTCA TCTTTTAAAAATAGGGTTTATTTAGACACTGTGTCA GGTAGCCTCACTATCTACAACCTAACATCATCAGAT GAAGATGAGTATGAAATGGAATCGCCAAATATTAC TGATACCATGAAGTTCTTTCTTTATGTCGACAAAAC TCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCC TGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAC CCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGA GGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGGC TCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT CCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCA AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTG

		CCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGT CAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCCTGT TGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGC TCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAA CGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA CAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC CGGGTAAA
SEQ ID NO: 126	Домен LFA3 WT	TTTTCCCAACAATATATGGTGTGTGTATGGGAAT GTAACCTTTCCATGTACCAAGCAATGTGCCTTTAAAA GAGGTCCTATGGAAAAACAAGGATAAAGTTG CAGAAGTGGAAAATTCTGAATTCAGAGCTTTCTCA TCTTTAAAAATAGGGTTTATTAGACTGTGTCA GGTAGCCTCACTATCTACAACCTAACATCATCAGAT GAAGATGAGTATGAAATGGAATCGCCAAATATTAC TGATACCATGAAGTTCTTTCTTTATGTC
SEQ ID NO: 127	Домен IgG1 Fc	GACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACC TGAACCTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCC CCCAAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGA CCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAG CCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGT GGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGC TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTC CAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTG TACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAA GAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGC AATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGC CTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTCT ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCA GCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTC TCCCTGTCTCCGGGTAAA
SEQ ID NO: 130	лидер	<i>ATGGTTGCTGGGAGCGACGCGGGGCGGGCCCTGGG GGTCTCAGCGTGGTCTGCCTGCTGCACTGCTTTGGT TTCATCAGCTGT</i>

Аминокислотная последовательность гибридного белка M1d1 LFA3-Fc представлена как SEQ ID NO: 69. Четыре замены ненативных аминокислот (A36V, L38F, F43V и M86F) выделены жирным шрифтом и подчеркнуты. С-концевой остаток домена LFA3 (L93) отмечен двойным подчеркиванием. Четыре спрогнозированных сайта N-связанного гликозилирования (N12, N66, N81 и N170) отмечены пунктирной линией.

FSQQIYGVVYGNVTFHVPNSVPLKEVLWKKQKDKVVEFENSEVRAFSSFKNRV
YLDTVSGSLTIYNLTSSDEDEYEMESPNTIDTFKFFLYVL~~DK~~TH~~TC~~PPCPAPPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY~~NT~~
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK~~TP~~PPVLDSDGSFFLYSKLTV~~DK~~SRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 69)

В одном аспекте дополнительная молекула полипептида включает один или несколько из следующих воплощений.

A1. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, где домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70 или функциональный вариант SEQ ID NO: 70 (например, последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

A2. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, при этом молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQQIYGVVYGNVTFHVPNSVPLKX1VX2WX3KQX4X5X6VAX7LX8NSX9FX10FF11X
VAX7LX8NSX9FX10FF11GES12S1

X1 представляет собой D, E, N, K, Q или H,

X2 представляет собой F, I, L, V, Nle, M или A,
 X3 представляет собой K, R, M, T, Q или N,
 X4 представляет собой K, R, M, T, Q или N,
 X5 представляет собой D, E, N, K, Q или H,
 X6 представляет собой K, R, M, T, Q или N,
 X7 представляет собой D, E, N, K, Q или H,
 X8 представляет собой D, E, N, K, Q или H,
 X9 представляет собой D, E, N, K, Q или H,
 X10 представляет собой K, R, M, T, Q или N,
 X11 представляет собой F, Y, L, H, I, N, V, D, A или Y,
 X12 представляет собой S, T, A или G,
 X13 представляет собой P, L, H, R или A,
 X14 представляет собой F, I, L, V, M, A или Nle,
 X15 представляет собой D, E, N, K, Q или H и
 X16 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 71),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 71 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

A3. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKX1VX2WX3KQX4X5X6VAX7LX8NSX9FX10

AX11X12SFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTSSDEDEYEMESX13NX14TX15TMKFFLYVX16,

где:

X1 представляет собой D, E, N, K, Q или H,
 X2 представляет собой F, I, L или V,
 X3 представляет собой K, R, M или T,
 X4 представляет собой K, R, M или T,
 X5 представляет собой D, E, N, K, Q или H,
 X6 представляет собой K, R, M или T,
 X7 представляет собой D, E, N, K, Q или H,
 X8 представляет собой D, E, N, K, Q или H,
 X9 представляет собой D, E, N, K, Q или H,
 X10 представляет собой K, R, M или T,
 X11 представляет собой F, Y, L, H, I, N, V или D,
 X12 представляет собой S, T, A или G,
 X13 представляет собой P, L, H или R,
 X14 представляет собой F, I, L или V,
 X15 представляет собой D, E, N, K, Q или H и
 X16 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 72),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 72 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

A4. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, при этом молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 содержит одну или несколько мутаций (например, замену, делецию или вставку) в остатках 25, 27, 29, 32, 33, 34, 37, 39, 42, 44, 46, 47, 80, 82 или 84 относительно SEQ ID NO: 3, пронумерованных в соответствии с SEQ ID NO: 3, например, где домен LFA3 включает SEQ ID NO: 3 с одной или несколькими мутациями (например, заменой, делецией или вставкой) в остатках 25, 27, 29, 32, 33, 34, 37, 39, 42, 44, 46, 47, 80, 82, или 84 относительно SEQ ID NO: 3.

A5. Выделенная полипептидная молекула A4, в которой одна или несколько мутаций содержат одну или несколько из следующих замен:

- i) замену, выбранную из E25D, E25N, E25K, E25Q или E25H,
- ii) замену, выбранную из L27F, L27I, L27V, L27Nle, L27M или L27A,
- iii) замену, выбранную из K29R, K29M, K29T, K29Q или K29N,
- iv) замену, выбранную из K32R, K32M, K32T, K32Q или K32N,
- v) замену, выбранную из D33E, D33N, D33K, D33Q или D33H,
- vi) замену, выбранную из K34R, K34M, K34T, K34Q или K34N,
- vii) замену, выбранную из E37D, E37N, E37K, E37Q или E37H,
- viii) замену, выбранную из E39D, E39N, E39K, E39Q или E39H,
- ix) замену, выбранную из E42D, E42N, E42K, E42Q или E42H,
- x) замену, выбранную из R44K, R44M, R44T, R44Q или R44N,

- xi) замену, выбранную из F46Y, F46L, F46H, F46I, F46N, F46V, F46D, F46A или F46Y,
- xii) замену, выбранную из S47T, S47A или S47G,
- xiii) замену, выбранную из P80L, P80H, P80R или P80A,
- xiv) замену, выбранную из I82F, I82L, I82V, I82M, I82A или I82Nle, или
- xv) замену, выбранную из D84E, D84N, D84K, D84Q или D84H.

A6. Выделенная полипептидная молекула A4, в которой одна или несколько мутаций содержат одну или несколько из следующих замен:

- i) замену, выбранную из E25D, E25N, E25K, E25Q или E25H,
- ii) замену, выбранную из L27F, L27I или L27V,
- iii) замену, выбранную из K29R, K29M или K29T,
- iv) замену, выбранную из K32R, K32M или K32T,
- v) замену, выбранную из D33E, D33N, D33K, D33Q или D33H,
- vi) замену, выбранную из K34R, K34M или K34T,
- vii) замену, выбранную из E37D, E37N, E37K, E37Q или E37H,
- viii) замену, выбранную из E39D, E39N, E39K, E39Q или E39H,
- ix) замену, выбранную из E42D, E42N, E42K, E42Q или E42H,
- x) замену, выбранную из R44K, R44M или R44T,
- xi) замену, выбранную из F46Y, F46L, F46H, F46I, F46N, F46V или F46D,
- xii) замену, выбранную из S47T, S47A или S47G,
- xiii) замену, выбранную из P80L, P80H или P80R,
- xiv) замену, выбранную из I82F, I82L или I82V, или
- xv) замену, выбранную из D84E, D84N, D84K, D84Q или D84H.

A7. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность: X1X2X3X4X5X6X7, где:

- X1 представляет собой S, G, A, M или T,
- X2 представляет собой R, W, P или A,
- X3 представляет собой N, Y, S, E, D, Q, H, K или R
- X4 представляет собой P, G, I, L, V, M, A, F или Nle,
- X5 представляет собой Y, G, T или S,
- X6 представляет собой R, E, K, P, D или N, и
- X7 представляет собой R, D, S, Q, A, E, T или S (SEQ ID NO: 84),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 84 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SPNITDT (SEQ ID NO: 83).

A8. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность: X1X2X3X4X5X6X7, где:

- X1 представляет собой S, G, A или M,
- X2 представляет собой R, W или P,
- X3 представляет собой N, Y, S, E или D,
- X4 представляет собой P, G или I,
- X5 представляет собой Y, G или T,
- X6 представляет собой R, E, K, P или D и
- X7 представляет собой R, D, S, Q, A, E или T (SEQ ID NO: 85),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 85 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

A9. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность: X1X2X3X4X5X6X7, где:

- X1 представляет собой S, G, A или M,
- X2 представляет собой R или W,
- X3 представляет собой N, Y, S, E или D,
- X4 представляет собой P или G,
- X5 представляет собой Y или G,
- X6 представляет собой R, E, K или P и
- X7 представляет собой R, D, S, Q, A или E (SEQ ID NO: 86),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 86 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

A10. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула

полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность: X1X2X3X4X5X6X7, где:

- X1 представляет собой S, G, A или M,
- X2 представляет собой R или W,
- X3 представляет собой N, Y, S, E или D,
- X4 представляет собой P или G,
- X5 представляет собой Y или G,
- X6 представляет собой R, E, K или P и
- X7 представляет собой R, D, S, Q, A или E (SEQ ID NO: 86).

A11. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность: SX1NX2X3X4X5, где:

- X1 представляет собой R, W, P или A,
- X2 представляет собой P, G, I, L, V, M, A, F или Nle,
- X3 представляет собой Y, G, T или S,
- X4 представляет собой R, P, D или N и
- X5 представляет собой R, D, T или S (SEQ ID NO: 87),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 87 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

A12. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность: SX1NX2X3X4X5, где:

- X1 представляет собой R, W или P,
- X2 представляет собой P, G или I,
- X3 представляет собой Y, G или T,
- X4 представляет собой R, P или D и
- X5 представляет собой R, D или T (SEQ ID NO: 88),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 88 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

A13. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность: SX1NX2X3X4X5, где:

- X1 представляет собой R или W,
- X2 представляет собой P или G,
- X3 представляет собой Y или G,
- X4 представляет собой R или P и
- X5 представляет собой R или D (SEQ ID NO: 89),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 89 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

A14. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность: SX1NX2X3X4X5, где:

- X1 представляет собой R или W,
- X2 представляет собой P или G,
- X3 представляет собой Y или G,
- X4 представляет собой R или P и
- X5 представляет собой R или D (SEQ ID NO: 89).

A15. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность: X1X2X3X4X5X6X7, где:

- X1 представляет собой S, G, A, M или T,
- X2 представляет собой R, W, P или A,
- X3 представляет собой N, Y, S, E, D, Q, H, K или R
- X4 представляет собой P, G, I, L, V, M, A, F или Nle,
- X5 представляет собой Y, G, T или S,
- X6 представляет собой R, E, K, P, D или N и
- X7 представляет собой D, S, Q, A, E, T или S (SEQ ID NO: 90),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 90 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислот-

ную последовательность SEQ ID NO: 83.

A16. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность: X1X2X3X4X5X6X7, где:

- X1 представляет собой S, G, A или M,
- X2 представляет собой R, W или P,
- X3 представляет собой N, Y, S, E или D,
- X4 представляет собой P, G или I,
- X5 представляет собой Y, G или T,
- X6 представляет собой R, E, K, P или D и
- X7 представляет собой D, S, Q, A, E или T (SEQ ID NO: 91),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 91 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

A17. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность: X1X2X3X4X5X6X7, где:

- X1 представляет собой S, G, A или M,
- X2 представляет собой R или W,
- X3 представляет собой N, Y, S, E или D,
- X4 представляет собой P или G,
- X5 представляет собой Y или G,
- X6 представляет собой R, E, K или P и
- X7 представляет собой D, S, Q, A или E (SEQ ID NO: 92),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 92 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

A18. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность: X1X2X3X4X5X6X7, где:

- X1 представляет собой S, G, A или M,
- X2 представляет собой R или W,
- X3 представляет собой N, Y, S, E или D,
- X4 представляет собой P или G,
- X5 представляет собой Y или G,
- X6 представляет собой R, E, K или P и
- X7 представляет собой D, S, Q, A или E (SEQ ID NO: 92).

A19. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, где полипептидная молекула включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQQIYGVVYGNVTFHVPNSNVLKEVLWKKQKDKVX1EX2ENSEX3RX4FSSFKNRVYL
DTVSGSLTIYNLTSSDEDEYEX5EX6X7X8X9X10X11X12X13KFFLYVX14,

- где X1 представляет собой V, L или A,
- X2 представляет собой F или L,
- X3 представляет собой V, I, L или F,
- X4 представляет собой A, V или S,
- X5 представляет собой M, F, I или L,
- X6 представляет собой S, G, A или M,
- X7 представляет собой R или W,
- X8 представляет собой N, Y, S, E или D,
- X9 представляет собой P или G,
- X10 представляет собой Y или G,
- X11 представляет собой R, E, K или P,
- X12 представляет собой R, D, S, Q, A или E,
- X13 представляет собой F, M, I или L и
- X14 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 93),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 93 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

A20. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, где полипептидная молекула включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQQIYGVVYGNVTFHVPNSVPLKEVLWKKQKDKVX1EX2ENSEX3RX4FSSFKNRVYL

DTVSGSLTIYNLTSSDEDEYEX5EX6X7X8X9X10X11X12X13KFFLYVX14,

где X1 представляет собой V, L или A,

X2 представляет собой F или L,

X3 представляет собой V, I, L или F,

X4 представляет собой A, V или S,

X5 представляет собой M, F, I или L,

X6 представляет собой S, G, A или M,

X7 представляет собой R или W,

X8 представляет собой N, Y, S, E или D,

X9 представляет собой P или G,

X10 представляет собой Y или G,

X11 представляет собой R, E, K или P,

X12 представляет собой R, D, S, Q, A или E,

X13 представляет собой F, M, I или L и

X14 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 93).

A21. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, где полипептидная молекула включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQQIYGVVYGNVTFHVPNSVPLKEVLWKKQKDKVX1EX2ENSEX3RX4FSSFKNRVYL

DTVSGSLTIYNLTSSDEDEYEX5EX6X7X8X9X10X11X12X13KFFLYVX14,

где X1 представляет собой V или A,

X2 представляет собой F или L,

X3 представляет собой V, I или F,

X4 представляет собой A или V,

X5 представляет собой M или F,

X6 представляет собой S, G, A или M,

X7 представляет собой R или W,

X8 представляет собой N, Y, S, E или D,

X9 представляет собой P или G,

X10 представляет собой Y или G,

X11 представляет собой R, E, K или P,

X12 представляет собой R, D, S, Q, A или E,

X13 представляет собой F или M и

X14 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 94), или функциональный вариант SEQ ID NO: 94 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

A22. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, где полипептидная молекула включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQQIYGVVYGNVTFHVPNSVPLKEVLWKKQKDKVX1EX2ENSEX3RX4FSSFKNRVYL

DTVSGSLTIYNLTSSDEDEYEX5EX6X7X8X9X10X11X12X13KFFLYVX14,

где X1 представляет собой V или A,

X2 представляет собой F или L,

X3 представляет собой V, I или F,

X4 представляет собой A или V,

X5 представляет собой M или F,

X6 представляет собой S, G, A или M,

X7 представляет собой R или W,

X8 представляет собой N, Y, S, E или D,

X9 представляет собой P или G,

X10 представляет собой Y или G,

X11 представляет собой R, E, K или P,

X12 представляет собой R, D, S, Q, A или E,

X13 представляет собой F или M и

X14 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 94).

A23. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула

полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 95 или функциональный вариант SEQ ID NO: 95 (например, последовательность, имеющую по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

A24. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, где полипептидная молекула включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKVVEFENSEVRX1FSSFKNRVYLDT

VSGSLTIYNLTSSDEDEYEX2EX3X4 X5X6X7X8X9FKFFLYVX10,

где X1 представляет собой A, V, L или I,

X2 представляет собой M, F, L или I,

X3 представляет собой S, G, A, M или T,

X4 представляет собой R, W, P или A,

X5 представляет собой N, Y, S, E, D, Q, H, K или R,

X6 представляет собой P, G, I, L, V, M, A, F или Nle,

X7 представляет собой Y, G, T или S,

X8 представляет собой R, E, K, P, D или N,

X9 представляет собой R, D, S, Q, A, E, T или S

X10 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 96),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 96 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

A25. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, где полипептидная молекула включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKVVEFENSEVRX1FSSFKNRVYLDT

VSGSLTIYNLTSSDEDEYEX2EX3X4 X5X6X7X8X9FKFFLYVX10,

где X1 представляет собой A или V,

X2 представляет собой M или F,

X3 представляет собой S, G, A или M,

X4 представляет собой R, W или P,

X5 представляет собой N, Y, S, E или D,

X6 представляет собой P, G или I,

X7 представляет собой Y, G или T,

X8 представляет собой R, E, K, P или D,

X9 представляет собой R, D, S, Q, A, E или T, и

X10 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 97),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 97 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

A26. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, где полипептидная молекула включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKVVEFENSEVRX1FSSFKNRVYLDT

VSGSLTIYNLTSSDEDEYEX2EX3X4 X5X6X7X8X9FKFFLYVX10,

где X1 представляет собой A или V,

X2 представляет собой M или F,

X3 представляет собой S, G, A или M,

X4 представляет собой R или W,

X5 представляет собой N, Y, S, E или D,

X6 представляет собой P или G,

X7 представляет собой Y или G,

X8 представляет собой R, E, K или P,

X9 представляет собой R, D, S, Q, A или E и

X10 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 98),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 98 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

A27. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, где полипептидная молекула включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKVVEFENSEVRXIFSSFKNRVYLDLT

VSGSLTIYNLTSSDEDEYEX2EX3X4 X5X6X7X8X9FKFFLYVX10,

где X1 представляет собой A или V,

X2 представляет собой M или F,

X3 представляет собой S, G, A или M,

X4 представляет собой R или W,

X5 представляет собой N, Y, S, E или D,

X6 представляет собой P или G,

X7 представляет собой Y или G,

X8 представляет собой R, E, K или P,

X9 представляет собой R, D, S, Q, A или E, и

X10 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 98).

A28. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKVVEFENSEVRAFSSFKNRVYLDTV

SGSLTIYNLTSSDEDEYEMESX1NX2X3X4X5FKFFLYVX6,

где X1 представляет собой любую аминокислоту,

X2 представляет собой любую аминокислоту,

X3 представляет собой любую аминокислоту,

X4 представляет собой любую аминокислоту,

X5 представляет собой любую аминокислоту, и

X6 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 99),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 99 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

A29. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKVVEFENSEVRAFSSFKNRVYLDTV

SGSLTIYNLTSSDEDEYEMESX1NX2X3X4X5FKFFLYVX6,

где X1 представляет собой R, W, P или A,

X2 представляет собой P, G, I, L, V, M, A, F или Nle,

X3 представляет собой Y, G, T или S,

X4 представляет собой R, P, D или N,

X5 представляет собой R, D, T или S и

X6 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 100),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 100 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

A30. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKVVEFENSEVRAFSSFKNRVYLDTV

SGSLTIYNLTSSDEDEYEMESX1NX2X3X4X5FKFFLYVX6,

где X1 представляет собой R, W или P,

X2 представляет собой P, G или I,

X3 представляет собой Y, G или T,

X4 представляет собой R, P или D,

X5 представляет собой R, D или T и

X6 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 101),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 101 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

A31. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKVVEFENSEVRAFSSFKNRVYLDTV

SGSLTIYNLTSSDEDEYEMESX1NX2X3X4X5FKFFLYVX6,

где X1 представляет собой R или W,

X2 представляет собой P или G,

X3 представляет собой Y или G,

X4 представляет собой R или P,

X5 представляет собой R или D и

X6 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 102),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 102 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

A32. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKVVEFENSEVRAFSSFKNRVYLDTV

SGSLTIYNLTSSDEDEYEMESX1NX2X3X4X5FKFFLYVX6,

где X1 представляет собой R или W,

X2 представляет собой P или G,

X3 представляет собой Y или G,

X4 представляет собой R или P,

X5 представляет собой R или D и

X6 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 102).

A33. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, где полипептидная молекула включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKVVEFENSEVRX1FSSFKNRVYLDTV

VSGSLTIYNLTSSDEDEYEX2EX3X4 X5X6X7X8X9FKFFLYVX10,

где X1 представляет собой A, V, L или I,

X2 представляет собой M, F, L или I,

X3 представляет собой S, G, A, M или T,

X4 представляет собой R, W, P или A,

X5 представляет собой N, Y, S, E, D, Q, H, K или R,

X6 представляет собой P, G, I, L, V, M, A, F или Nle,

X7 представляет собой Y, G, T или S,

X8 представляет собой R, E, K, P, D или N,

X9 представляет собой D, S, Q, A, E, T или S и

X10 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 103),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 103 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

A34. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, где полипептидная молекула включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKVVEFENSEVRX1FSSFKNRVYLDTV

VSGSLTIYNLTSSDEDEYEX2EX3X4 X5X6X7X8X9FKFFLYVX10,

где X1 представляет собой A или V, X2 представляет собой M или F,

X3 представляет собой S, G, A или M,

X4 представляет собой R, W или P,

X5 представляет собой N, Y, S, E или D,

X6 представляет собой P, G или I,

X7 представляет собой Y, G или T,

X8 представляет собой R, E, K, P или D,

X9 представляет собой D, S, Q, A, E или T и

X10 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 104),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 104 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

A35. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, где полипептидная молекула включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKVVEFENSEVRX1FSSFKNRVYLDT

VSGSLTIYNLTSSDEDEYEX2EX3X4 X5X6X7X8X9FKFFLYVX10,

где X1 представляет собой A или V,

X2 представляет собой M или F,

X3 представляет собой S, G, A или M,

X4 представляет собой R или W,

X5 представляет собой N, Y, S, E или D,

X6 представляет собой P или G,

X7 представляет собой Y или G,

X8 представляет собой R, E, K или P,

X9 представляет собой D, S, Q, A или E и

X10 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 105),

или функциональный вариант SEQ ID NO: 104 (например, последовательность, имеющая по меньшей мере 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

A36. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, где полипептидная молекула включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность:

FSQQIYGVVYGNVTFHVPSNVPLKEVLWKKQKDKVVEFENSEVRX1FSSFKNRVYLDT

VSGSLTIYNLTSSDEDEYEX2EX3X4 X5X6X7X8X9FKFFLYVX10,

где X1 представляет собой A или V,

X2 представляет собой M или F,

X3 представляет собой S, G, A или M,

X4 представляет собой R или W,

X5 представляет собой N, Y, S, E или D,

X6 представляет собой P или G,

X7 представляет собой Y или G,

X8 представляет собой R, E, K или P,

X9 представляет собой D, S, Q, A или E и

X10 отсутствует, представляет собой L или LESLPS (SEQ ID NO: 105).

A37. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 106-117, или ее функциональный вариант (например, последовательность, имеющая по меньшей мере, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

A38. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, где эта полипептидная молекула включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106 или ее функциональный вариант (например, последовательность, имеющая не менее 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

A39. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 106.

A40. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107 или ее функциональный вариант (например, последовательность, имеющая не менее 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

A41. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 107.

A42. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, при этом молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108 или ее функциональный вариант (например, последовательность, имеющую не менее 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

A43. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 108.

SEQ ID NO: 35.

A75. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, при этом молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36 или ее функциональный вариант (например, последовательность, имеющую не менее 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

A76. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36.

A77. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, при этом полипептидная молекула включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37 или ее функциональный вариант (например, последовательность, имеющую не менее 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

A78. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37.

A79. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38 или ее функциональный вариант (например, последовательность, имеющую не менее 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

A80. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38.

A81. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39 или ее функциональный вариант (например, последовательность, имеющую не менее 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

A82. Выделенная полипептидная молекула, которая специфически связывается с CD2, при этом молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39.

A83. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, при этом молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40 или ее функциональный вариант (например, последовательность, имеющую не менее 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

A84. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

A85. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41 или ее функциональный вариант (например, последовательность, имеющую не менее 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности), где домен LFA3 не включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 83.

A86. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 41.

A87. Выделенная молекула полипептида, которая специфически связывается с CD2, при этом молекула полипептида включает домен LFA3, причем домен LFA3 содержит одну или несколько мутаций (например, замену, делецию или вставку) в остатках 79, 80, 81, 82, 83, 84 или 85 относительно SEQ ID NO: 3, пронумерованных в соответствии с SEQ ID NO: 3, например, где домен LFA3 включает SEQ ID NO: 3 с одной или несколькими мутациями (например, заменой, делецией или вставкой) по остаткам 79, 80, 81, 82, 83, 84 или 85 относительно SEQ ID NO: 3, пронумерованных в соответствии с SEQ ID NO: 3.

В некоторых воплощениях молекулы полипептида LFA3 по настоящему изобретению содержат домен LFA3, где домен LFA3 представляет собой любую последовательность варианта LFA3, описанную в данном документе (например, любую последовательность варианта LFA3, раскрытую в табл. 2). В некоторых воплощениях домен LFA3 составляет не более 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170 или 180 аминокислот в длину. В некоторых воплощениях домен LFA3 имеет длину 92 аминокислоты. В некоторых воплощениях домен LFA3 имеет длину 93 аминокислоты. В некоторых воплощениях домен LFA3 имеет длину 98 аминокислот. В некоторых воплощениях домен LFA3 происходит из первого внеклеточного

домена LFA3. В некоторых воплощениях домен LFA3 содержит не более 6, 10, 15, 20 или 30 аминокислотных мутаций (например, замен, добавлений или делеций) относительно последовательности LFA3 дикого типа. В некоторых воплощениях домен LFA3 содержит 5 аминокислотных замен относительно последовательности LFA3 дикого типа.

Молекулы полипептида LFA3 по настоящему изобретению можно получить любым способом, известным в данной области. Общие методы получения рекомбинантных белков известны в данной области и/или описаны в данном документе.

После первоначальной идентификации активность молекулы-кандидата полипептида LFA3 может быть дополнительно подтверждена и уточнена с помощью биоанализов, известных как биоанализы для тестирования целевых биологических активностей. В некоторых воплощениях изобретения клеточный анализ *in vitro* используется для дополнительной характеристики молекулы полипептида-кандидата LFA3. Например, биоанализы можно использовать для непосредственного отбора кандидатов. Некоторые из способов идентификации и характеристики молекул полипептида LFA3 подробно описаны в примерах.

В некоторых воплощениях описанная в данном документе молекула полипептида LFA3 включает домен Fc. Домен Fc может происходить из IgA (например, IgA1 или IgA2), IgG, IgE или IgG (например, IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4). В некоторых воплощениях домен Fc представляет собой домен Fc из IgG1. В некоторых воплощениях домен Fc из IgG1 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

В одном аспекте изобретение раскрывает молекулу полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3), обладающую одним или несколькими из следующих свойств: (a) усиленная мономерная экспрессия по сравнению с последовательностью LFA3 дикого типа, (b) пониженная мультимерная экспрессия относительно последовательности LFA3 дикого типа, (c) пониженная склонность к агрегации при тепловом стрессе по сравнению с последовательностью LFA3 дикого типа, (d) пониженная склонность к агрегации при низком pH по сравнению с последовательностью LFA3 дикого типа, (e) повышенная стабильность при замораживании-оттаивании относительно последовательности LFA3 дикого типа, (f) повышенный выход по сравнению с последовательностью LFA3 дикого типа, (g) повышенная температура плавления (T_m) по сравнению с последовательностью LFA3 дикого типа.

В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по настоящему изобретению показывает процент мономеров, превышающий около 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99%, например, при измерении с использованием эксклюзионной хроматографии (SEC) и/или способов, описанных в примере 1 с учетом фиг. 3A. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по изобретению показывает процент мономеров, который составляет более чем около 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99%, процентное содержание веществ с низкой молекулярной массой (LMWS), которые составляют менее около 10, 8, 6, 4 или 2%, и/или процентное содержание веществ с высокой молекулярной массой (HMWS), которое составляет менее около 5, 2 или 1%, например, измеренного с помощью SEC и/или способов, описанных в примере 1 с учетом фиг. 6C.

В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по изобретению показывает процентное содержание мономеров, превышающее около 90, 92 или 95% после инкубации при 37,4°C в течение 24 ч, и/или показывающий процентное содержание мономеров, превышающее около 75, 80 или 85% после инкубации при 40°C в течение 24 ч, например, при измерении с использованием SEC и/или способов, описанных в примере 1 с учетом фиг. 3D. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по настоящему изобретению показывает не более чем около 5, 10, 15 или 20% увеличения HMWS при 40°C и/или не более чем около 5, 10, 15, 20 или 25% увеличения HMWS при 50°C, например, при измерении с использованием SEC и/или способов, описанных в примере 1 с учетом табл. 4.

В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по изобретению показывает не более чем около 6, 7, 8 или 9% увеличения HMWS при низком pH в течение 5 ч, например, при измерении с использованием SEC и/или способов, описанных в примере 1 с учетом табл. 4.

В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по изобретению показывает не более чем около 0,5, 1 или 1,5% увеличения HMWS после 5 циклов замораживания-оттаивания, например, при измерении с использованием SEC и/или способов, описанных в примере 1 с учетом табл. 4.

В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по изобретению показывает не более чем около 0,5, 1, 1,5 или 2% увеличения HMMS и/или около 0,5, 1, 2, 3, 4 или 5% увеличения LMMS после 2 или 4 недель хранения при 40°C, например, при измерении с помощью капиллярного гель-электрофореза (CGE), эксклюзионной жидкостной хроматографии высокого разрешения (SE_HPLC) и/или способов, описанных в примере 3 с учетом фиг. 30A-30C и/или фиг. 31A-31D.

В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3 по изобретению показывает не более чем около 0,5, 1, 1,5 или 2% увеличения HMMS и/или около 0,5, 1 или 1,5% увеличения LMMS после 2, 4 или 6 недель хранения при 25°C, например, при измерении с использованием методов SE-HPLC, описанных в примере 3 с учетом фиг. 32A-32D.

В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3 по изобретению показывает не более чем около 0,5, 1 или 1,5% увеличения HMMS и/или около 0,5, 1 или 1,5% увеличения LMMS после 2, 4 или 6 недель хранения при 5°C, например, измеренное с помощью способов SE-HPLC, описанных в примере 3 с учетом фиг. 33A-33D.

В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по изобретению имеет выход, который составляет более чем около 5,5, 6, 6,5 или 7 мг на 20 мл культуры Expi293, например, при измерении с использованием способов, описанных в примере 1 с учетом фиг. 3B.

В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по настоящему изобретению имеет T_m, которая составляет более чем около 38, 40, 42 или 45°C, например, при измерении с помощью дифференциальной сканирующей флуорометрии (DSF) и/или с использованием способов, описанных в примере 1 со путем отсылки на фиг. 3C. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по изобретению имеет T_m, которая составляет более чем около 40, 45, 50, 55 или 60°C, например, при измерении с помощью DSF и/или с использованием способов, описанных в примере 1 с учетом фиг. 5B. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по изобретению имеет T_m, которая составляет более чем около 40, 45 или 50°C, например, при измерении с помощью DSF и/или с использованием способов, описанных в примере 1 с учетом фиг. 6D. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по изобретению имеет T_m, которая составляет более чем около 45, 50 или 55°C, например, при измерении с помощью DSF и/или с использованием способов, описанных в примере 1 с учетом фиг. 7D. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по изобретению имеет T_m, которая составляет более чем около 50 или 60°C, например, при измерении с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) и/или с использованием способов, описанных в примере 1 с учетом табл. 4.

В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по настоящему изобретению имеет T_{m1}, превышающий около 55, 58, 60, 62, 64 или 66°C, и T_{m2}, превышающий около 75, 78, 80 или 82°C при pH 7,5; T_{m1} составляет более чем около 55, 58, 60, 62 или 64°C и T_{m2} составляет более чем около 75, 78, 80 или 82°C при pH 5,8; или T_{m1} более 55, 58 или 60°C и T_{m2} составляет более чем около 75, 78 или 80°C при pH 4,5, например, при измерении с помощью DSC и/или с использованием способов, описанных в примере 4 с учетом табл. 13.

В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по изобретению имеет повышенную T_m по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, имеющую T_m, которая больше чем около 50 или 60°C при pH 7,5 или pH 4,5; имеющий T_m более чем около 50 или 62°C при pH 5,8, например, при измерении с помощью DSC и/или с использованием способов, описанных в примере 4 с учетом табл. 14,

В некоторых воплощениях домен LFA3 молекулы полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по изобретению имеет повышенную T_m по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, имеющую T_m более чем около 50 или 60°C, например, при измерении с помощью DSC и FabRICATOR IdeS и/или с использованием способов, описанных в примере 4 с учетом табл. 15.

В изобретении раскрыта молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3), которая связывается с CD2 и опосредует по меньшей мере одну детектируемую активность, выбранную из следующего: (а) связывается с клетками CD2+, например, с CD2-экспрессирующими CD4 T_{mem}-клетками или CD2-экспрессирующими CD8 T_{mem}-клетками, (b) снижает взаимодействие между CD2 и встречающимся в природе LFA3, (c) опосредует цитотоксичность против CD2-экспрессирующих клеток, например, CD2-экспрессирующих CD4 T_{mem}-клеток или CD2-экспрессирующих CD8 T_{mem}-клеток, например, в присутствии NK-клеток, (d) уменьшает количество CD4+ и/или CD8+ ТЕМ-клеток, (e) увеличивает соотношение Treg/ТЕМ, например, в CD4+ и/или CD8+ Т-клетках, (f) увеличивает соотношение Treg/ТСМ, например, в CD4+ и/или CD8+ Т-клетках (g) ингибирует аллогенный Т-клеточный ответ, например, пролиферацию Т-клеток и продуцирование цитокинов и (h) ингибирует вторичный ответ на столбнячный токсин. T_{mem}-клетки включают, например, Т-клетки центральной памяти (ТСМ) и Т-клетки эффекторной памяти (ТЕМ).

В одном из аспектов изобретение включает молекулу полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3), которая связывается с клетками, экспрессирующими CD2 человека или яванского макака с высокой очевидной аффинностью, но не связывает клетки, экспресси-

рующие CD2 грызунов. Кажущуюся аффинность связывания можно оценить с помощью проточной цитометрии для обнаружения связывания с клетками, экспрессирующими целевой белок (например, CD2). Клетки можно временно или стабильно трансфицировать нуклеиновой кислотой, кодирующей CD2. Альтернативно, клетки могут быть клетками, которые естественным образом экспрессируют CD2 на своей поверхности. Независимо от источников CD2⁺-клеток, связывание молекулы полипептида LFA3 с клетками можно легко оценить с помощью множества признанных в данной области способов. Молекула полипептида LFA3 связывает CD2 человека или яванского макака, но не обнаруживает или в гораздо меньшей степени связывает CD2 грызунов.

В одном аспекте молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по изобретению связывается с рекомбинантным CD2 человека с аффинностью, которая составляет менее 1,3, 1,2, 1,1 или 1 мкМ, например, при измерении с помощью SPR, описанным в примерах. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по изобретению связывается с рекомбинантным CD2 человека с аффинностью около 1,08 мкМ.

В одном аспекте молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по настоящему изобретению связывается с рекомбинантным CD2 яванского макака с аффинностью, которое меньше 1,4, 1,3, 1,2, 1,1 или 1 мкМ, например, при измерении с помощью SPR, описанным в примерах. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по изобретению связывается с рекомбинантным CD2 яванского макака с аффинностью около 1,06 мкМ.

В одном аспекте в настоящем документе раскрыта молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3), которая связывается с CD2-экспрессирующими клетками, например, CD4 T_{mem}-клетками, с Kd, не превышающим 100, 200, 300 или 400 пМ. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) связывается с CD2-экспрессирующими клетками, например, CD4 T_{mem}-клетками, с Kd около 94 пМ.

В одном аспекте молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по изобретению связывается с CD4 T-клетками памяти с рассчитанным IC₅₀, который не превышает около 300, 400, 500, 500, 700, 800, 1000, 1200 или 1500 пМ. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по изобретению связывается с CD4 T-клетками памяти с рассчитанным IC₅₀ около 1,18E-10 M. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по изобретению связывается с CD4 T-клетками памяти со средней рассчитанной IC₅₀ около 307 пМ.

В одном аспекте молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по изобретению связывается с CD4⁺ T_{EM}-клетками с рассчитанным значением IC₅₀, которое составляет не более чем около 150, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000 или 1200 пМ. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по изобретению связывается с CD4⁺ T_{EM}-клетками с рассчитанным значением IC₅₀ около 150 пМ.

В одном аспекте молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по изобретению связывается с CD4⁺ T_{CM}-клетками с рассчитанным значением IC₅₀, которое не превышает около 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 или 800 пМ. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по настоящему изобретению связывается с CD4⁺ T_{CM}-клетками с рассчитанным значением IC₅₀ около 110 пМ.

В одном аспекте молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по изобретению связывается с наивными CD4 T-клетками с рассчитанным значением IC₅₀, которое составляет не более чем около 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000 или 1200 пМ. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по настоящему изобретению связывается с наивными CD4 T-клетками с рассчитанным значением IC₅₀ около 1,44E-10M. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по настоящему изобретению связывается с наивными CD4 T-клетками со средним рассчитанным значением IC₅₀ около 180 пМ.

В одном аспекте молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по изобретению связывается с размноженными T_{reg}-клетками CD4 с рассчитанным значением IC₅₀, составляет не более чем около 100, 200, 300, 400 или 500 пМ. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по изобретению связывается с размноженными CD4 T_{reg} клетками с рассчитанным значением IC₅₀ около 8,54E-11M. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по настоящему изобретению связывается с размноженными CD4 T_{reg} клетками с рассчитанным значением IC₅₀ около 90 пМ.

В одном аспекте молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по изобретению связывается с CD8 T-клетками памяти с рассчитанным значением IC₅₀,

В одном аспекте изобретение обеспечивает молекулу полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3), которая опосредует цитотоксичность в отношении CD2-экспрессирующих клеток, например, CD8 T_{mem}-клеток, с EC50, составляющим не более чем около 1, 5, 10, 20, 30, 40 или 50 нМ. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по настоящему изобретению опосредует цитотоксичность в отношении CD2-экспрессирующих клеток, например, CD8 T_{mem}-клеток, с EC50 около 0,716 нМ.

В одном аспекте изобретение обеспечивает молекулу полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3), которая опосредует цитотоксичность в отношении CD2-экспрессирующих клеток, например, CD4 T_{non-mem} клеток, с EC50, составляющим не более чем около 1200, 1500, 1800, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000 пМ. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по настоящему изобретению опосредует цитотоксичность в отношении CD2-экспрессирующих клеток, например, CD4 T_{non-mem} клеток, с EC50 около 1256 пМ.

В одном аспекте изобретение обеспечивает молекулу полипептида LFA3 (например, вариантную молекулу гибридного полипептида LFA3), которая опосредует цитотоксичность в отношении CD2-экспрессирующих клеток, например, CD8 T_{non-mem} клеток, с EC50, составляющим не более чем около 1,5, 10, 20, 30, 40 или 50 нМ. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по настоящему изобретению опосредует цитотоксичность в отношении CD2-экспрессирующих клеток, например, CD8 T_{non-mem} клеток, с EC50 около 0,787 нМ.

Изобретение включает молекулу полипептида LFA3 (например, вариантную молекулу гибридного полипептида LFA3), которая связывается с CD2 и подавляет иммунный ответ, например, опосредованный Т-клетками иммунный ответ. В данной области известно множество анализов для определения ингибирования иммунного ответа, например, иммунного ответа, опосредованного Т-клетками. Одним из таких анализов является анализ реакции смешанных лимфоцитов (MLR), описанный в примерах. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по настоящему изобретению может ингибировать аллогенный ответ с IC50, который не превышает около 400, 800, 1200, 1600, 2000 или 2400 пМ. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по настоящему изобретению может ингибировать аллогенный ответ с IC50 около 302 пМ. Другой анализ представляет собой анализ вторичного ответа на столбнячный токсин, описанный в примерах. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по настоящему изобретению может ингибировать выработку IFN γ CD4 Т-клетками памяти в анализе вторичного ответа на столбнячный токсин с IC50, который составляет не более чем около 5, 10, 15, 20 или 25 нМ. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) по настоящему изобретению может ингибировать продукцию IFN γ CD4 Т-клетками памяти в анализе ответа на реакцию на столбнячный токсин с IC50 около 1,342 нМ.

В одном аспекте изобретение обеспечивает молекулу полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3), которая показывает клиренс из центрального объема, который составляет не более 0,14, 0,16, 0,18, 0,2 или 0,22 мл/час/кг, например, измеренное с помощью способов, описанных в примере 2 с учетом табл. 11. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) демонстрирует клиренс из центрального объема, который составляет около 0,11 мл/час/кг.

В одном аспекте изобретение обеспечивает молекулу полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3), которая демонстрирует повышенную чистоту по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, чистоту, по меньшей мере около 98% или 99% при измерении с помощью капиллярного гель-электрофореза. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) имеет чистоту около 99%.

В одном аспекте изобретение обеспечивает молекулу полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3), которая демонстрирует уменьшенную модификацию сиаловой кислоты по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, чистоту не более чем около 20, 18, 16, 14, 12, 10, 9, 8 или 7 нмоль сиаловой кислоты/нмоль полипептида при измерении с помощью капиллярного гель-электрофореза. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) содержит около 14 нмоль сиаловой кислоты/нмоль полипептида. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3) содержит около 9 нмоль сиаловой кислоты/нмоль полипептида.

Изобретение охватывает молекулу полипептида LFA3 (например, вариантная молекула гибридного полипептида LFA3), которая проявляет, по меньшей мере, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более, например, все выше обсуждаемые биологические активности.

III. Экспрессия и продуцирование молекулы полипептида LFA3.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие молекулы полипептида LFA3.

Изобретение также относится к полинуклеотидам, кодирующим любую из описанных в данном документе полипептидных молекул. В изобретении также предлагается способ получения любого из полинуклеотидов, описанных в данном документе. Полинуклеотиды можно получить и экспрессировать способами, известными в данной области.

Последовательность желаемой молекулы полипептида и нуклеиновой кислоты, кодирующей такую молекулу полипептида или ее часть, можно определить с использованием стандартных методов секвенирования. Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая искомую молекулу полипептида, может быть вставлена в различные векторы (такие как векторы для клонирования и экспрессии) для получения и характеристики рекомбинантных белков.

В одном аспекте изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим любой из следующих полипептидов, раскрытых в данном документе: изоформа 1 LFA3 человека, домен 1 изоформы 1 LFA3 человека, LFA3-Fc WT, LFA3-Pfe WT, IgG2 Fc человека, M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, d1, d3, M1d1, M1d3, M4d1, M7d1, CM1d1, CM2d1, CM3d1, CM4d1, CM5d1, CM6d1, ML1d1, ML2d1, ML3d1, ML4d1, ML5d1, ML1d1 и L6d1. В некоторых воплощениях полинуклеотид, кодирующий приведенную выше аминокислотную последовательность, кодирует аминокислотную последовательность по меньшей мере на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% и более, причем предпочтительно кодируемая аминокислотная последовательность идентична аминокислотной последовательности молекулы полипептида, раскрытой в данном документе.

Изобретение относится к полинуклеотидам, кодирующим один или несколько белков, содержащих аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 15-41, 69, 120 и 128. В некоторых воплощениях полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность, кодирует аминокислотную последовательность по меньшей мере на 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% и более, предпочтительно кодируемая аминокислотная последовательность идентична аминокислотной последовательности из SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 16 и 69.

Изобретение относится к полинуклеотидам, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42-68 и 122-127. В изобретении предлагается полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, указанную в SEQ ID NO: 44. В изобретении предлагается полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, указанную в SEQ ID NO: 53. В изобретении предлагается полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, указанную в SEQ ID NO: 122. В изобретении предлагается полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, указанную в SEQ ID NO: 123. В изобретении предлагается полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, указанную в SEQ ID NO: 43. В изобретении предлагается полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, указанную в SEQ ID NO: 43 и 53.

В изобретении предлагаются клетки, содержащие одну или несколько молекул нуклеиновых кислот, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 42-68 и 122-127. В изобретении предлагаются клетки, содержащие полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, указанную в SEQ ID NO: 44. В изобретении предлагаются клетки, содержащие полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, указанную в SEQ ID NO: 53. В изобретении предлагаются клетки, содержащие полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, указанную в SEQ ID NO: 122. В изобретении предлагаются клетки, содержащие полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, указанную в SEQ ID NO: 123. В изобретении предлагаются клетки, содержащие полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, указанную в SEQ ID NO: 43. В изобретении предлагаются клетки, содержащие полинуклеотид, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, указанную в SEQ ID NO: 43 и 53.

В другом аспекте изобретение относится к полинуклеотидам и их вариантам, кодирующим молекулы полипептида LFA3, где такие вариантные полинуклеотиды составляют, по меньшей мере, 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с любой из конкретных последовательностей нуклеиновых кислот, раскрытых в данном документе. В некоторых воплощениях изобретение обеспечивает полинуклеотиды и их варианты, кодирующие молекулы полипептида LFA3, где такие вариантные полинуклеотиды составляют, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или, по меньшей мере 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 123 или SEQ ID NO: 43 и 53. Эти величины не предназначены для ограничения, и приращения между указанными процентными значениями специально предусмотрены как часть раскрытия.

Изобретение относится к полипептидам, кодируемым описанными в данном документе молекулами нуклеиновых кислот.

Полинуклеотиды, комплементарные любым таким последовательностям, также охватываются настоящим раскрытием. Полинуклеотиды могут быть одноцепочечными (кодирующими или антисмысловыми) или двухцепочечными и могут быть молекулами ДНК (геномной, кДНК или синтетической) или РНК. Молекулы РНК включают молекулы HnRNA, которые содержат интроны и соответствуют молекуле ДНК однозначно, и молекулы мРНК, которые не содержат интронов. Дополнительные кодирующие или некодирующие последовательности могут, но не обязательно, присутствовать в полинуклеотиде по настоящему изобретению, и полинуклеотид может быть, но не обязательно, связан с другими молекулами и/или материалами носителя.

Полинуклеотиды могут содержать нативную последовательность (т.е. эндогенную последовательность, кодирующую молекулу полипептида) или могут содержать вариант такой последовательности. Варианты полинуклеотидов содержат одну или несколько замен, добавлений, делеций и/или вставок, так что иммунореактивность кодируемого полипептида не снижается по сравнению с нативной иммунореактивной молекулой. Влияние на иммунореактивность кодируемого полипептида обычно можно оценить, как описано в данном документе. В некоторых воплощениях варианты демонстрируют идентичность по меньшей мере около 70%, в некоторых воплощениях идентичность по меньшей мере около 80%, в некоторых воплощениях идентичность по меньшей мере около 90% и в некоторых воплощениях, по меньшей мере около 95% идентичности с полинуклеотидной последовательностью, которая кодирует молекулу нативного полипептида. Эти величины не предназначены для ограничения, и приращения между указанными процентными значениями специально предусмотрены как часть раскрытия.

Две полинуклеотидные или полипептидные последовательности называются "идентичными", если последовательность нуклеотидов или аминокислот в двух последовательностях одинакова при выравнивании для максимального соответствия, как описано ниже. Сравнения двух последовательностей обычно выполняются путем сравнения последовательностей в окне сравнения для идентификации и сравнения локальных областей сходства последовательностей. "Окно сравнения", используемое в данном документе, относится к сегменту из по меньшей мере около 20 смежных положений, обычно от 30 до около 75 или от 40 до около 50, в котором последовательность может сравниваться с эталонной последовательностью с таким же количеством смежных позиций после оптимального выравнивания двух последовательностей.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения может быть проведено с использованием программы MegAlign® в пакете Lasergene® программного обеспечения для биоинформатики (DNASTAR®, Inc., Мэдисон, Висконсин) с использованием параметров по умолчанию. Эта программа воплощает несколько схем выравнивания, описанных в следующих источниках: Dayhoff, M.O., 1978, A model of evolutionary change in proteins - Matrices for detecting distant relationships. In Dayhoff, M.O. (ed.) Atlas of Protein Sequence and Structure, National Biomedical Research Foundation, Washington DC Vol. 5, Suppl. 3, pp. 345-358; Hein J, 1990, Unified Approach to Alignment and Phylogenies pp. 626-645 Methods in Enzymology vol. 183, Academic Press, Inc., San Diego, CA; Higgins, D.G. and Sharp, P.M., 1989, CABIOS 5:151-153; Myers, E.W. and Muller W., 1988, CABIOS 4:11-17; Robinson, E.D., 1971, Comb. Theor. 11:105; Santou, N., Nes, M., 1987, Mol. Biol. Evol. 4:406-425; Sneath, P.H.A. and Sokal, R.R., 1973, Numerical Taxonomy the Principles and Practice of Numerical Taxonomy, Freeman Press, San Francisco, CA; Wilbur, W.J. and Lipman, D.J., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:726-730.

В некоторых воплощениях "процент идентичности последовательностей" определяется путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения по меньшей мере из 20 положений, где часть полинуклеотидной или полипептидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления или делеции (т.е. пробелы) в количестве 20 процентов или менее, обычно от 5 до 15 процентов или от 10 до 12 процентов по сравнению с контрольными последовательностями (которые не содержат добавлений или делеций) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент рассчитывается путем определения количества положений, в которых идентичные основания нуклеиновых кислот или аминокислотные остатки встречаются в обеих последовательностях, чтобы получить количество совпадающих положений, путем деления количества совпадающих положений на общее количество положений в контрольной последовательности (т.е. размер окна) и умножение результатов на 100, чтобы получить процент идентичности последовательностей.

Варианты также или альтернативно могут быть по существу гомологичными нативному гену или его части, или комплементу. Такие варианты полинуклеотидов способны гибридизоваться в умеренно жестких условиях с природной последовательностью ДНК, кодирующей молекулу природного полипептида.

Подходящие "умеренно жесткие условия" включают предварительную промывку в растворе с 5X стандартным солевым раствором (SSC), 0,5% додецилсульфатов натрия (SDS), 1,0 mM EDTK (pH 8,0); гибридизация при 50°C-65°C, 5X SSC, в течение ночи; с последующей двукратной промывкой при 65°C в течение 20 мин каждым из 2X, 0,5X и 0,2X SSC, содержащим 0,1% SDS.

В контексте настоящего описания "очень жесткие условия" или "условия высокой жесткости" означают такие, при которых: (1) для промывки используются низкая ионная сила и высокая температура, например, 0,015 М хлорид натрия/0,0015 М цитрат натрия/0,1% додецилсульфат натрия при 50°C; (2) во время гибридизации используется денатурирующий агент, такой как формамид, например, 50% (об./об.) формамид с 0,1% бычьего сывороточного альбумина/0,1% фиколла/0,1% поливинилпирролидона/50 мМ натрий-фосфатного буфера при pH 6,5 с 750 мМ хлорид натрия, 75 мМ цитрат натрия при 42°C; или (3) используются 50% формамид, 5X SSC (0,75 М NaCl, 0,075 М цитрат натрия), 50 мМ фосфат натрия (pH 6,8), 0,1% пиродифосфат натрия, 5X раствор Денхардта, обработанная ультразвуком ДНК сперма лосося (50 мкг/мл), 0,1% SDS и 10% сульфат декстрана при 42°C, с промывками при 42°C в 0,2X SSC (хлорид натрия/цитрат натрия) и 50% формамид при 55°C, с последующей промывкой высокой жесткости, состоящей из 0,1X SSC, содержащий ЕДТК, при 55°C. Квалифицированный специалист поймет, как регулировать температуру, ионную силу и т.д., если необходимо, с учетом таких факторов, как длина зонда и т.п.

Специалистам в данной области будет понятно, что в результате вырожденности генетического кода существует множество нуклеотидных последовательностей, которые кодируют полипептид, как описано в данном документе. Некоторые из этих полинуклеотидов имеют минимальную гомологию с нуклеотидной последовательностью любого природного гена. Тем не менее, полинуклеотиды, которые различаются из-за различий в использовании кодонов, конкретно рассматриваются в настоящем раскрытии. Кроме того, аллели генов, содержащих представленные в данном документе полинуклеотидные последовательности, находятся в пределах объема настоящего раскрытия. Аллели представляет собой эндогенные гены, которые изменяются в результате одной или нескольких мутаций, таких как делеции, добавления и/или замены нуклеотидов. Полученные мРНК и белок могут, но не обязательно, иметь измененную структуру или функцию. Аллели можно идентифицировать с использованием стандартных методов (таких как гибридизация, амплификация и/или сравнение последовательностей в базе данных).

Полинуклеотиды этого раскрытия могут быть получены с использованием химического синтеза, рекомбинантных методов или ПЦР. Способы химического синтеза полинуклеотидов хорошо известны в данной области и не нуждаются в подробном описании в данном документе. Специалист в данной области может использовать представленные в данном документе последовательности и коммерческий синтезатор ДНК для получения желаемой последовательности ДНК.

Для получения полинуклеотидов с использованием рекомбинантных методов полинуклеотид, содержащий искомую последовательность, может быть вставлен в подходящий вектор, и вектор, в свою очередь, может быть введен в подходящую клетку-хозяин для репликации и амплификации, как дополнительно обсуждается в данном документе. Полинуклеотиды можно вставлять в клетки-хозяева любыми способами, известными в данной области. Клетки трансформируются путем введения экзогенного полинуклеотида путем прямого захвата, эндоцитоза, трансфекции, F-спаривания или электропорации. После введения экзогенный полинуклеотид может сохраняться в клетке в виде неинтегрированного вектора (такого как плазида) или интегрироваться в геном клетки-хозяина. Амплифицированный таким образом полинуклеотид можно выделить из клетки-хозяина способами, хорошо известными в данной области; см., например, Sambrook et al., 1989.

В качестве альтернативы ПЦР позволяет воспроизводить последовательности ДНК. Технология ПЦР хорошо известна в данной области и описана в патенте США № 4683195, 4800159, 4754065 и 4683202, а также ПЦР: полимеразная цепная реакция, Mullis et al. ред., Birkauser Press, Бостон, 1994.

РНК можно получить, используя выделенную ДНК в соответствующем векторе и вставляя ее в подходящую клетку-хозяин. Когда клетка реплицируется и ДНК транскрибируется в РНК, эта РНК может быть затем выделена с использованием методов, хорошо известных специалистам в данной области, как, например, изложено в Sambrook et al., 1989.

В некоторых воплощениях первый вектор содержит полинуклеотид, который кодирует полипептид LFA3, например, M1d1, а второй вектор содержит полинуклеотид, который кодирует область Fc тяжелой цепи, например, из IgG1. В некоторых воплощениях первый вектор и второй вектор трансфицируют в клетки-хозяева в аналогичных количествах (таких как аналогичные молярные количества или аналогичные массовые количества). В некоторых воплощениях первый вектор и второй вектор трансфицируют в клетки-хозяева в молярном или массовом соотношении между 5: 1 и 1: 5. В некоторых воплощениях вектор, кодирующий полипептид LFA3, например, M1d1, и вектор, кодирующий домен Fc тяжелой цепи, например, из IgG1, используют в массовом соотношении от 1: 1 до 1: 5 для. В некоторых воплощениях изобретения вектор, кодирующий полипептид LFA3, например, M1d1, и вектор, кодирующий Fc тяжелой цепи, например, из IgG1, используют в массовом соотношении 1:2.

Векторы.

В некоторых воплощениях выбирают вектор, который оптимизирован для экспрессии полипептидов в клетках, происходящих из CHO или CHO, или в клетках NSO. Примеры таких векторов описаны, например, в Running Deer et al., *Biotechnol. Prog.* 20: 880-889 (2004).

Подходящие векторы для клонирования и экспрессии могут включать множество компонентов, таких как промотор, энхансер и другие последовательности, регулирующие транскрипцию. Вектор также

может быть сконструирован для последующего клонирования варибельного домена антитела в разные векторы. Подходящие клонирующие векторы могут быть сконструированы согласно стандартным методикам или могут быть выбраны из большого числа клонирующих векторов, доступных в данной области. Хотя выбранный вектор клонирования может варьироваться в зависимости от клетки-хозяина, которую предполагается использовать, полезные векторы клонирования, как правило, будут обладать способностью к саморепликации, могут иметь единственную мишень для конкретной эндонуклеазы рестрикции и/или могут нести гены маркера, которые можно использовать при выборе клонов, содержащих вектор. Подходящие примеры включают плазмиды и бактериальные вирусы, например, pUC18, pUC19, Bluescript (например, pBS SK+) и его производные, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, фаговые ДНК и челночные векторы, такие как pSA3 и pAT28. Эти и многие другие векторы клонирования доступны от коммерческих поставщиков, таких как BioRad, Strategene и Invitrogen. Также представлены экспрессирующие векторы. Экспрессирующие векторы обычно представляют собой реплицируемые полинуклеотидные конструкции, которые содержат полинуклеотид в соответствии с описанием. Подразумевается, что экспрессирующий вектор должен быть способен реплицироваться в клетках-хозяевах либо в виде эписом, либо в виде интегрированной части хромосомной ДНК. Подходящие экспрессирующие векторы включают, без ограничения указанным, плазмиды, вирусные векторы, включая аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, ретровирусы, космиды и экспрессирующий(ие) вектор(ы), раскрытые в публикации РСТ № WO 87/04462. Компоненты вектора, как правило, могут включать, без ограничения указанным, одно или более из следующего: сигнальную последовательность, источник репликации, один или более маркерных генов, подходящие элементы, контролирующие транскрипцию (такие как промоторы, энхансеры и терминатор). Для экспрессии (т.е. трансляции) также обычно требуются один или несколько элементов, контролирующих трансляцию, таких как сайты связывания рибосом, сайты инициации трансляции и стоп-кодона.

Векторы, содержащие интересующие полинуклеотиды и/или сами полинуклеотиды, могут быть введены в клетку-хозяина любым из ряда подходящих способов, включая электропорацию, трансфекцию с использованием хлорида кальция, хлорида рубидия, фосфата кальция, DEAE-декстрана или других веществ, бомбардировку микрочастицами, липофекцию и инфицирование (например, когда вектор представляет собой инфекционный агент, такой как вирус осповакцины). Выбор векторов для введения или полинуклеотидов часто будет зависеть от особенностей клетки-хозяина.

Клетки-хозяева.

Молекула полипептида LFA3 может быть получена рекомбинантно с использованием подходящей клетки-хозяина. Чтобы обеспечить синтез молекулы полипептида LFA3 в рекомбинантной клетке-хозяине, нуклеиновая кислота, кодирующая молекулу полипептида LFA3, может быть клонирована в экспрессирующий вектор, который затем может быть введен в клетку-хозяин, такую как клетка *E. coli*, клетка дрожжей, клетка насекомого, клетка COS обезьяны, клетка яичников китайского хомячка (CHO) или миеломная клетка, которые не продуцируют белок иммуноглобулина другим способом. Предпочтительные клетки-хозяева включают клетку CHO, клетку почек эмбриона человека HEK-293 или клетку Sp2.0 среди многих клеток, хорошо известных в данной области. Способы химического синтеза белков и пептидов известны в данной области и коммерчески доступны.

В различных воплощениях молекула полипептида LFA3 может экспрессироваться в прокариотических клетках, таких как бактериальные клетки; или в эукариотических клетках, таких как клетки грибов (таких как дрожжи), клетки растений, клетки насекомых и клетки млекопитающих. Такая экспрессия может осуществляться, например, согласно процедурам, известным в данной области. Примеры эукариотических клеток, которые можно использовать для экспрессии полипептидов, включают, без ограничения указанным, клетки COS, включая клетки COS 7, клетки 293, включая клетки 293-6E и Expi293, клетки CHO, включая CHO-S, DG44, клетки Lecl3 CHO, клетки ExpiCHO и FUT8 CHO, клетки PER.C6® (Stucell) и клетки HCO. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 может экспрессироваться в дрожжах; см., например, публикацию No. US 2006/0270045 A1. В некоторых воплощениях конкретная эукариотическая клетка-хозяин выбирается на основе ее способности производить желаемые посттрансляционные модификации молекулы полипептида LFA3. Например, в некоторых воплощениях клетки CHO продуцируют полипептиды, которые имеют более высокий уровень сиаилирования, чем тот же полипептид, продуцируемый в клетках 293.

Введение одной или нескольких нуклеиновых кислот в искомую клетку-хозяина может быть выполнено любым способом, включая, помимо прочего, трансфекцию с помощью фосфата кальция, трансфекцию, опосредованную DEAE-декстраном, трансфекцию, опосредованную катионными липидами, электропорацию, трансдукцию, инфицирование и т.д. Неограничивающие иллюстративные методы описаны, например, в Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001). Нуклеиновые кислоты можно временно или стабильно трансфицировать в желаемые клетки-хозяева любым подходящим способом.

Молекулы полипептида LFA3 можно очистить любым подходящим способом. Такие методы включают, без ограничения указанным, использование аффинных матриц или хроматографии гидрофобного взаимодействия, например, с помощью протеина А, протеина G или протеина A/G. Гидрофобная инте-

рактивная хроматография, например, на бутильной или фенильной колонке, также может подходить для очистки некоторых полипептидов. Многие способы очистки полипептидов известны в данной области.

В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 продуцируется в бесклеточной системе. Неограничивающие примеры бесклеточных систем описаны, например, в Sitaraman et al., *Methods Mol. Biol.* 498: 229-44 (2009); Spirin, *Trends Biotechnol.* 22: 538-45 (2004); Endo et al., *Biotechnol. Adv.* 21: 695-713 (2003).

IV. Использование и медицинские методы лечения.

В некоторых аспектах изобретение относится к терапевтическим способам с использованием молекулы полипептида LFA3, где терапевтические методы включают введение терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей молекулу полипептида LFA3.

Подходящие заболевания, расстройства или состояния включают, помимо прочего, диабет I типа, псориаз, пятнистый псориаз, пальмоплантарный пустулез, пустулезный псориаз ладоней и ступней, ладонно-подошвенный пустулез, пустулез ладоней и ступней, атопический дерматит, красный плоский лишай, болезнь трансплантат против хозяина (GVHD), витилиго, красный волосистый педириаз, трансплантация (например, трансплантация органов, например, трансплантация почки), псориазический артрит, заболевание, расстройство или состояние, требующее аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, талассемию, серповидноклеточную анемию, тромбастению Гланцмана, синдром Вискотта-Олдрича, хроническую гранулематозную болезнь, тяжелую врожденную нейтропению, недостаточность адгезии лейкоцитов, синдром Швахмана-Даймонда, анемию Даймонда-Блэкфана, анемию Фанкони, врожденный дискератоз, синдром Чедиака-Хигаши, апластическую анемию, очаговую алопецию и Т-клеточную лимфому (например, кожную Т-клеточную лимфому или периферическую Т-клеточную неходжкинскую лимфому).

Дополнительные заболевания, расстройства или состояния включают, без ограничения указанным, сахарный диабет (например, сахарный диабет I типа или инсулинозависимый сахарный диабет), ювенильный диабет, воспалительные реакции, такие как воспалительные кожные заболевания, включая псориаз и дерматит (например, атопический дерматит), дерматомиозит, системную склеродермию и склероз, реакции, связанные с воспалительным заболеванием кишечника (такими как болезнь Крона и язвенный колит), респираторный дистресс-синдром (включая респираторный дистресс-синдром взрослых, ARDS), дерматит, менингит, энцефалит, увеит, колит, гастрит, гломерулонефрит, аллергические состояния, такие как экзема и астма, и другие состояния, включающие инфильтрацию Т-клеток и хронические воспалительные реакции, атеросклероз, недостаточность адгезии лейкоцитов, ревматоидный артрит, системную красную волчанку (SLE), рассеянный склероз, синдром Рейно, аутоиммунный тиреоидит, аллергический энцефаломиелит, синдром Шегрена, и иммунные ответы, связанные с острой и замедленной гиперчувствительностью, опосредованной цитокинами и Т-лимфоцитами, обычно обнаруживаемыми при туберкулезе, саркоидозе, полимиозите, гранулематозе и васкулите, болезнь Вегенера, злокачественную анемию (болезнь Аддисона), заболевания, сопровождающиеся диапедезом лейкоцитов, воспалительное заболевание центральной нервной системы (ЦНС), синдром полиорганной травмы, гемолитическую анемию (включая, помимо прочего, криоглобинемию или анемию Кумбса), миастению, заболевания, опосредованные комплексом антиген-антитело, легочный гемосидероз с гломерулонефритом, антифосфолипидный синдром, аллергический неврит, болезнь Грейвса, миастенический синдром Ламберта-Итона, пемфигоид буллезный, пузырчатку, аутоиммунные полиэндокринопатии, витилиго, болезнь Рейтера, синдром скованного человека, болезнь Беше, гигантоклеточный артериит, иммунокомплексный нефрит, нефропатию IgA, полинейропатию IgM, иммунную тромбоцитопеническую пурпуру (ITP) или аутоиммунную тромбоцитопению и аутоиммунные гемолитические заболевания, тиреоидит Хашимото, аутоиммунный гепатит, аутоиммунную гемофилию, аутоиммунный лимфопролиферативный синдром (ALPS), аутоиммунный увеоретинит, синдром Гийена-Барре, синдром Гудпасчера, смешанное заболевание соединительной ткани, бесплодие, связанное с аутоиммунным заболеванием, узелковый полиартериит, очаговую алопецию, идиопатическую микседему, болезнь трансплантат против хозяина, мышечную дистрофию (Дюшенна, Беккера, миотоническая, конечностно-поясная, лицево-плечевая, врожденная, окулофарингеальная, дистальная, Эмери-Дрейфуса), и воспалительное неиммунное заболевание, такое как болезнь сердца или болезнь мозга.

Молекулы полипептида LFA3 по настоящему изобретению также можно использовать для обнаружения и/или измерения клеток, экспрессирующих CD2 или CD2, в образце, например, для диагностических целей. Например, молекула полипептида LFA3 может использоваться для диагностики состояния или заболевания, характеризующегося aberrантной экспрессией (например, избыточной экспрессией, недостаточной экспрессией, отсутствием экспрессии и т.д.) CD2. Иллюстративные диагностические анализы на CD2 могут включать, например, контакт образца, полученного от пациента, с молекулой полипептида LFA3 по изобретению, где молекула полипептида LFA3 помечена детектируемой меткой или репортерной молекулой.

Используемые в данном документе термины "фармацевтически приемлемый носитель" или "фармацевтически приемлемый эксципиент" включают любой материал, который в сочетании с активным ингредиентом позволяет ингредиенту сохранять биологическую активность и не реагирует с иммунной

системой объекта. Примеры включают, без ограничения указанным, любые стандартные фармацевтические носители, такие как фосфатно-солевой буферный раствор, буферный солевой раствор ГЭПЭС (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновой кислоты), вода, эмульсии, такие как эмульсия масла в воде, и различные типы смачивающих веществ. Предпочтительными разбавителями для аэрозольного или парентерального введения являются фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ) или нормальный (0,9%) физиологический раствор. Композиции, содержащие такие носители, получают с помощью хорошо известных традиционных способов (см., например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990; and Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 20th Ed., Mack Publishing, 2000).

V. Композиции.

В описании также представлены фармацевтические композиции, содержащие эффективное количество молекулы полипептида LFA3, описанного в данном документе. Примеры таких композиций, а также способы их приготовления также описаны в данном документе. В некоторых воплощениях композиция содержит одну или несколько молекул полипептида LFA3.

Композиция, используемая в настоящем описании, может дополнительно включать фармацевтически приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы (Remington: The Science and Practice of Pharmacy 20th Ed., 2000, Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K.E. Hoover), в виде лиофилизированных составов или водных растворов. Приемлемые носители, наполнители или стабилизаторы нетоксичны для реципиентов в рекомендуемых дозировках и концентрациях и могут включать буферы, такие как фосфатный, цитратный, ГЭПЭС и буферы на основе других органических кислот. В некоторых воплощениях композиции, содержащие полипептиды LFA3, представленные в настоящем документе, например, LFA3-Fc M1d1, включают забуференный с помощью ГЭПЭС физиологический раствор. В некоторых воплощениях концентрация буфера ГЭПЭС составляет около 10 мМ, около 20 мМ, около 30 мМ, около 40 мМ, около 50 мМ, около 60 мМ, около 70 мМ, около 80 мМ, около 90 мМ, около 100 мМ. В некоторых воплощениях концентрация буфера ГЭПЭС составляет 20 мМ. Дополнительные приемлемые носители, наполнители или стабилизаторы включают антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин, консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония, хлорид гексаметония, хлорид бензалкония, хлорид бензетония, фенол, бутиловый или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метилилпропилпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол и м-крезол), полипептиды с низкой молекулярной массой (менее около 10 остатков), белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины, гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон, аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин, моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстраны, хелатирующие агенты, такие как ЕДТК, сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбитол, солеобразующие противоионы, такие как натрий, комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок), и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (PEG). Далее в данном документе описаны фармацевтически приемлемые наполнители.

Молекулы полипептида LFA3 и их композиции также можно использовать в сочетании с другими агентами, которые служат для усиления и/или дополнения эффективности агентов.

В описании изобретения также представлены композиции, включая фармацевтические композиции, содержащие любой из раскрытых полинуклеотидов. В некоторых воплощениях композиция содержит экспрессирующий вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий молекулу полипептида LFA3, как описано в данном документе. В других воплощениях композиция содержит экспрессирующий вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий любую из молекул полипептида LFA3, описанных в данном документе.

Раскрытые фармацевтические композиции также можно вводить в составе комбинированной терапии, например, в сочетании с другими агентами. Например, комбинированная терапия может включать молекулу полипептида LFA3 по настоящему изобретению в сочетании, по меньшей мере, с одним другим лечением, при этом терапия может представлять собой хирургическое вмешательство, иммунотерапию или лекарственную терапию.

Фармацевтические соединения по настоящему описанию могут включать одну или несколько фармацевтически приемлемых солей. Примеры таких солей включают соли присоединения кислоты и соли присоединения основания. Соли присоединения кислоты включает те из них которые получаются из нетоксичных неорганических кислот, таких как соляная, азотная, фосфорная, серная, бромоводородная, йодистоводородная, ортофосфористая и т.п., а также из нетоксичных органических кислот таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, фенилзамещенные алкановые кислоты, гидроксикалановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфокислоты и т.п. Соли присоединения оснований включают соли, полученные из щелочноземельных металлов, таких как натрий, калий, магний, кальций и т.п., а также из нетоксичных органических аминов, таких как N, N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, новокаин и т.п.

Раскрытая фармацевтическая композиция также может включать фармацевтически приемлемый ан-

тиоксидант. Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.; (2) маслорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбил пальмитат, бутилоксианизол, бутилокситолуол, лецитин, пропил галлат, альфа-токоферол и т.п.; и (3) хелатирующие металлы агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЕДТК), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые могут быть использованы в фармацевтических композициях по настоящему изобретению, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло и сложные органические эфиры для инъекций, такие как этилолеат. Правильная текучесть может поддерживаться, например, с помощью применения покрывающих материалов, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий, и с помощью использования поверхностно-активных веществ.

Эти композиции могут также содержать адьюванты, такие как консерванты, смачивающие средства, эмульгаторы и диспергирующие агенты. Предотвращение присутствия микроорганизмов может быть обеспечено как процедурами стерилизации, так и включением различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и т.п. Также может потребоваться включение в композиции изотонических агентов, таких как сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, пролонгированная абсорбция инъекционной фармацевтической формы может быть достигнута путем включения агентов, которые замедляют абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Фармацевтические композиции обычно должны быть стерильными и стабильными в условиях производства и хранения. Рецепт композиции может быть составлен в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или других упорядоченных структур подходящих для высоких концентраций лекарственных веществ. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль, и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их подходящие смеси. Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования поверхностно-активных веществ. Во многих случаях целесообразно включить в композицию изотонические агенты, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть вызвана в том числе включением в композицию средства для замедления абсорбции, например, солей моностеарата и желатина.

Стерильные инъекционные растворы могут быть приготовлены путем включения активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или с комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости с последующей стерилизацией микрофильтрацией.

В общем, дисперсии готовят путем введения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсную среду и другие требуемые ингредиенты из тех, что перечислены выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов, предпочтительными способами приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), которые позволяют получить порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный требуемый ингредиент из его предварительно стерильно фильтрованного раствора.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть приготовлена, упакована или продана в составе, подходящем для офтальмологического введения. Такие составы могут быть, например, в форме глазных капель, включая, например, 0,1%-1,0% (мас./мас.) раствор или суспензию активного ингредиента в водном или масляном жидком носителе. Такие капли могут дополнительно содержать буферные агенты, соли или один или несколько других дополнительных ингредиентов, описанных в данном документе. Другие пригодные для офтальмологического введения составы включают те, которые содержат активный ингредиент в микрокристаллической форме или в липосомальном препарате.

В контексте настоящего описания "дополнительные ингредиенты" включают, без ограничения указанным, один или несколько из следующих: наполнители; поверхностно-активные вещества; диспергирующие агенты; инертные разбавители; гранулирующие и дезинтегрирующие агенты; связующие агенты; смазывающие агенты; подсластители; ароматизаторы; красители; консерванты; физиологически разлагаемые композиции, такие как желатин; водные носители и растворители; масляные носители и растворители; суспендирующие агенты; диспергирующие или смачивающие агенты; эмульгаторы, успокаивающие средства; буферы; соли; загустители; наполнители; эмульгаторы; антиоксиданты; антибиотики; противогрибные средства; стабилизирующие агенты; и фармацевтически приемлемые полимерные или гидрофобные материалы. Другие "дополнительные ингредиенты", которые могут быть включены в фармацевтические композиции по настоящему описанию, известны в данной области и описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, Genaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1985), которая является включена сюда путем отсылки.

В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 по настоящему изобретению может быть приготовлена для подкожной инъекции. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 по настоящему изобретению может быть приготовлена для внутримышечной инъекции.

В некоторых воплощениях полипептид LFA3, например, LFA3-Fc M1d1, составлен в концентрации около 0,01-2,0 мг/мл. В некоторых воплощениях полипептид LFA3, например, LFA3-Fc M1d1, представляет собой состав с концентрацией около 0,01, около 0,02, около 0,05, около 0,1, около 0,2, около 0,3, около 0,4, около 0,5, около 0,6, около 0,7, около 0,8, около 0,9, около 1,0, около 1,2, около 1,5, около 1,8 или около 2,0 мг/мл. В некоторых воплощениях полипептид LFA3, например, LFA3-Fc M1d1, составлен в концентрации около 0,015 мг/мл. В некоторых воплощениях полипептид LFA3, например, LFA3-Fc M1d1, составлен в концентрации около 0,15 мг/мл. В некоторых воплощениях полипептид LFA3, например, LFA3-Fc M1d1, составлен в концентрации около 1,5 мг/мл. В некоторых воплощениях полипептид LFA3, например, LFA3-Fc M1d1, составлен в концентрации около 10, около 20, около 30, около 40 или около 50 мг/мл.

В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 по настоящему изобретению может быть составлена в виде дозы около 0,2-8 мг на инъекцию (например, 0,2, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5 или 8 мг на инъекцию), например, 0,22-7,5 мг на инъекцию. В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 по настоящему изобретению может быть приготовлена в виде около 0,5-1,5 мл раствора на инъекцию (например, 0,5, 1 или 1,5 мл раствора на инъекцию), например, около 1 мл раствора на инъекцию.

Составы фармацевтических композиций, описанные в данном документе, могут быть получены любым способом, известным или разработанным в дальнейшем в области фармакологии. Как правило, такие подготовительные методы включают стадию объединения активного ингредиента с носителем или одним, или несколькими другими вспомогательными ингредиентами, а затем, если необходимо или желательно, формирование или упаковку продукта в искомую однократную или многодозовую единицу.

В одном воплощении композиции по раскрытию представляют собой апирогенные композиции, которые по существу не содержат эндотоксинов и/или родственных пирогенных веществ. Эндотоксины включают токсины, которые содержатся внутри микроорганизма и высвобождаются, когда микроорганизмы разрушаются или умирают. Пирогенные вещества также включают вызывающие лихорадку термостабильные вещества (гликопротеины) из внешней мембраны бактерий и других микроорганизмов. Оба эти вещества могут вызвать жар, гипотонию и шок при введении людям. Из-за потенциальных вредных эффектов полезно удалять даже небольшие количества эндотоксинов из растворов фармацевтических препаратов, вводимых внутривенно. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов ("FDA") установило верхний предел в 5 единиц эндотоксина (ЕЭ) на дозу на килограмм массы тела за один час для внутривенного введения лекарств (Фармакопейная конвенция США, Фармакопейный форум 26 (1): 223 (2000)). Когда терапевтические белки вводятся в количестве нескольких сотен или тысяч миллиграммов на килограмм веса тела, полезно удалять даже следовые количества эндотоксина. В одном воплощении уровни эндотоксина и пирогена в композиции составляют менее 10 ЕЭ/мг, или менее 5 ЕЭ/мг, или менее 1 ЕЭ/мг, или менее 0,1 ЕЭ/мг, или менее 0,01 ЕЭ/мг, или менее 0,001 ЕЭ/мг. В другом воплощении уровни эндотоксина и пирогена в композиции составляют менее около 10 ЕЭ/мг, или менее около 5 ЕЭ/мг, или менее около 1 ЕЭ/мг, или менее около 0,1 ЕЭ/мг, или менее чем около 0,01 ЕЭ/мг или менее около 0,001 ЕЭ/мг.

В одном воплощении изобретение включает введение композиции, в которой указанное введение является пероральным, парентеральным, внутримышечным, интраназальным, вагинальным, ректальным, лингвальным, сублингвальным, буккальным, внутривукальным, внутривенным, кожным, подкожным или трансдермальным. В некоторых воплощениях композицию, содержащую полипептид LFA3, например, LFA3-Fc M1d1, вводят внутривенно. В другом воплощении раскрытие дополнительно включает введение композиции в сочетании с другими видами лечения, такими как хирургия, химиотерапия, гормональная терапия, биологическая терапия, иммунотерапия или лучевая терапия. В некоторых воплощениях другая терапия представляет собой трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток, например, трансплантацию аллогенных гемопоэтических стволовых клеток.

VI. Способ применения и дозы.

Для приготовления фармацевтических или стерильных композиций, включающих молекулу полипептида LFA3 по настоящему описанию, молекулу полипептида LFA3 смешивают с фармацевтически приемлемым носителем или наполнителем. Составы терапевтических и диагностических агентов могут быть получены путем смешивания с физиологически приемлемыми носителями, наполнителями или стабилизаторами в форме, например, лиофилизированных порошков, суспензий, водных растворов, лосьонов или суспензий (см., например, Hardman, et al. (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N. Y.; Avis, et al. (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, et al. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc.,

New York, N. Y.).

Выбор схемы введения терапевтического средства зависит от нескольких факторов, включая скорость обновления сыворотки или ткани объекта, уровень симптомов, иммуногенность объекта и доступность клеток-мишеней в биологической матрице. В некоторых воплощениях схема введения максимизирует количество терапевтического средства, доставляемого пациенту, в соответствии с приемлемым уровнем побочных эффектов. Соответственно, количество доставленного биологического средства частично зависит от конкретного объекта и тяжести состояния, подвергаемого лечению. Доступны инструкции по выбору подходящих доз антител, цитокинов и малых молекул (см., например, Wawrzynczak, 1996, *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (ed.), 1991, *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, N.Y.; Bach (ed.), 1993, *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, N. Y.; Baert, et al., 2003, *New Engl. J. Med.* 348:601-608; Milgrom, et al., 1999, *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973; Slamon, et al., 2001, *New Engl. J. Med.* 344:783-792; Beniaminovitz, et al., 2000, *New Engl. J. Med.* 342:613-619; Ghosh, et al., 2003, *New Engl. J. Med.* 348:24-32; Lipsky, et al., 2000, *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602).

Определение подходящей дозы осуществляется врачом, например, с использованием параметров или факторов, известных или предполагаемых в данной области как влияющие на лечение или предполагаемые как влияющие на лечение. Как правило, доза начинается с количества, чуть меньшего, чем оптимальная доза, и повышается маленькими шагами до тех пор, пока не будет достигнут целевой или оптимальный эффект относительно любого негативного побочного эффекта. Важные диагностические меры включают симптомы, например, воспаления или уровня продуцируемых воспалительных цитокинов.

Фактические уровни дозировки активных ингредиентов в фармацевтических композициях по настоящему изобретению можно варьировать, чтобы получить количество активного ингредиента, эффективное для достижения искомого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, без токсичности для пациента. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества фармакокинетических факторов, включая активность конкретных применяемых композиций по настоящему изобретению или их сложного эфира, соли или амида, пути введения, времени введения, скорости выведения конкретного используемого соединения, продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в сочетании с конкретными применяемыми композициями, возраст, пол, массу, состояние, общее состояние здоровья и предыдущую историю болезни пациента, подвергаемого лечению, и подобные факторы, хорошо известные в медицине.

Композиции, содержащие молекулы полипептида LFA3 по настоящему описанию, можно вводить два раза в неделю, один раз в неделю, один раз каждые две недели или один раз каждые три недели. В некоторых воплощениях молекулу полипептида LFA3 по изобретению или ее фармацевтическую композицию вводят один раз в неделю.

В некоторых воплощениях молекула полипептида LFA3 по изобретению или ее фармацевтическая композиция вводится в дозе около 5-20 мг/неделю (например, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, или 20 мг/неделю). В некоторых воплощениях молекулу полипептида LFA3 по настоящему изобретению или ее фармацевтическую композицию вводят в дозе около 15 мг/неделю. В некоторых воплощениях молекулу полипептида LFA3 по изобретению или ее фармацевтическую композицию вводят в дозе около 7,5 мг/неделю.

В некоторых воплощениях молекулу полипептида LFA3 по изобретению или ее фармацевтическую композицию вводят в дозе около 0,2-8 мг на инъекцию (например, 0,2, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5 или 8 мг на инъекцию). В некоторых воплощениях молекулу полипептида LFA3 по настоящему изобретению или ее фармацевтическую композицию вводят в дозе 0,22-7,5 мг на инъекцию. В некоторых воплощениях молекулу полипептида LFA3 по изобретению, например, LFA3-Fc M1d1, или ее фармацевтическую композицию вводят в дозе около 7,5 мг на инъекцию.

В некоторых воплощениях полипептид LFA3 по изобретению (например, LFA3-Fc M1d1) или его фармацевтическая композиция вводится в дозе около от 0,01 до 10 мг/кг. В некоторых воплощениях полипептид LFA3 по изобретению (например, LFA3-Fc M1d1) или его фармацевтическая композиция вводится в дозе около 0,01, около 0,02, около 0,03, около 0,04, около 0,05, около 0,06, около 0,07, около 0,08, около 0,09, около 0,1, около 0,2, около 0,3, около 0,4, около 0,5, около 0,6, около 0,7, около 0,8, около 0,9, около 1,0, около 2,0, около 3,0, около 4,0, около 5,0, около 6,0, около 7,0, около 8,0, около 9,0 или около 10,0 мг/кг. В некоторых воплощениях полипептид LFA по изобретению (например, LFA3-Fc M1d1) или его фармацевтическая композиция вводится в дозе около 0,03 мг/кг. В некоторых воплощениях полипептид LFA по изобретению (например, LFA3-Fc M1d1) или его фармацевтическая композиция вводится в дозе около 0,3 мг/кг. В некоторых воплощениях полипептид LFA по изобретению (например, LFA3-Fc M1d1) или его фармацевтическая композиция вводится в дозе около 3,0 мг/кг. В некоторых воплощениях полипептид LFA по изобретению (например, LFA3-Fc M1d1) или его фармацевтическая композиция вводится в дозе около 25, около 50, около 75 или около 100 мг/кг.

В некоторых воплощениях молекулу полипептида LFA3 по изобретению или ее фармацевтическую композицию вводят в виде раствора около 0,5-1,5 мл на инъекцию (например, 0,5, 1 или 1,5 мл раствора на инъекцию). В некоторых воплощениях молекулу полипептида LFA3 по изобретению или ее фарма-

цветическую композицию вводят в количестве около 1 мл раствора на инъекцию.

В некоторых воплощениях молекулу полипептида LFA3 по изобретению (например, LFA3-Fc M1d1) или ее фармацевтическую композицию вводят в объеме дозы от около 0,5 до 5 мл/кг. В некоторых воплощениях молекулу полипептида LFA3 по изобретению (например, LFA3-Fc M1d1) или ее фармацевтическую композицию вводят в объеме дозы около 0,5, около 1,0, около 1,5, около 2,0, около 2,5, около 3,0, около 3,5, около 4,0, около 4,5 или около 5,0 мл/кг. В некоторых воплощениях молекулу полипептида LFA3 по изобретению (например, LFA3-Fc M1d1) или ее фармацевтическую композицию вводят в объеме дозы около 2,0 мл/кг.

В некоторых воплощениях молекулу полипептида LFA3 по изобретению или ее фармацевтическую композицию вводят в течение одного или нескольких (например, 1, 2, 3, 4 или более) курсов, например, каждый курс состоит из 10-14 недель (например, 10, 11, 12, 13 или 14 недель), например, 12 недель, например, где два смежных курса разделены интервалом от 10 до 14 недель (например, 10, 11, 12, 13 или 14 недельным интервалом), например, 12-недельным интервалом.

В некоторых воплощениях молекулу полипептида LFA3 по изобретению или ее фармацевтическую композицию вводят подкожно в дозе около 15 мг/неделю один раз в неделю, например, при этом молекула полипептида LFA3 по изобретению или ее фармацевтическая композиция вводятся в течение одного или нескольких (например, 1, 2, 3, 4 или более) курсов, при этом каждый курс состоит из 12 недель, а два смежных курса разделены 12 недельным интервалом.

Эффективное количество для конкретного пациента можно варьировать в зависимости от таких факторов, как состояние, которое лечат, общее состояние здоровья пациента, способ и доза введения, а также тяжесть побочных эффектов (см., например, Maynard, et al., 1996, A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Fla.; Dent, 2001, Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ, London, UK).

Путь введения может быть, например, местным или кожным, инъекцией или инфузией внутривенным, внутрибрюшинным, внутримозговым, внутримышечным, внутриглазным, внутриартериальным, интрацереброспинальным, внутриочаговым путем или с помощью систем замедленного высвобождения или имплантов (см., например, Sidman et al., 1983, Biopolymers 22:547-556; Langer, et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277; Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105; Epstein, et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-3692; Hwang, et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4030-4034; U.S. пат. США № 6350466 и 6316024). При необходимости композиция может также включать солубилизирующий агент и местный анестетик, такой как лидокаин, для облегчения боли в месте инъекции. Кроме того, также может использоваться введение через легкие, например, путем применения ингалятора или небулайзера, и состава с аэрозольным агентом; см., например, патенте США № 6 019 968, 5 985 320, 5 985 309, 5 934 272, 5 874 064, 5 855 913, 5 290 540 и 4880 078; и публикации PCT № WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 и WO 99/66903, каждая из которых полностью включена в настоящий документ путем отсылки. В одном воплощении молекулу полипептида LFA3 или ее фармацевтическую композицию по настоящему описанию вводят с использованием технологии доставки лекарственного средства в легкие Alkermes AIR™ (Alkermes, Inc., Кембридж, Массачусетс).

Композицию по настоящему изобретению также можно вводить одним или несколькими путями введения с использованием одного или нескольких из множества способов, известных в данной области. Специалистом будет учтено, что путь и/или режим введения будет варьироваться в зависимости от требуемых результатов. Выбранные пути введения полипептидных молекул согласно настоящему описанию включают внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутрибрюшинный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, путем инъекции или инфузии. Парентеральное введение может представлять собой способы введения, отличные от энтерального и местного, обычно путем инъекции, и включает, без ограничения, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, интракапсулярную, внутриглазную, внутрисердечную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, подкожную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и внутригрудинную инъекцию и инфузию. Альтернативно, композицию по настоящему изобретению можно вводить непарентеральным путем, таким как местный, эпидермальный или слизистый путь введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно.

Если молекулы полипептида LFA3 по настоящему описанию вводят в системе с контролируемым высвобождением или замедленным высвобождением, можно использовать насос для достижения контролируемого или замедленного высвобождения (см., Langer, выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:20; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:501; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:514).

Полимерные материалы могут использоваться для достижения контролируемого или замедленного высвобождения терапевтических средств согласно настоящему описанию (см., например, Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Rieger and Peppas, 1983, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61; см. также Levy et al., 1985, Science 11 225:190; Doring et al., 1979, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71: 105); патенте США

№ 5679377; патенте США № 5916597; патенте США № 5912015; патенте США № 5989463; патенте США № 5128326; публикацию PCT № WO 99/15154 и публикацию PCT № WO 99/20253. Примеры полимеров, используемых в составах с замедленным высвобождением, включают, без ограничения указанным, поли (2-гидроксиэтилметакрилат), поли (метилметакрилат), поли (акриловую кислоту), сопутствующий сополимер этилена и винилацетата, поли (метакрилат). кислота), полигликолиды (PLG), полиангидриды, поли (N-винилпирролидон), поливиниловый спирт), полиакриламид, полиэтиленгликоль), полилактиды (PLA), сополимеры полиоактид-гликолидов (PLGA) и полиортоэферы. В одном воплощении полимер, используемый в составе с замедленным высвобождением, является инертным, не содержит вымываемых примесей, стабилен при хранении, является стерильным и биоразлагаемым. Система с контролируемым или замедленным высвобождением может быть размещена в непосредственной близости от профилактической или терапевтической мишени, что требует лишь части системной дозы (см., например, Goodson, в *Medical Applications of Controlled Release*, выше, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

Системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer, 1990, *Science* 249:1527-1533. Любой метод, известный специалисту в данной области, может быть использован для получения составов с замедленным высвобождением, содержащих одну или несколько полипептидных молекул по раскрытию или их конъюгатов; см., например, пат. США № 4526938, публикацию международных патентов № WO 91/05548, WO 96/20698, Ning et al., 1996, "Intratumoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel," *Radiotherapy and Oncology* 59:179-189, Song et al., 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions," *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 50:372-397, Cleek et al., 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application," *Pro. Ml. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24:853-854, and Lam et al., 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery," *Proc. Ml. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24:759-160, каждый из которых полностью включен в настоящий документ путем отсылки.

Если молекулу полипептида LFA3 по настоящему описанию вводят местно, она может быть приготовлена в форме мази, крема, трансдермального пластыря, лосьона, геля, шампуня, спрея, аэрозоля, раствора, эмульсии или другой формы, хорошо известной специалистам в данной области; см., например, Remington's *Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms*, 19th ed., Mack Pub. Co., Easton, Pa. (1995). Для нераспыляемых местных лекарственных форм обычно используются вязкие или полутвердые или твердые формы, содержащие носитель или один или несколько эксципиентов, совместимых с местным нанесением и имеющих динамическую вязкость, в некоторых случаях выше, чем у воды. Подходящие составы включают, без ограничения указанным, растворы, суспензии, эмульсии, кремы, мази, порошки, мази, мази и т.п., которые, при необходимости, стерилизуют или смешивают со вспомогательными агентами (например, консервантами, стабилизаторами, смачивающими агентами, буферами, или солями) для влияния на различные свойства, такие как, например, осмотическое давление. Другие подходящие лекарственные формы для местного применения включают распыляемые аэрозольные препараты, в которых активный ингредиент, в некоторых случаях, в комбинации с твердым или жидким инертным носителем, упакован в смеси с летучими веществами под давлением (например, газообразным пропеллентом, таким как фреон) или в бутылке-пульверизаторе. При желании в фармацевтические композиции и лекарственные формы также могут быть добавлены увлажнители или увлажнители. Примеры таких дополнительных ингредиентов хорошо известны в данной области.

Если композиции, содержащие молекулы полипептида LFA3, вводятся интраназально, они могут быть приготовлены в форме аэрозоля, спрея, тумана или в форме капель. В частности, профилактические или терапевтические агенты для применения в соответствии с настоящим описанием могут быть удобно доставлены в форме аэрозольного спрея из упаковок под давлением или небулайзера с использованием подходящего пропеллента (например, дихлордифторметана, трихлорфторметана, дихлортетрафторэтана, диоксида углерода или другого подходящего газа). В случае аэрозоля под давлением стандартная дозировка может быть определена путем обеспечения клапана для доставки отмеренного количества. Могут быть составлены Капсулы и картриджи (состоящие, например, из желатина) для применения в ингаляторе или инсуффляторе, содержащие порошковую смесь соединения и подходящую порошковую основу, такую как лактоза или крахмал.

Способы совместного введения или лечения вторым терапевтическим агентом, например, цитокином, стероидом, химиотерапевтическим агентом, антибиотиком или облучением, хорошо известны в данной области (см., например, Hardman, et al. (eds.) (2001) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th ed., McGraw-Hill, New York, N.Y.; Poole and Peterson (eds.) (2001) *Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach*, Lippincott, Williams and Wilkins, Phila., Pa.; Chabner and Longo (eds.) (2001) *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, Lippincott, Williams and Wilkins, Phila., Pa.). Эффективное количество терапевтического средства может уменьшить симптомы по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 30%, по меньшей мере на 40% или по меньшей мере на 50%.

В одном воплощении молекулы полипептида LFA3 по настоящему описанию можно вводить совместно с композициями для лечения аутоиммунных заболеваний и нарушений, включая, помимо проче-

го, адриамицин, азатиопурин, бусульфан, циклофосфамид, циклоспорин А, цитоксан, флударабин, 5-фторурацил, метотрексат, микофенолятмофетил, 6-меркаптопурин, кортикостероид, нестероидное противовоспалительное средство, сиролimus (рапамицин) и такролимус (FK-506). В альтернативных воплощениях иммуномодулирующее или иммуносупрессирующее средство представляет собой антитело, выbranное из группы, состоящей из муромонаба-CD3, алемтузумаба (Campath®), базиликсимаба, даклизумаба, муромонаба (ОКТЗ®), ритуксимаба, антитимоцитарного глобулина и IVTg и других, которые известны специалистам в данной области техники.

В одном воплощении молекулы полипептида LFA3 по настоящему описанию можно вводить совместно с композициями для лечения диабета, включая, помимо прочего, бигуаниды (например, буформин, метформин и фенформ), гормоны и их аналоги (амилин, инсулин, инсулин аспарт, инсулин детемир, инсулин гларгин, инсулин глулизин, инсулин лизпро, лираглутид и прамлинтид), производные сульфонилмочевины (ацетогексамид, карбутамид, хлорпропамид, глиборнурид, гликлазид, глимепирид, глипизид, гликидон, глизоксепид, глибурид, глибутиазол, глибузол, глигексамид, глимидин, толазамид, толбутамид и толцикламид), тиазолидиндионы (пиоглитазон, розиглитазон и троглитазон), акарбозу, эксенатид, миглитол, митиглинид, мураглитазар, натеглинид, репаглинид, ситаглиптин, тесаглитазар, вилдаглиптин и воглибозу.

В некоторых воплощениях молекулы полипептида LFA3 по настоящему описанию могут быть составлены для обеспечения надлежащего распределения *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) исключает многие высокогидрофильные соединения. Чтобы гарантировать, что терапевтические соединения согласно раскрытию проникают через ГЭБ (при желании), они могут быть составлены, например, в липосомах. Относительно способов производства липосом см., например, патенты США 4522811; 5374548 и 5399331. Липосомы могут содержать один или несколько фрагментов, которые селективно транспортируются в определенные клетки или органы, таким образом улучшая адресную доставку лекарственного средства (см., например, V.V. Ranade, 1989, *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Примеры нацеливающих групп включают фолат или биотин (см., например, пат. США 5416016); маннозиды (Umezawa et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 1038); антитела (P.G. Bloeman et al., 1995, *FEBS Lett.* 357: 140; M. Owais et al., 1995, *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 180); рецептор сурфактантного белка А (Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233: 134); pl20 (Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); см. также K. Keinanen; M.L. Laukkanen, 1994, *FEBS Lett.* 346:123; Killion; Fidler, 1994; *Immunomethods* 4:273.

В описании изобретения представлены протоколы введения фармацевтической композиции, содержащей молекулы полипептида LFA3 по настоящему раскрытию, отдельно или в сочетании с другими видами лечения объекту, нуждающемуся в этом. Терапии (например, профилактические или терапевтические агенты) комбинированных терапий по настоящему изобретению можно вводить объекту одновременно или последовательно. Терапия (например, профилактические или терапевтические агенты) комбинированной терапии по настоящему изобретению также может проводиться циклически. Циклическая терапия включает введение первой терапии (например, первого профилактического или терапевтического агента) в течение определенного периода времени с последующим введением второй терапии (например, второго профилактического или терапевтического агента) в течение определенного периода времени и повторением это последовательного введения, то есть цикл, чтобы снизить развитие устойчивости к одному из способов лечения (например, агентам), чтобы избежать или уменьшить побочные эффекты одного из способов лечения (например, агентов), и/или улучшить эффективность терапии.

Терапевтические средства (например, профилактические или терапевтические агенты) комбинированных терапий по настоящему изобретению можно вводить объекту одновременно. Термин "одновременно" не ограничивается введением терапевтических средств (например, профилактических или терапевтических средств) в одно и то же время, а скорее означает, что фармацевтическая композиция, содержащая молекулы полипептида LFA3 по настоящему описанию, вводится объекту в порядке очередности и в пределах временного интервала, так что молекулы полипептида LFA3 по настоящему описанию могут действовать вместе с другим терапевтическим(ими) средством(ами), чтобы обеспечить более высокий эффект по сравнению с иным способом их введения. Например, каждую терапию можно вводить объекту в одно и то же время или последовательно в любом порядке в разные моменты времени; однако, если они не вводятся одновременно, их следует вводить достаточно близко по времени, чтобы обеспечить искомый терапевтический или профилактический эффект. Каждую терапию можно вводить объекту отдельно, в любой подходящей форме и любым подходящим путем. В различных воплощениях терапии (например, профилактические или терапевтические агенты) вводят объекту менее 15 мин, менее 30 мин, менее 1 ч с интервалом, с интервалом около 1 час, с интервалом от около 1 ч до около 2 ч, с интервалом от около 2 ч до около 3 ч, с интервалом от около 3 ч до около 4 ч, с интервалом от около 4 ч до около 5 ч, с интервалом от около 5 ч до около 6 ч, с интервалом от около 6 ч до около 7 ч с интервалом от около 7 ч до около 8 ч, с интервалом от около 8 ч до около 9 ч, с интервалом от около 9 ч до около 10 ч, с интервалом от около 10 ч до около 11 ч, с интервалом от около 11 ч до около 12 ч, с интервалом 24 ч, с интервалом 48 ч, с интервалом 72 ч или с интервалом в 1 неделю. В других воплощениях два или более терапевтических средства (например, профилактические или терапевтические средства) вводятся во время одного визита пациента.

Профилактические или терапевтические агенты комбинированной терапии можно вводить объекту в одной и той же фармацевтической композиции. Альтернативно, профилактические или терапевтические агенты комбинированной терапии можно вводить объекту одновременно в отдельных фармацевтических композициях. Профилактические или терапевтические агенты можно вводить объекту одним и тем же или разными путями введения.

VII. Наборы.

В описании изобретения также представлены наборы, содержащие любую или все молекулы полипептидов, описанные в данном документе. Наборы по описанию изобретения включают один или несколько контейнеров, содержащих молекулу полипептида LFA3, описанную в данном документе, и инструкции по применению в соответствии с любым из раскрытых способов, описанных в данном документе. Обычно эти инструкции содержат описание введения молекулы полипептида для описанных выше терапевтических процедур. В некоторых воплощениях предоставляются наборы для изготовления единичной дозы для введения. В некоторых воплощениях набор может содержать как первый контейнер с высушенным белком, так и второй контейнер с водным составом. В некоторых воплощениях включены наборы, содержащие аппликатор, например, однокамерные и многокамерные предварительно заполненные шприцы (например, шприцы с жидкостью и шприцы с лиофилизатом).

Инструкции, относящиеся к применению молекулы полипептида LFA3, обычно включают информацию о дозировке, графике дозирования и пути введения для предполагаемого лечения. Контейнеры могут быть единичными дозами, составными упаковками (например, многодозовыми упаковками) или субединичными дозами. Инструкции, поставляемые в наборах по раскрытию, обычно представляют собой письменные инструкции на этикетке или вкладыше в упаковку (например, лист бумаги, включенный в набор), но машиночитаемые инструкции (например, инструкции на магнитном или оптическом запоминающем диске) также приемлемы.

Наборы по описанию изобретения находятся в подходящей упаковке. Подходящая упаковка включает, без ограничения указанным, флаконы, бутылки, банки, гибкую упаковку (например, герметичные майларовые или пластиковые пакеты) и т.п. Также предусмотрены упаковки для применения в сочетании с конкретным устройством, таким как ингалятор, устройство для назального введения (например, распылитель) или устройство для инфузии, такое как мининасос. Набор может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет с раствором для внутривенного введения или флакон, имеющий пробку, которую можно проткнуть иглой для подкожных инъекций). Контейнер может также иметь порт для стерильного доступа (например, контейнер может быть пакетом с раствором для внутривенного введения или флаконом, имеющим пробку, которую можно проткнуть иглой для подкожных инъекций). По меньшей мере, один активный агент в композиции представляет собой молекулу полипептида LFA3 согласно описанию изобретения. Контейнер может дополнительно содержать второй фармацевтически активный агент.

Наборы могут необязательно предоставлять дополнительные компоненты, такие как буферы, и интерпретирующую информацию. Обычно набор включает контейнер и этикетку или вкладыш(и) на контейнере или ассоциированные с контейнером.

Описание изобретения также предоставляет диагностические наборы, содержащие любую из полипептидных молекул, описанных в данном документе, или все такие молекулы. Наборы для диагностики полезны, например, для обнаружения присутствия CD2 в образце. В некоторых воплощениях диагностический набор может использоваться для идентификации человека с латентным заболеванием, нарушением или состоянием, которое может подвергнуть его риску развития CD2-опосредованного заболевания, расстройства или состояния, или заболевания, расстройства или состояния, связанного с дефицитом CD2. В некоторых воплощениях диагностический набор может использоваться для обнаружения присутствия и/или уровня CD2 у индивидуума, у которого подозревается опосредованное CD2 заболевание или заболевание, нарушение или состояние, связанное с дефицитом CD2.

Диагностические наборы по настоящему описанию включают один или несколько контейнеров, содержащих молекулу полипептида LFA3, описанную в данном документе, и инструкции по применению в соответствии с любым из способов раскрытия, описанных в данном документе. Как правило, эти инструкции содержат описание применения молекулы полипептида LFA3 для обнаружения присутствия CD2 у индивидуумов, подверженных риску или подозреваемых в наличии заболевания, опосредованного CD2, или заболевания, расстройства или состояния, связанного с дефицитом CD2. В некоторых воплощениях примерный диагностический набор может быть сконфигурирован так, чтобы содержать реагенты, такие как, например, молекула полипептида LFA3, образец отрицательного контроля, образец положительного контроля и инструкции по применению набора.

VIII. Эквиваленты.

Вышеприведенное описание и следующие примеры подробно описывают определенные конкретные воплощения изобретения и описывают лучший образ действия, предполагаемый авторами. Однако следует понимать, что независимо от того, насколько подробно изложенное выше может появиться в тексте, раскрытие может быть осуществлено на практике многими способами, и раскрытие следует толковать в соответствии с прилагаемой формулой изобретения и любыми ее эквивалентами.

Хотя раскрытые идеи были описаны со путем отсылки на различные применения, способы, наборы и композиции, будет принято во внимание, что различные изменения и модификации могут быть сделаны без отступления от идей в данном документе и заявленного ниже раскрытия. Нижеследующие примеры предоставлены для лучшей иллюстрации раскрытых идей и не предназначены для ограничения объема представленных в данном документе идей. Хотя настоящие принципы были описаны в терминах этих примерных воплощений, квалифицированный специалист легко поймет, что многочисленные варианты и модификации этих примерных воплощений возможны без проведения излишних экспериментов. Все такие вариации и модификации находятся в пределах объема настоящего описания.

Все источники, цитируемые в данном документе, включая патенты, заявки на патенты, статьи, учебники и т.п., а также ссылки, процитированные в них, настоящим полностью включены путем отсылки в той степени, в которой они еще не были указаны. В случае, если один или несколько включенных литературных источников и подобных материалов отличаются от данной заявки или противоречат ей, включая, помимо прочего, определенные термины, использование терминов, описанные методы и т.п., данная заявка имеет преимущественную силу.

IX. Общие принципы.

Следует понимать, что это изобретение не ограничивается конкретными синтетическими способами получения, которые, конечно, могут быть разными. Если в данном документе не определено иное, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, имеют значения, которые обычно понимаются специалистами в данной области техники. Кроме того, до тех пор, пока иное не требуется по контексту, термины в единственном числе будут включать значения во множественном числе, и термины во множественном числе будут включать значения в единственном числе. Как правило, описанные в данном документе номенклатуры и методы культивирования клеток и тканей, молекулярной биологии, иммунологии, микробиологии, генетики и химии белков и нуклеиновых кислот и гибридизации хорошо известны и широко используются в данной области техники.

При практическом осуществлении настоящего изобретения будут применяться, пока не указано иное, стандартные методы молекулярной биологии (включая рекомбинантные методы), микробиологии, клеточной биологии, биохимии и иммунологии, которые известны специалисту в данной области. Такие методы полностью объяснены в литературе, например, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition (Sambrook et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-1998) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M. Miller and M.P. Calos, eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J.E. Coligan et al., eds., 1991); Sambrook and Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2001); Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (2002); Harlow and Lane *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1998); Coligan et al., *Short Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY (2003); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C.A. Janeway and P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: a practical approach* (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal antibodies: a practical approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using antibodies: a laboratory manual* (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J.D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995).

Ферментативные реакции и методы очистки проводят в соответствии с описаниями производителя, как это обычно делается в данной области техники или как описано в данном документе. Номенклатуры, используемые в связи с лабораторными процедурами и методами аналитической химии, биохимии, иммунологии, молекулярной биологии, синтетической органической химии, а также медицинской и фармацевтической химии, описанные в данном документе, хорошо известны и широко используются в данной области. Стандартные методы используются для химического синтеза, химического анализа, изготовления фармацевтической продукции, составления лекарственных форм и доставки и для лечения пациентов.

Примеры

Раскрытие изобретения далее подробно описывается с путем отсылки на следующие экспериментальные примеры. Эти примеры предоставлены только в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения, если не указано иное. Таким образом, раскрытие никоим образом не следует истолковывать как ограниченное следующими примерами, а, скорее, должно толковаться как охватывающее любые и все вариации, которые становятся очевидными в результате изложенной в данном документе идеи.

Пример 1. Созревание стабильности и аффинности LFA3 с помощью дрожжевого дисплея.

Способы.

Экспрессия и очистка белка.

Варианты LFA3 человека с С-концевым шарниром-Pfe Fc клонировали в экспрессирующий вектор млекопитающих pRY19 и использовали для транзиторной трансфекции клеток Expi293 (ThermoFisher) и ExpiCHO (ThermoFisher) с использованием набора для трансфекции ExpiFectamine 293 (ThermoFisher # A14525) и набора экспрессирующей системы ExpiCHO (ThermoFisher # A29133), соответственно, согласно инструкциям производителя. После 4-7 дней экспрессии белок собирали и очищали на аффинной колонке с протеином А с использованием смолы MabSelectSuRe (GE Healthcare # 17-5438-01) с последующей эксклюзионной хроматографией (SEC) с использованием колонки Superdex200 13100 Increase (GE Healthcare).

Для крупномасштабной экспрессии были созданы объединенные стабильные клеточные линии CHO SSI. Надосадочную жидкость, содержащую LFA3-Fc M1-d1 и M1-d3, фильтровали и пропускали через смолу MabSelect SuRe LX. Элюированный белок нейтрализовали и пропускали через колонку SP в проточном режиме в качестве стадии полировки. Для белка LFA3 дикого типа-Fc (WT) мономерная фракция была очищена с использованием SEC. Технологические примеси измеряли с использованием коммерческих наборов для анализа остаточного протеина А, белков клетки-хозяина (HCP) и ДНК.

Дисплей LFA3 человека на поверхности дрожжей.

N-концевой Ig-домен человеческого LFA3 (остатки 1-93), например, полипептид SEQ ID NO: 24, презентировали на поверхности штамма *S. cerevisiae* BJ5465 с использованием векторов pRNYD2 или pRNYDG (Pfizer). Оба вектора презентуют LFA3 с N-концевой эпитопной меткой V5, а С-конец LFA3 слит с Muc3 и участком прикрепления к мембране. В то время как вектор pRNYD2 использует трансмембранную область Ax12 для закрепления LFA3 на поверхности дрожжей, pRNYDG использует линкер GPI. Отображение на поверхности активного LFA3 подтверждалось окрашиванием эпитопа V5 и связыванием CD2 с помощью проточной цитометрии (данные не показаны). Было обнаружено, что система pRNYDG намного эффективнее презентует LFA3 и обеспечивает гораздо более высокие уровни экспрессии на поверхности дрожжей по сравнению с системой pRNYD2.

Дизайн и конструирование библиотеки 1-го поколения.

На основании кристаллической структуры комплекса LFA3: CD2 человека дикого типа (Wang, et al. (1999) Cell 97, 791-803) были выбраны 15 контактных остатков и 16 обращенных внутрь гидрофобных остатков "ядра" LFA3 были выбраны для рандомизации с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами и следующих праймеров ПЦР с вырожденными кодонами. Были сконструированы две библиотеки: 1 - S (библиотека стабильности), которая содержала рандомизацию только остатков "ядра"; и 2 - AS (библиотека аффинности и стабильности), которая содержит рандомизацию как контактных остатков, так и остатков "ядра". Сообщалось, что уровень экспрессии в дрожжах коррелирует с термостабильностью рекомбинантных белков (Shusta, et al. (1999) Journal of molecular biology 292, 949-956). Таким образом, эти библиотеки 1-го поколения были сконструированы на платформе дисплея pRNYD2 с более низкой поверхностной экспрессией для увеличения диапазона термостабильности LFA3, который может быть улучшен.

Праймеры ПЦР для контактных остатков:

Glu25 = VAK, Leu27 = NTT, Lys29 = ANG, Lys32 = ANG, Asp33 = VAM, Lys34 = ANG, Glu37 = VAK, Glu39 = VAM, Glu42 = VAK, Arg44 = ANG, Phe46 = NWT, Ser47 = RST, Pro80 = CNT, Ile82 = NTT, Asp84 = VAM

5'

gagtaacgttctttgaag**VAK**gtc**NTT**tgg**ANG**aaacaa**ANG****VAM****ANG**gtggcagaattagagaatag – 3'

(SEQ ID NO: 5)

5'

gaaaaaacaaaaagataaagtggca**VAK**tta**VAM**aatagt**VAK**ttt**ANG**gct**NWTRST**tcatttaagaatagggtc – 3'

(SEQ ID NO: 6)

5' – gtacgaaatggagtc**CNT**aat**NTT**taca**VAM**acaatgaagttttttgtac – 3' (SEQ ID NO: 7)

Праймеры ПЦР для остатков "ядра":

Phe15 = NTT, Val17 = NTT, Leu23 = NTT, Val26 = NTT, Trp28 = TKS, Val35 = NTT,

Ala36 = KYA, Leu38 = NTT, Phe43 = NTT, Ala45 = KYA, Leu55 = NTT, Gly60 = RST, Leu62 = NTT, Met77 = WTS, Met86 = WTS, Phe88 = NTT

5' –

gtttacggaatgtgactNTTcacNTTccgagtaacgttctNTTaaagaaNTTttaTKSaaaaaacaaaagataaagtg –

3' (SEQ ID NO: 8)

5' –

cttatgaaaaaacaaaagataaaNTTKYAgaaNTTgagaatagtgagNTTaggKYAtttagttcatttaagaatag – 3'

(SEQ ID NO: 9)

5' – catttaagaatagggtctatNTTgatactgtatccRSTtctNTTaccattataathtaacaagtag – 3' (SEQ

ID NO: 10)

5' – gatgaagacgagtagcgaawTSGagtgccctaataattacagacacaWTSaagNTTttttgtacgtttggg – 3'

(SEQ ID NO: 11)

Для конструирования библиотеки AS фрагменты гена LFA3, содержащие рандомизированные контактные остатки и остатки "ядра", амплифицировали отдельно и перед электропорацией смешивали вместе с вектором pRNYD2, дважды расщепленным *ApaI/NcoI*. Электропорацию, извлечение и размножение дрожжевых библиотек выполняли, как описано ранее (Chao, et al. (2006) *Nature protocols* 1, 755-768). Конечные библиотеки AS и S содержали приблизительно $1,5 \times 10^8$ и $1,3 \times 10^8$ трансформантов, соответственно.

Отбор 1-го поколения.

Экспрессию вариантов LFA3 в дрожжах индуцировали при 20°C для всех раундов отбора, и отбор библиотек проводился путем изменения двух параметров отбора: 1 -применялась тепловая денатурация к дрожжам для улучшения термостабильности; и 2 -концентрация CD2 либо поддерживалась, либо понижалась для сохранения или улучшения аффинности. В общей сложности для каждой библиотеки было выполнено 4 цикла отбора.

Отбор библиотеки S.

Для отбора библиотеки S лиганд (hCD2-биотин) поддерживался в постоянной концентрации 1 мкМ, тогда как увеличивающееся тепловое воздействие применялось во время раундов отбора для обогащения наиболее термостабильными клонами при сохранении аффинности к CD2, подобной аффинности дикого типа. Стратегия отбора была адаптирована из ранее описанного подхода эволюции стабильности белка в дрожжах (Shusta, et al. (2000) *Nature biotechnology* 18, 754-759). Для раунда 1 приблизительно $2,0 \times 10^9$ клеток без дополнительного теплового воздействия инкубировали с hCD2-биотином в течение 1 ч при 4°C и дважды промывали РВЕ (ФСБ, pH 7,4 + 0,5% (мас./об.) БСА + 2 мМ ЕДТК, pH 8,0). Затем библиотеку окрашивали стрептавидином-PE1:50 (SA-PE, Life Technologies # S21388) в течение 15 мин, дважды промывали и, наконец, метили парамагнитными анти-PE микрогранулами 1:10 (Miltenyi # 130-048-801) в течение 20 мин, все при 4°C. Библиотеку отбирали с использованием колонок MACS LS (Miltenyi # 130-042-401) и QuadroMACS Separator (Miltenyi # 130-090-976) в соответствии с инструкциями производителя. Для раундов 2-4 $1,0 \times 10^8$ клеток в РВЕ подвергали воздействию [20 мин при 46°C], [30 мин при 46°C] и [20 мин при 46°C + 10 мин при 50°C], соответственно, с использованием теплового блока (Erpendorf). После тепловой денатурации библиотеки окрашивали 1 мкМ hCD2-биотином в течение 1 ч при 4°C, дважды промывали и совместно метили SA-PE (для обнаружения связывания hCD2) и анти-V5-FITC (для обнаружения экспрессии варианта LFA3) в течение 10 мин при 4°C. Отбор библиотеки выполнялся с помощью двухцветной FACS, сортировки дважды положительной популяции CD2+V5+ с использованием сортировщика SH800 (Sony).

Отбор библиотеки AS.

При отборе библиотеки AS концентрацию hCD2-биотина снижали, и в раундах отбора применяли увеличивающееся тепловое воздействие, чтобы получить наиболее термостабильные клоны с наивысшей аффинностью. Критерии и модальность раундов отбора для библиотеки AS были по существу такими же, как для библиотеки S, описанной выше, с одной модификацией: для раундов 2-4 вместо окрашивания библиотеки 1 мкМ лигандом библиотеку AS окрашивали 40 нМ hCD2-биотином в течение 1 ч при 4°C.

По завершении отбора 100 мкл библиотек S и AS после цикла 4 использовали для экстракции ДНК библиотеки с использованием набора ZymoPrep™ Yeast Plasmid Miniprep II (Zymo Research # D2004) в соответствии с инструкциями производителя. Экстрагированную ДНК трансформировали в химически компетентные *E.coli* TOP10 и высевали для секвенирования индивидуальных клонов.

Оценка стабильности.

Дифференциальная сканирующая флуорометрия (DSF).

Эксперименты проводили с использованием системы ПЦР в реальном времени ViiA 7 (Thermo Fisher) и набора красителей Protein Thermal Shift Dye (Thermo Fisher # 4461146) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, варианты LFA3 0,8-1 мг/мл смешивали с разбавлением 1:1000 красителя в ФСБ. Образцы (реакционный объем 20 мкл) распределяли по 96-луночному реакционному планшету MicroAmp Optical (Applied Biosystems # N8010560), избегая боковых сторон планшета, и закрывали оптической клейкой крышкой (Applied Biosystems # 4360954). Система ПЦР в реальном времени ViiA 7 была запрограммирована на повышение температуры с 25°C до 99°C со скоростью 0,05°C/с. Температуры плавления вариантов LFA3-Pfe были определены количественно путем измерения температуры, соответствующей первому переходу кривой плавления в программе ViiA 7, и точки наносили на график с использованием Prism 6.

Тепловая агрегация.

Варианты LFA3-Pfe в концентрации 1 мг/мл в ФСБ, pH 7,2 нагревали при указанных температурах (20 мкл/реакцию) в течение 24 ч с использованием амплификатора Tetrad 2 Peltier (BioRad). Для оценки уровня агрегации, вызванной нагреванием, 15 мкл/образец загружали в колонку YMC-Pack Diol-200 (YMC) для анализа методом эксклюзионной хроматографии (SEC). Полученные хроматограммы использовали для количественного определения % высокомолекулярных соединений (HMMS), % димера и % мономера как функции температуры.

Удержание при низком pH.

Варианты LFA3-Pfe в концентрации 1,5 мг/мл в ФСБ, pH 7,2 смешивали с 10% (об./об.) либо 0,4 М глицина, pH 2,7, либо ФСБ, pH 7,2 (т.е. 5 мкл глицина или ФСБ добавляли к 50 мкл белка) и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 ч. Образцы нейтрализовали 4,55% (об./об.) либо 0,25 М трис-основания, pH 7,4, либо ФСБ (т.е. 2,5 мкл буфера для нейтрализации добавляли к 55 мкл образца). Для оценки уровня агрегации, вызванной низким pH, 25 мкл/образец загружали в колонку YMC-Pack Diol-200 (YMC) для анализа методом эксклюзионной хроматографии (SEC). Полученные хроматограммы использовали для количественного определения % высокомолекулярных соединений (HMMS), % димера и % мономера как функции температуры.

Устойчивость к замораживанию-оттаиванию и встряхиванию.

Устойчивость к замораживанию-оттаиванию оценивали путем замораживания материала при -80°C или -20°C на ≥ 30 мин, оттаивания при 5°C в течение ≥ 30 мин и встряхивания. Процесс повторяли в течение 5 циклов, и оценивали образцы аналитическим SEC. Для стабильности при встряхивании образцы подвергали встряхиванию в течение 24 ч при 300 об/мин (с PS80 и без него) и проверяли на растворимую агрегацию и осаждение.

Термостабильность (дифференциальная сканирующая калориметрия).

Термостабильность с помощью DSC оценивали с помощью MicroCal VP-Capillary DSC, сканирование от 10 до 110°C со скоростью 60°C/час. Образцы разбавляли буфером до 1 мг/мл.

Аналитический анализ белков.

Капиллярный гель-электрофорез (сGE).

Образцы разбавляли до 1 мг/мл. Невосстановленные образцы обрабатывали йодацетамидом (IAM), а восстановленные образцы обрабатывали DTT. Анализ выполняли с использованием метода сGE Lab-Chip HT Antibody Express 200 (Perkin Elmer).

Аналитический SEC.

Анализ SEC-HPLC выполняли с использованием хроматографической колонки YMC-Pack Diol-200 (YMC America).

Вязкость.

Вязкость измеряли с помощью вискозиметра RheoSense m-VROC. Белок готовили в гистидинсахарозном буфере ЕДТК, pH 5,8, и вязкость измеряли при концентрациях до 150 мг/мл.

Характеризация белков.

Спектроскопический анализ самовзаимодействия наночастиц с аффинным захватом (AC-SINS).

Анализ AC-SINS проводили с использованием наночастиц золота, покрытых антителами против IgG человека. Образцы с концентрацией 50 мкг/мл в ФСБ смешивали с покрытыми наночастицами и инкубировали в течение 2 ч. Образцы переносили на пластину, прозрачную для УФ-излучения, и измеряли оптическую плотность от 450 до 650 нм.

Хроматография FcRn.

Биотинилированный человеческий FcRn был захвачен стрептавидиновой смолой и помещен в колонку. 50 мкг образца вводили в колонку и применяли линейный градиент элюирования от pH 5,5 до 8,8. Регистрировали относительное время элюирования по сравнению с контрольным mAb и ширину пика при высоте пика 50%.

Полиреактивность ELISA.

Планшеты для ELISA покрывали 10 мкг/мл дцДНК или 5 мкг/мл инсулина в течение ночи. Планшеты блокировали буфером для ELISA (ФСБ, 0,05% Tween-20, 1 мМ ЕДТК) и наносили тестируемые белки

с использованием 4-кратных серийных разведений, начиная с 1 мкг/мл. Связывание детектировали с использованием HRP-конъюгированного козьего антитела против IgG человека.

Иммуногенность *in silico*.

Иммуногенность *in silico* оценивали с использованием онлайн набора инструментов для скрининга EpiVax ISPRI.

Анализ аффинности связывания.

Аффинность связывания вариантов LFA3-Fc с рекомбинантным CD2 определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса с использованием прибора Biacore T200 (GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси). Биотинилированный белок CD2 был захвачен на покрытом стрептавидином (SA) сенсорном чипе Biacore (Series S Sensor Chip SA, BR100531, GE Healthcare) при низкой плотности связывания. Эксперименты проводили при 25°C с использованием скорости потока 30 мкл/мин в 0,01 М ГЭПЭС pH 7,4, 0,15 М NaCl и 0,005% об./об. буфера P20 (HBS-P). Варианты LFA3-Fc инъецировали по поверхности в течение 2 мин, а диссоциацию отслеживали в течение следующих 5 мин или 10 мин для клонов с более высокой аффинностью. Никакой аффинности регенерации не требовалось. Данные анализировали с использованием программы Biacore T200 Evaluation, сигнал от соседней контрольной проточной кюветы только с иммобилизованным стрептавидином представлял собой фоновый сигнал, который вместе с сигналом от инъекций только буфера для каждого антитела вычитался. Для расчета констант аффинности (Kd) использовали модель равновесного связывания.

Результаты.

Дизайн на основе структуры был использован для создания библиотек дрожжевого дисплея на основе первого внеклеточного домена LFA3 человека (фиг. 1). Библиотеки AS и S по оценкам содержали $\sim 1,5 \times 10^8$ и $\sim 1,3 \times 10^8$ трансформантов, соответственно. Анализ последовательностей исходных библиотек подтвердил приблизительно 6-7 мутаций на клон в каждой библиотеке.

Библиотеки подвергали растущему тепловому воздействию после индукции и уменьшению концентрации лиганда CD2 для библиотеки AS. После четырех раундов отбора отдельные клоны секвенировали и идентифицировали 6 остатков горячих точек: A36, L38, F43, A45, M77 и M86 (фиг. 2A и 2B). На основе наиболее часто встречающихся остатков в этих шести положениях (фиг. 2C) 6 рекомбинантных вариантов (M1->M6) (фиг. 2D) были сконструированы и экспрессированы в виде гибридных белков Fc в клетках млекопитающих. Гибридные белки Fc M1 и M6 содержат вариант внеклеточного домена LFA3 (SEQ ID NO: 17-22, соответственно), слитый с областью Fc IgG1 человека (SEQ ID NO: 16) (табл. 2). Область Fc IgG1 человека SEQ ID NO: 16 также упоминается как "Pfe" на фигурах и во всех заявках. Соответствующие нуклеотидные последовательности представлены в табл. 3.

В исследованиях, описанных в примере 1 и примере 2, гибридные белки M1-M6 Fc, а также другие варианты гибридных белков LFA3-Fc сравнивали с гибридными белками LFA3 дикого типа-Fc. В исследованиях использовали два референсных гибридных белка LFA3 дикого типа-Fc, которые оба содержат первый внеклеточный домен дикого типа LFA3 человека, слитый с областью Fc IgG1 человека. Первая референсная молекула упоминается как "WT LFA3-Fc" или "LFA3-Fc WT" (SEQ ID NO: 4), которая была создана на основе опубликованной последовательности алейфасепта. Эта референсная молекула была раскрыта в US5547853, полностью включенном в настоящий документ путем отсылки. Вторая референсная молекула, именуемая "WT LFA3-Pfe" (SEQ ID NO: 120), включает тот же первый внеклеточный домен дикого типа LFA3 человека, что и WT LFA3-Fc, но имеет немного отличающуюся область Fc IgG1 человека. В некоторых воплощениях LFA3-Fc WT (SEQ ID NO: 4) и/или WT LFA3-Pfe (SEQ ID NO: 120) включают карбоксиконцевой остаток лизина. В некоторых воплощениях SEQ ID NO: 4 и/или SEQ ID NO: 120 не включают карбоксиконцевой остаток лизина. В некоторых воплощениях SEQ ID NO: 128 не включает карбоксиконцевой остаток лизина.

Гибридные белки Fc варианта LFA3 были охарактеризованы для оценки характеристик стабильности и потенциальной технологичности рекомбинантных белков. Варианты ранжировали на основе их мономерной экспрессии, общего выхода, термической стабильности и склонности к агрегации при тепловом стрессе (фиг. 3A-3D). На основе этого анализа варианты M1, M4 и M5 были определены как имеющие наиболее желательные свойства.

Библиотека второго поколения была разработана для идентификации клонов с повышенной аффинностью связывания с CD2. В этой библиотеке мутировали 7 остатков в петле FG LFA3, используя варианты дикого типа, M1, M4 и M5 в качестве матрицы (фиг. 4). На основе анализа последовательности 12 вариантов гибридных белков LFA3-Fc были сконструированы и экспрессированы в клетках млекопитающих для дальнейшего анализа (CM1d1-> CM6d1 и ML1d1-> ML6d1). Гибридные белки CM1d1 с Fc CM6d1 - вариант внеклеточного домена LFA3 (SEQ ID NO: 30-35, соответственно), слитый с областью Fc IgG1 человека (SEQ ID NO: 16) (табл. 2). Аналогично, гибридные белки ML1d1 и ML6d1 Fc включают вариант внеклеточного домена LFA3 (SEQ ID NO: 36-41, соответственно), слитый с областью Fc IgG1 человека (SEQ ID NO: 16) (табл. 2). Соответствующие нуклеотидные последовательности представлены в табл. 3.

Клоны, идентифицированные в библиотеке петель второго поколения, были экспрессированы как гибридные белки Fc и оценены на термостабильность с использованием дифференциальной сканирующей

шей флуориметрии (DSF) (фиг. 5B) и аффинность связывания с рекомбинантным белком CD2 с помощью SPR с использованием анализа связывания Biacore (фиг. 5A). Оцениваемые клоны с наивысшей аффинностью имели очевидную аффинность в диапазоне 60-100 нМ (фиг. 5A). Оцениваемые клоны с наивысшей аффинностью имели увеличение аффинности в около 20 раз по сравнению с исходным белком WT LFA3-Fc и в 10 раз по сравнению с M1d1-Pfe (также называемым "LFA3-Fc M1d1") и вариантами M4d1-Pfe (фиг. 5A). Варианты CM2d1-Pfe, CM5d1-Pfe и ML3d1-Pfe обладают повышенной термостабильностью к DSF по сравнению с конструкциями дикого типа (WT LFA3-Fc и WT LFA3-Pfe), а также конструкциями родительских вариантов (M1d1-Pfe и M4d1-Pfe.) (фиг. 5B).

Направленная разработка, основанная на структурном анализе, была использована для удлинения С-концевой границы домена LFA3, включенного в экспрессирующую конструкцию (фиг. 6A). Конструкции, кодирующие дополнительный С-концевой остаток лейцина в домене LFA3 дикого типа (LFA3-Fc d1) или М-вариантах (M1-d1 и M4-d1), экспрессировали и очищали. Гибридные белки Fc: LFA3-Fc d1, M1-d1 (также обозначаемый как "M1d1") и M4-d1 (также обозначаемый как "M4d1") содержат домен LFA3 (SEQ ID NO: 24, 26 и 28, соответственно), слитый с областью Fc IgG1 человека (SEQ ID NO: 16) (табл. 2). Соответствующие нуклеотидные последовательности представлены в табл. 3. Было обнаружено, что d1-вариант имел пониженное образование агрегатов по сравнению с белком, экспрессируемым с ранее опубликованной границей домена для гибридного белка LFA3 Fc, и повышенную термостабильность (фиг. 6B и 6D). Добавление модификации границы домена (d1) к каркасу M1 или M4 дополнительно увеличивало мономерную фракцию белка вне клеточной культуры (фиг. 6C) и термостабильность, измеренную с помощью DSF (фиг. 6D).

Варианты, включающие одну дополнительную (d1, + L) (фиг. 7A) или шесть (d3, + LESLPS) (фиг. 7B) эндогенных аминокислот, продуцировали в виде гибридных белков Fc и характеризовали по стабильности и аффинности связывания. Гибридные белки Fc M1-d1 и M1-d3 (также называемые "M1d3") содержат домен LFA3 (SEQ ID NO: 26 и 27, соответственно), слитый с областью Fc IgG1 человека (SEQ ID NO: 16) (табл. 2). Соответствующие нуклеотидные последовательности представлены в табл. 3. Два варианта, M1-d1 и M1-d3, демонстрируют одинаковую аффинность связывания с CD2 и термостабильность *in vitro* (фиг. 7C и 7D).

Дополнительный вариант M7 LFA3 был сконструирован так, чтобы он содержал один дополнительный остаток дикого типа в положении 86 относительно M1 (фиг. 8A). Гибридный белок M7-d1 (также называемый "M7d1") Fc включает домен LFA3 (SEQ ID NO: 29), слитый с областью Fc IgG1 человека (SEQ ID NO: 16) (табл. 2). Соответствующая нуклеотидная последовательность раскрыта в табл. 3. M7-d1 охарактеризовали для оценки мономерной фракции (фиг. 8B), термостабильности (фиг. 8C) и аффинности связывания с рекомбинантным CD2 (фиг. 8D).

Варианты LFA3-Fc и WT LFA3-Fc были охарактеризованы по атрибутам стабильности и потенциальной технологичности (табл. 4 и табл. 5). Эти анализы показали, что вариант M1-d1 (также известный как "M1d1") значительно более стабилен, чем гибрид Fc дикого типа с точки зрения экспрессии мономерного белка, термостабильности, склонности к агрегации, чувствительности к удержанию низкого pH и циклам замораживания/оттаивания (табл. 4).

Таблица 4

Новые и полезные молекулярные свойства вариантов LFA3-Fc

	WT LFA3-Fc	*сконструированный вариант M1-d1
Мономерные виды протеина А (%)	73,9% мономера 19% HMWS, 7,1% LMWS	>99%
Аналитический SEC	99,2% мономера	99,6% мономера
Термическая стабильность с помощью DSC/DSF	DSC: Tm1, 47 °C DSF: Tm1, 40 °C	DSC: Tm1, 65 °C DSF: Tm1, 60 °C
Склонность к принудительной агрегации	40 °C HMWS увеличивается до ~23% 50 °C HMWS увеличивается до ~29%	40 °C нет увеличения HMWS 50 °C HMWS увеличивается до ~3%
Удержание низкого pH (5 ч)	11% HMWS, нет увеличения LMWS	4% HMWS, нет увеличения LMWS
Замораживание-оттаивание (5 циклов)	~2% увеличения HMWS	Нет увеличения HMWS
Аффинность по SPR к рекомбинантному CD2 человека (K _D)	1,41 - 1,47 мкМ	0,73 - 1,08 мкМ
Аффинность по SPR к рекомбинантному CD2 яванского макака CD2 (K _D)	1,5 мкМ	1,06 мкМ

* Примерное воплощение, охватывающее все варианты LFA3-Fc, раскрытые в данном документе.

HMWS относится к видам с высокой молекулярной массой, а LMWS относится к видам с низкой молекулярной массой.

Таблица 5

Обзор молекулярных свойств сконструированного варианта LFA3-Fc M1-d1

Молекулярные свойства	3 предполагаемых сайта N-связанного гликозилирования, 1 предполагаемый сайт деамидирования, 2 предполагаемых сайта изомеризации, 1 метионин	гликан cGE	Содержит N-гликаны, общие для Fc антитела Сильноразветвленный и сиалилированный (9,1 нмоль сиаловой кислоты/нмоль LFA3-Fc)
Экспрессия	Выход пула клеточных линий SSI на 12 день ~150-300 мг/л	Технологические примеси	rProA 39 нг/мг, HCP 293 нг/мг, DNA 27 нг/мг
Без изменений после пяти циклов (5 C/-20 °C)	Неплатформенный способ очистки; потенциальные проблемы с процедурой удержания низкого pH и совместимостью со стадией очистки TMAE	F/T	Без изменений после пяти циклов (5 C/-20 °C)
Вязкость	11 сП при 150 мг/мл в составе MOD1	Встряхивание	Увеличение HMMS на 0,8-1,5% при 25°C. ~1% HMMS увеличение Glu при 40 C
Растворимость	Не менее - 175 мг / мл во всех протестированных	Активность	Без изменений в ADCC EC50 с образцами
	буферах		стабильности
SEC	Все препараты >99% SOI после протейна А. 0,8-1,5% HMMS увеличиваются при 25°C. HMMS увеличивается на ~1% при 40°C.	Иммуногенность	Индекс иммуногенности EriVax -13,52; рекомендация IRAMP умеренно-высокая из-за эндогенной последовательности
DSC	T _m 1 65°C в гистидиновом буфере pH 5.8.	AC-SINS	Низкий балл AC-SINS, Δλ макс. поглощение 1
cGE	Высокая чистота в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Без изменений при 5°C и 25°C. 2-5% увеличение LMMS по NRCGE при 40°C	Эюция колонки FcRn	Малое время элюирования из колонки FcRn -0,6 мин.
iCE	Сложный профиль заряда - 15-18 разных видов	Полиспецифичность	Оценка полиспецифичности ДНК и инсулина 1

Пример 2. Дальнейшая характеристика M1d1 in vitro и in vivo.

Введение.

LFA3-Fc нацелен на важный терапевтический путь, который имеет потенциал -после оптимизации - восстановления иммунологической толерантности при диабете 1 типа (T1D), заболевании, которое до

сих пор было в значительной степени невосприимчивым к вмешательствам, модифицирующим болезнь, и поэтому представляет собой большую неудовлетворенную медицинскую потребность, особенно у детей.

M1d1 (также называемый "M1-d1", "LFA3-Fc M1d1" и "LFA3-Fc M1-d1") представляет собой димерный гибридный белок LFA3-Fc, состоящий из первого внеклеточного домена LFA3, слитого с областью Fc из IgG1. M1d1 был сконструирован путем включения четырех неэндогенных аминокислот во внеклеточном домене LFA3 для повышения стабильности и технологичности. Не желая быть связанными теорией, отметим, что M1d1 может уменьшить количество CD4 и CD8 Т-клеток памяти за счет ADCC/цитотоксичности, при этом относительно сохраняя Treg- и наивные Т-клетки, и может модулировать взаимодействие CD2/LFA3, что приводит к улучшению соотношений Treg/TEM и Treg/TSM как в CD4+ Т-клетках, так и в CD8+ Т-клетках. M1d1 продемонстрировал модуляцию иммунного фенотипа у яванских макак, что согласуется с предлагаемым механизмом действия (МОА) и терапевтической гипотезой. Доклинические исследования с M1d1 позволяют предположить, что ФК линейна, и доза пропорциональна, а исследование не-GLP ТК не выявило каких-либо данных, связанных с безопасностью, кроме ожидаемого снижения количества лимфоцитов. Краткое описание фармакологических свойств приведено ниже в табл. 6 с данными для целевой популяции клеток памяти CD4.

Таблица 6

Краткий обзор новых и полезных фармакологических свойств вариантов LFA3-Fc

	Связывание клеток Связывание LFA3-Fc коррелирует с экспрессией CD2	MLR Ингибирование ответа алло-Т- клеток; Пролиферация/ цитокины	Вторичный ответ на столбнячный токсин Ингибирование вторичного ответа на TT; CD4 Tmem IFN γ
	CD4 T _{mem} K _d	CD4 IC ₅₀	IFN γ IC ₅₀
*M1d1	94 пМ (n=3)	0,302 нМ (n=8)	1,34 нМ (n=3)
WT LFA3-Fc	501 пМ (n=3)	2,48 нМ (n=8)	28,4 нМ (n=3)

* Примерное воплощение, охватывающее все варианты LFA3-Fc, раскрытые в данном документе.

Способы.

Анализ экспрессии CD2.

Для субпопуляций лимфоцитов мононуклеарные клетки периферической крови человека (PBMC) выделяли с использованием Lymphoprep (Stemcell Technologies # 07851). PBMC от макак выделяли с использованием 90% Lymphoprep в ФСБ (Corning # 21-040-CM) и ресуспендировали в буфере для сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FAC) (ФСБ плюс 0,2% BCA (Jackson Immuno Research # 001-000-173)). Клетки человека блокировали с использованием Human TruStain FcX (BioLegend # 422302). На каждый образец окрашивали два миллиона PBMC. В случае субпопуляций Т-хелперов выделяли CD4 клетки с помощью набора Easy Sep (Stem Cell Technology # 19052), используя инструкции производителя, а затем окрашивали 1 миллион клеток на образец. Для окрашивания поверхности клетки перед анализом фиксировали во внутриклеточном буфере фиксации (IC) (Ebioscience # 00-8222-49). Для окрашивания FoxP3 использовали набор буфера FoxP3 человека (BD Pharmingen # 560098) в соответствии с инструкциями производителя. Для PBMC человека клетки окрашивали следующими антителами: CD4 BUV395, CD3 PerCP-e710, CD2 PE, CD45RO PeCy7, CD8 FITC, CCR7 BV421, TIGIT APC, PD1 BV650, для оценки жизнеспособности в ближнем ИК-диапазоне (панель 1); или CD4 BUV 395, CD3 PerCP-e710, CD2 PE, CD8 BUV 496, CD20 FITC, CD159a A647, CD25 BV421, CD127 BV605 и для оценки жизнеспособности в ближнем ИК-диапазоне. Для PBMC яванского макака клетки окрашивали следующим образом: CD95 BUV 395, CD4 PerCP-e710, CD2 PE, CD28 PeCy7, CD8 BUV496, CD3 FITC, CD20 V450, CD159a APC, PD1 BV650, для оценки жизнеспособности в ближнем ИК-диапазоне (панель 1); или CD4 Percp-e710, CD3 FITC, CD25 BV421, CD2 PE, FoxP3 APC и для оценки жизнеспособности в ближнем ИК-диапазоне. Клетки обрабатывали на LSR Fortessa, а гранулы Quantibrite обрабатывали во время сбора образцов (согласно инструкциям производителя). Флуоресцентный реактивный краситель для оценки жизнеспособности в ближней инфракрасной области (IR) (Invitrogen # L34976) использовали для распознавания жизнеспособных клеток. Данные выражали в виде средней геометрической интенсивности флуоресценции (gMFI).

Анализ конкурентного связывания LFA3-Fc.

PBMC и выделение подмножества.

Остатки Trima от здоровых доноров, из сбора афереза Trima и обогащенные PBMC, были получены из Центров крови Тихого океана (Сан-Франциско, Калифорния). PBMC выделяли центрифугированием в градиенте плотности. Очищенные популяции наивных CD4/CD8 клеток, клеток центральной памяти и эффекторной памяти выделяли из PBMC с помощью наборов для отрицательного отбора (StemCell Technologies).

Регуляторные Т-клетки выделяли из цельной крови с использованием коктейля CD4 Enrichment RosetteSep™ (STEMCELL Technologies), а затем с помощью сортировки активированных клеток флуорес-

ценцией с использованием маркеров CD4-флуоресцеина изотиоцианата (FITC), CD127-PE и CD25-APC. Регуляторные Т-клетки идентифицированы CD4hiCD127loCD25hi. Выделенные регуляторные Т-клетки культивировали в среде X-VIVO (Lonza) в присутствии гранул DynaBead Human Treg Expander (Invitrogen) в течение до двух недель.

Анализ связывания клеток.

После выделения субпопуляции CD4 и CD8 высевали при плотности 5×10^4 клеток на лунку. Планшеты центрифугировали и ресуспендировали в буфере FACS (ФСБ, содержащий 2% БСА), содержащем блок кристаллизованного фрагмента Fc человека (2 мкл на лунку), серийные разведения LFA3-Fc M1d1 или LFA3-Fc WT и конкурирующего коммерческого анти-CD2-FITC (клон RPA2.10) для определения Kd. Концентрация конкурента поддерживалась постоянной ($3,23 \times 10^{-8}$ М) при значении ниже, чем EC50, так что конкурентное антитело все еще можно было обнаружить, но оно было способно конкурировать. Клетки инкубировали 2 ч на льду. Клетки трижды промывали буфером FACS и ресуспендировали в 100 мкл буфера для FACS, содержащего краситель жизнеспособности. Для различения эффектора CD4 и центральной памяти был включен CCR7-BV421. После 15-минутной инкубации клетки промывали буфером для FACS, ресуспендировали в 50 мкл буфера для FACS и анализировали проточной цитометрией.

Анализ данных.

Kd для LFA3-Fc рассчитывали с использованием уравнения Ченга-Пруссоффа.

$$K_d = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[\text{конкурент}]}{K_d \text{ конкурента}}}$$

Кривые связывания клеток были построены путем построения графика средней геометрической интенсивности флуоресценции (gMFI) связывания конкурента против логарифма концентрации антитела LFA3-Fc. Значения были нормализованы: максимальное связывание представляло собой среднее значение для образцов без конкуренции, а минимальные значения - для образцов без конкурирующего CD2-изотиоцианата флуоресцеина (FITC). Кривые связывания клеток были построены для каждого из подмножеств клеток РВМС (фиг. 11). Значения IC50 (эффективная концентрация при 50% ингибировании максимального ответа) конкурента определяли с использованием аппроксимации кривой нелинейной регрессии GraphPad Prism® (версия 6.0, GraphPad Software, Inc, Сан-Диего, Калифорния) и сигмоидального логарифма модели дозозависимого эффекта антагониста.

Анализ MLR.

Доноры были отобраны из банка замороженных РВМС на основании полного несоответствия генотипов HLA. РВМС из донора-"стимулятора" были лишены Т-клеток и NK-клеток с использованием набора для положительного отбора CD3 и CD56. Для всех анализов истощения NK-клеток также истощали NK-клетки у "отвечающего" донора с использованием набора для положительного отбора CD56. 112500 клеток или 75 мкл каждой из популяций стимуляторов и отвечающих добавляли в лунки 96-луночного планшета с U-образным дном. Готовили трехкратные серийные разведения белка LFA3-Fc, и в каждую лунку добавляли 75 мкл белка. Планшеты инкубировали при 37°C в течение 5 дней. Клетки центрифугировали, промывали буфером для сортировки активируемых флуоресценцией клеток (FACS) (ФСБ, содержащий 2% БСА), затем окрашивали антителами для иммунного фенотипа в течение 15 мин. Были использованы следующие антитела: CD3 (BUV496), CD4 (BUV395), CD8 PerCp-e710, CD45RO PerCy7, CD45RA FITC, CD25 PE-CF594, CD56 BV421, CD2-PE, а также была использована оценка жизнеспособности в ближнем ИК-диапазоне. 10 мкл гранул CountBright добавляли в каждую лунку непосредственно перед анализом проточной цитометрией.

Были рассчитаны абсолютные количества CD4-клеток памяти, наивных CD4-клеток, CD8-клеток памяти, наивных CD8-клеток и CD56 NK-клеток. Процентный ответ был зарегистрирован для популяций CD4-клеток памяти и рассчитан как:

$$\% \text{ ответа} = 100 \times \frac{\{ \text{ответ} - \text{нестимулированные} \}}{\{ \text{стимулированные} - \text{нестимулированные} \}}$$

Процент ингибирования аллогенного ответа рассчитывали как 100 минус процент ответа. Значения наносили на график в зависимости от логарифма концентрации антител LFA3-Fc. Ответ на анализ определяли как функцию абсолютного количества клеток памяти. Значения EC50 определяли с использованием аппроксимации кривой нелинейной регрессии GraphPad Prism® (версия 6.0, GraphPad Software Inc., Сан-Диего, Калифорния) и логарифма сигмоидальной функции модели дозозависимого эффекта антагониста.

Анализ вторичного ответа на ТТ.

РВМС, выделенные из остатков Ttma, проверяли на реактивность по отношению к столбнячному токсину (Astarte Biologics). Сильные положительные отвечающие были сохранены для применения в анализах ТТР. В 96-луночный планшет с U-образным дном высевали 200000 РВМС на лунку в 100 мкл. Полипептиды LFA3-Fc получали в количестве 4x, и 50 мкл каждого белка LFA3 добавляли в каждую лунку. 50 мкл белка столбнячного токсина (1 мкг/мл) добавляли в каждую лунку и инкубировали при 37°C в течение 5 дней. Планшеты центрифугировали 5 мин при 16000 об/мин. 125 мкл надосадочной

жидкости собирали для анализа выработки IFN γ с помощью ELISA. Клетки центрифугировали, промывали в буфере FACS (ФСБ, содержащий 2% БСА), затем окрашивали иммунофенотипическими антителами в течение 15 мин. Были использованы следующие антитела: CD3 (BUV496), CD4 (BUV395), CD8 PerCp- ϵ 710, CD45RO PerCy7, CD45RA FITC, CD25 PE-CF594, CD56 BV421, CD2-PE, и использовали оценку жизнеспособности в ближнем ИК-диапазоне. 10 мкл гранул CountBright добавляли в каждую лунку непосредственно перед анализом проточной цитометрией.

Концентрацию IFN γ использовали для определения процентного ответа. Процентный ответ рассчитывали, как описано выше для анализа MLR. Процентное ингибирование вторичного ответа памяти рассчитывали как 100 минус процентный ответ. Значения наносили на график в зависимости от логарифма концентрации антител LFA3-Fc. Значения EC50 определяли с использованием аппроксимации кривой нелинейной регрессии GraphPad Prism® (версия 6.0, GraphPad Software Inc., Сан-Диего, Калифорния) и логарифма сигмоидальной функции модели дозозависимого эффекта антагониста.

ФК-анализ.

Стандарты и контроли качества (QC) готовили в сыворотке яванского макака, а затем разводили в 20 раз для MRD в буфере для анализа (Scytek Superblock с 0,5 M NaCl). Образцы также разбавляли в соответствии с MRD в буфере для анализа. Любое дополнительное разведение образцов проводили в буфере для анализа, содержащем 5% обезьяньей сыворотки, и загружали на 96-луночный планшет для ПЦР. Биотинилированное захватывающее антитело (анти-LFA3, Invitrogen, MA1-19503) и AF647-меченное детектирующее антитело (ослиное антитело против человеческого IgG H + L, Jackson ImmunoResearch, 709-005-149) получали при 50 мкг/мл и 1 мкг/мл, соответственно и загружали в отдельный 96-луночный планшет для ПЦР. Планшеты, Gygos 1000 CD, и промывочные буферы помещали в прибор Gyrolab для обработки и анализа.

Результаты.

Анализы *in vitro*.

Ключевым фактором разрушения тканей и патологии при T1D являются CD4+ T_{EM}-клетки. В то время как CD2 экспрессируется на всех Т-клетках, CD2 экспрессируется на самых высоких уровнях на T_{EM}-клетках. Экспрессия CD2 увеличивается еще в 5 раз после активации TCR. Уровни CD2 (молекул на клетку) в клетках человека показаны на фиг. 9 и 10. Связывание M1d1 (макс. gMFI) коррелирует с уровнем экспрессии CD2 на Т-клетках. M1d1 имеет Fc IgG1 с эффекторной функцией связывания FcR. Фармакология *in vitro* была охарактеризована с помощью: i) анализов связывания клеток, ii) первичного анализа ADCC, iii) анализа цитотоксичности очищенных NK-клеток, iv) ингибирования пролиферации CD4 и CD8 в результате аллогенной стимуляции в смешанной реакции лимфоцитов (MLR) и v) ингибирование продуцирования IFN γ в CD4mem в анализе вторичного ответа на антиген с использованием столбчатного токсина. Кроме того, M1d1 может иметь независимые от ADCC механизмы действия. *In vitro* это было продемонстрировано посредством истощения NK-клеток из анализа MLR, а также использования вариантных молекул с эффекторной функцией Fc. Во всех анализах *in vitro* M1d1 сравнивали с молекулой WT LFA3-Fc в качестве ориентира. Дополнительные контроли включали изотипический контроль (отрицательный контроль mAb, отсутствие мутаций Fc) и вариант с эффекторной функцией M1d1-Fc (eff null), который не проявлял активности/ингибирования ни в одном из следующих анализов (данные не показаны). Не желая быть связанными теорией, считаем, что эти анализы *in vitro* оценивали механизмы действия M1d1, которые включают преимущественное нацеливание на Т-клетки памяти CD2hi и последующее ингибирование ответов клеток памяти.

Анализ экспрессии CD2.

Все Т-клетки экспрессируют CD2. Однако абсолютная экспрессия различается на разных подгруппах клеток, при этом Т-клетки памяти экспрессируют более высокие уровни CD2, чем наивные Т-клетки (фиг. 9). В-клетки не экспрессируют CD2, а NK-клетки экспрессируют гетерогенно низкие уровни CD2. После активации экспрессия CD2 увеличилась в около 5 раз, а затем вернулась к базальному уровню в течение одной недели (фиг. 10). Этот профиль экспрессии обеспечивает окно, в котором на CD2hi T_{EM}-клетки может быть осуществлено направленное воздействие, при этом сохраняя при этом Treg-клетки и наивные Т-клетки.

В человеческих PBMC количественная оценка молекул CD2 продемонстрировала наибольшее количество молекул на клетках памяти CD4 и CD8, в частности, CD4 центральной памяти ("cen mem"), экспрессирующих в среднем 9220 молекул; CD4 эффекторной памяти человека ("eff mem"), экспрессирующих в среднем 11000 молекул; CD8 центральной памяти человека, экспрессирующих в среднем 11800 молекул; и CD8 эффекторной памяти человека, экспрессирующих в среднем 10000 молекул (табл. 7, фиг. 9). В CD8 клетках человека клетки центральной памяти содержали большее количество молекул, чем клетки эффекторной памяти ($p < 0,05$). В CD4 клетках человека клетки эффекторной памяти содержали больше молекул CD2, чем клетки центральной памяти ($p < 0,05$).

Таблица 7

Количественное определение CD2 в субпопуляциях лимфоцитов в РВМС человека

	В-клетки	НК-клетки	Наивные CD4	Treg	CD4 центр. памяти	CD4 эфф. памяти	Наивные CD8	CD8 центр. памяти	CD8 эфф. памяти
среднее	28,6	1370	5280	6720	9220	11000	6510	11800	10000
SD	2,34	441	496	668	335	1070	472	912	919

Центр. памяти = клетки центральной памяти; эфф. памяти = клетки эффекторной памяти; Treg = регуляторные Т-клетки.

Экспрессию CD2 количественно оценивали с помощью анализа Quantibrite (фиг. 17). Как и у человека, Т-клетки памяти яванского макака экспрессируют большее количество молекул CD2 на клетку, чем наивные клетки. У яванского макака, но не человека, CD8+ -клетки имели бимодальную экспрессию CD2, и ~ 10-20% были CD2-отрицательными. Количественная оценка молекул CD2 продемонстрировала наибольшее количество молекул на CD4 и CD8 клетках памяти, при этом CD4 клетки центральной памяти, экспрессирующие 8 570 молекул, и CD4 клетки эффекторной памяти, экспрессирующие 8 140 молекул, CD8 клетки центральной памяти, экспрессирующие 7 100 молекул, и CD8 клетки эффекторной памяти, экспрессирующие 5880 молекул (фиг. 17, с. табл. 8).

Таблица 8

Количественное определение CD2 на субпопуляциях лимфоцитов в РВМС яванского макака

	В-клетки	НК-клетки	Наивные CD4	Treg	CD4 центр. памяти	CD4 эфф. памяти	Наивные CD8	CD8 центр. памяти	CD8 эфф. памяти
Среднее	42,1	374	5200	5730	8570	8140	4510	7100	5880
SD	11	121	1020	1360	2040	2470	945	1690	1890

Незначительная экспрессия CD2 была отмечена как в В-клетках человека, так и в В-клетках яванского макака с 28,6 и 42,1 молекулами, соответственно. Человеческие наивные CD8 и CD4 клетки и Treg содержат 6510, 5280 и 6720 молекул, соответственно, что составляет наименьшее количество молекул CD2 в субпопуляциях Т-лимфоцитов в человеческих РВМС. Наивные CD8 и CD4 клетки яванского макака экспрессируют 4510 и 5200 молекул, соответственно, и, таким образом, имеют наименьшее количество среди подмножеств Т-клеток яванского макака.

В CD4 клетках памяти человека экспрессия CD2 составляла 11800 gMFI в KlrG1-Tigit+PD1+ клетках по сравнению с 17000 у KlrG1+ клеток (фиг. 25A-25B). Было высказано предположение, что экспрессия KlrG1-Tigit+PD1+ позволяет идентифицировать Т-клетки, которые являются анергическими по фенотипу.

Внутри подмножеств Т-хелперов экспрессия CD2 была самой высокой в воспалительных клетках Th17/Th1 и Th22 (фиг. 26A-26B) по сравнению с Treg и Th2-клетками.

Таблица 9

Экспрессия CD2 в подмножествах Т-хелперов человека

	Th2	Tfh-подобные	Tfh CCR7+	Tfh CCR7+ PD1+	Treg	Th17/Th1	Th1	Th17	Th22	Th9
среднее	12500	11800	11900	11600	11600	19800	15000	16000	17500	18200
SD	3360	5740	6060	5260	2720	5310	5170	4120	5920	4600

CCR7 = С-С хемокиновый рецептор типа 7; PD1 = белок 1 запрограммированной гибели клеток; Th = Т-хелпер; Tfh = Т фолликулярный хелпер; Treg = регуляторные Т-клетки.

В РВМС человека и приматов, не являющихся человеком, все субпопуляции Т-клеток экспрессируют CD2. Внутри компартмента Т-клеток нерегуляторные Т-клетки памяти экспрессируют наибольшее количество молекул CD2 на клетку, около в 1,5-2 раза больше молекул CD2 на клетку, чем наивные Т-клетки. Эти результаты показывают, что важные популяции клеток (например, Т-клетки) экспрессируют мишень терапевтического пептида LFA3-Fc M1d1. Эти данные также указывают на то, что иммунофенотипирование можно использовать для стратификации пациентов для лечения полипептидами LFA3-Fc.

Анализ конкурентного связывания LFA3-Fc.

Связывание LFA3-Fc с CD2 представляет собой взаимодействие с относительно низкой аффинностью, при измерении с помощью SPR (1 мкМ). Трудно добиться насыщенного связывания LFA3-Fc первичными Т-клетками, поскольку жесткость промывки может значительно повлиять на данные. Поэтому для определения очевидной аффинности M1d1 к субпопуляциям Т-клеток использовали анализ конкурентного связывания с антителом против CD2 (табл. 10 и фиг. 11). LFA3-Fc WT проявлял среднюю кажущуюся аффинность к CD4 клеткам памяти и наивным CD4 клеткам 0,501 и 0,391 нМ, соответственно (таблица 10). LFA3-Fc M1d1 проявлял среднюю кажущуюся аффинность к CD4 клеткам памяти и наивным CD клеткам 4 0,094 и 0,054 нМ, соответственно (табл. 10). Эти исследования демонстрируют, что LFA3-Fc WT и LFA3-Fc M1d1 связываются с CD2+ клетками (например, с CD4 клетками памяти и наивными CD4 клетками) и что LFA3-Fc M1d1 проявляет в около 5 раз большую аффинность к CD2 на клеточной поверхности, чем LFA3-Fc WT. Таким образом, эти исследования демонстрируют, что терапевтический полипептид LFA3-Fc M1d1 проявляет повышенную аффинность к целевому поверхностному маркеру CD2.

Связывание LFA3-Fc с первичными Т-клетками человека с использованием анализа конкурентного связывания с антителом к CD2

Подмножество Т-клеток	Расчитанное значение K _d для RPA2.10 (нМ)	Расчитанное IC ₅₀ (нМ)		Расчитанное K _d (нМ)	
		WT	M1d1	WT	M1d1
CD4 памяти	23,7	2,32	0,55	0,623	0,148
CD4 памяти	23,7	1,29	0,25	0,345	0,068
CD4 памяти	42,0	0,95	0,12	0,535	0,067
среднее CD4 памяти		1,52	0,307	0,501	0,094
CD4 EM	34	1,20	0,15	0,616	0,079
CD4 CM	44,7	0,88	0,11	0,514	0,064
Наивные CD4	18,2	1,45	0,22	0,319	0,047
Наивные CD4	23,8	1,09	0,14	0,463	0,061
среднее Наивные CD4		1,27	0,18	0,391	0,054
Наивные CD8	14,8	0,71	0,09	0,222	0,030
Наивные CD8	31,0	2,80	0,51	0,906	0,166
среднее Наивные CD8		1,76	0,3	0,564	0,098
CD8 памяти	11	0,59	0,12	0,151	0,031
CD4 Treg (размнож.)	67,9	0,50	0,09	0,339	0,058

EM = эффекторная память; CM = центральная память.

MLR-анализ.

Реакция смешанной реакции лимфоцитов (MLR) оценивает ответ CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток (например, размножение) на аллогенную стимуляцию и включает ответы клеток, которые были наивными во время стимуляции. Это более сложный функциональный ответ, который позволяет оценить механизмы, выходящие за рамки ADCC. M1d1 полностью ингибировал рост CD4⁺ Т-клеток (фиг. 14А) и CD8⁺ Т-клеток (данные не показаны) в ответ на аллогенную стимуляцию и был более эффективным, чем WT LFA3-Fc (фиг. 14А и 14В).

Чтобы оценить *in vitro*, обладает ли M1d1 механизмами действия в дополнение к NK-опосредованному уничтожению клеток, NK-клетки истощали из анализа MLR. M1d1 ингибировал экспансию CD4⁺ Т-клеток в MLR даже в отсутствие NK-клеток, хотя IC₅₀ был увеличен (фиг. 15А-15С). Были получены дополнительные подтверждающие данные, показывающие, что варианты LFA3-Fc с эффекторной функцией, лишенные связывания с CD16 (FcR, который связан с ADCC), также могут ингибировать аллогенные ответы (данные не показаны). Это согласуется с не зависящим от NK-клеток механизмом действия, ассоциированным с LFA3-Fc.

Эти исследования демонстрируют, что терапевтический полипептид LFA3-Fc M1d1 ингибирует Т-клеточные ответы в анализах аллогенной MLR и что эффективность LFA3-Fc M1d1 *in vitro* выше, чем у LFA3-Fc WT.

Анализ TTR.

Чтобы оценить ингибирование ранее существовавших ответов клеток памяти, PBMC от доноров, реактивных на столбнячный токсин (ТТ), стимулировали ТТ *ex vivo*. M1d1 полностью ингибировал *ex vivo* рост антиген-специфических клеток памяти и секрецию цитокинов (IFN γ) в ответ на токсин ТТ (фиг. 16А и 16В). WT LFA3-Fc был менее эффективен, чем M1d1 в отношении ингибирования этого ответа (фиг. 16А и 16В). Эти исследования демонстрируют, что терапевтический полипептид LFA3-Fc M1d1 ингибирует Т-клеточные ответы в анализах TTR и что эффективность LFA3-Fc M1d1 *in vitro* выше, чем у LFA3-Fc WT.

Пример 3. Анализы *in vivo*.

LFA3 человека не связывается с CD2 грызунов, но связывает CD2 не являющегося человеком примата. Приматов, не являющихся людьми, использовали для оценки иммуномодуляции и истощения Т-клеток памяти в результате лечения алефацептом (Weaver, et al. (2009) Nat Med. 15(7):746-749).

Два исследования были проведены с M1d1 на яванских макаках: первое было исследованием однократной дозы (17-MA005). Второе исследование, 17MA057, представляет собой исследование ФК/ФД с повторной дозой, спроектированное с экстенсивным анализом иммунного фенотипа для поддержки понимания взаимосвязи доза-ответ, эффектов однократной и повторной дозы и извлечения затронутых клеток. Был включен параллельный дозозависимый ответ с WT LFA3-Fc. Поскольку у самок обезьян заметных различий не наблюдалось, данные, полученные от самцов и самок, объединены для анализа.

IV Диагностическое исследование токсичности при внутривенном введении однократной дозы с 8-недельной фазой наблюдения (17MA005).

Яванским макакам вводили контрольный носитель или LFA3-Fc M1d1 в дозе 0,3 мг/кг или 100 мг/кг

путем внутривенной болюсной инъекции один раз в день 1. Смертности, связанной с исследуемым препаратом, и клинических признаков не наблюдалось. Не было изменений, связанных с исследуемым препаратом, в любом типе клеток, оцениваемых у животных, которым вводили 0,3 мг/кг LFA3-Fc M1d1. Связанные с исследуемым препаратом изменения в некоторых субпопуляциях лимфоцитов наблюдались как у самцов, так и у самок обезьян, которым вводили 100 мг/кг LFA3-Fc M1d1 (табл. 12), хотя все субпопуляции клеток возвращались к исходным значениям к 57 дню или раньше. В целом значения S_{max} и AUC_{last} (от 1 до 1368 ч) при 100 мг/кг составили 3590 мкг/мл и 238,00 мкг ч/мл, соответственно. Частота индукции антител к лекарственным средствам составила 66% (2/3) для животных, получавших дозу LFA3-Fc M1d1 в дозе 0,3 мг/кг, и 50% (1/2) для животных, получавших дозу LFA3-Fc M1d1 в дозе 100 мг/кг.

Образцы периферической крови собирали на -14, 1 (перед введением дозы), 2, 4, 8, 15, 29, 43 и 57 дни. Процент каждой субпопуляции лимфоцитов определяли методом проточной цитометрии. Введение 100 мг/кг LFA3-Fc M1d1 приводило к связанным с испытуемым препаратом временным уменьшениям по сравнению с исходным уровнем общего количества Т-клеток, хелперных Т-клеток и цитотоксических Т-клеток в периферической крови по меньшей мере 1 животного. Также наблюдалось снижение количества подмножеств наивных клеток, клеток центральной и эффекторной памяти хелперных Т-клеток и цитотоксических Т-клеток. Также наблюдали снижение количества CD25 Foxp3 хелперных Т-клеток (регуляторных Т-клеток), а также количества и процентного содержания цитотоксических PD-1+ Т-клеток. Диапазон этих сокращений для всех подмножеств составлял 0,01-0,37х. Большинство этих сокращений наблюдалось на 15-й и/или 29-й день. Все подмножества клеток вернулись к базовым значениям к 57 дню или раньше. Не было связанных с исследуемым препаратом изменений количества В-клеток и НК-клеток, или процентного содержания хелперных PD-1+ Т-клеток, или PD-1+ эффекторных, или хелперных Т-клеток центральной памяти и цитотоксических Т-клеток. Не было изменений, связанных с исследуемым препаратом, в любом типе клеток, оцениваемых у животных, которым вводили 0,3 мг/кг LFA3-Fc M1d1.

РВМС яванского макака инкубировали с белками M1d1 или LFA3 дикого типа-Fc *ex vivo*, и цитотоксичность оценивали с помощью проточной цитометрии. M1d1 индуцировал дозозависимую цитотоксичность CD4+ TEA *in vitro*. M1d1 достиг сравнимой максимальной цитотоксичности с LFA3 дикого типа-Fc и был более мощным, чем молекула LFA3 дикого типа-Fc (фиг. 18А и 18В). В целом, EC50 для клеток яванского макака были выше, чем для РВМС человека.

4-недельное внутривенное болюсное исследование ФК/ФД с 6-недельной фазой наблюдения (17MA057).

Экспериментальная схема 17MA057 показана на фиг. 19. Яванским макакам вводили 0,03, 0,3 или 3 мг/кг/дозу LFA3-Fc M1d1 или LFA3-Fc WT посредством болюсной внутривенной инъекции в дни 1, 8, 15 и 22 (т.е. один раз в неделю в течение 4 недель) с последующей 6-недельной фазой наблюдения. Образцы крови собирали у всех животных до начала дозирования, в дни дозирования и во время фазы наблюдения на 36, 43, 50, 57, 64 и 71 дни. Процент каждой субпопуляции лимфоцитов определяли методом проточной цитометрии. Определение изменений в субпопуляциях лимфоцитов после введения LFA3-Fc M1d1 или LFA3-Fc WT ограничивалось общими Т-клетками, CD4+ Т-клетками, CD8+ Т-клетками, НК-клетками, В-клетками, CD4+ и CD8+ наивными, Т-клетками центральной и эффекторной памяти и регуляторными Т-клетками. Изменения определяли с использованием абсолютного количества клеток и отношения к исходным значениям.

Изменения количества В-клеток и НК-клеток по сравнению с исходным уровнем наблюдали у животных, которым вводили LFA3-Fc M1d1. Количество В-клеток увеличивалось у животных, которым вводили 0,3 (1,37х-1,94х исходный уровень), 0,3 (1,41х исходный уровень) или 3 (1,50х-2,92х исходный уровень) мг/кг/дозу, а количество НК-клеток уменьшалось при > 0,03 мг/кг/доза (0,27х-0,44х от исходного уровня) преимущественно через 6 ч после введения дозы в 1 или более дней приема. Изменения в В-клетках и НК-клетках возвращались к исходным значениям через 24 ч после введения дозы для большинства животных.

Повторное введение M1d1 уменьшало периферические CD4+ ТЕМ-клетки (фиг. 20А и 34А). M1d1 относительно щадяще воздействовал на Treg, что привело к увеличению отношения Treg/ТЕМ (фиг. 20В и 34В). CD8+ ТЕМ-клетки также уменьшились. Эффект на наивных Т-клетках был минимальным. Фаза восстановления была завершена, и к 57 дню стали очевидны тенденции к восстановлению или установлению нового исходного уровня.

Общее влияние M1d1 на общее количество Т-клеток относительно невелико (снижение <50% при 3 мг/кг) и не соответствует порогу, связанному с иммуносупрессией (фиг. 21). При обработке количество В-клеток не уменьшалось (не показано). M1d1 предпочтительно нацелен на CD2hi ТЕМ-клетки *in vivo* (фиг. 21).

Как упоминалось выше, в исследовании 17MA057 было включено параллельное исследование дозозависимого ответа с WT LFA3-Fc для применения в качестве эталона. Повторное введение WT LFA3-Fc в клетки яванского макака уменьшало CD4 ЕМ-клетки и увеличивало соотношение Treg/CD4+ТЕМ (фиг. 22А и 22В и фиг. 35А и 35В).

NHP ФК-параметры для M1d1 и WT LFA3-Fc определяли путем подбора данных исследования повторных доз NHP (еженедельное дозирование 0,03, 0,3 или 3 мг/кг в течение 4 недель с последующими 6 неделями периода восстановления) (фиг. 23А и 23В) к двухкомпонентной ФК-модели. Параметры ФК для человека для алефацепта были получены путем оцифровки клинических средних данных (0,04, 0,15 и 0,2 мг/кг для однократной дозы (IV/IM/SC)) из литературы и сопоставления их с двухкомпонентной ФК-моделью. Эти параметры ФК показаны ниже в табл. 11. Клиренс M1d1 в 2 раза медленнее, чем у WT LFA3-Fc.

Были оценены эффективные дозы LFA3-Fc M1d1. Предполагая аналогичную абсорбцию LFA3-Fc M1d1 подкожным путем по сравнению с алефацептом, вводимым внутримышечно, и предполагаемый в 2 раза меньший клиренс LFA3-Fc M1d1 по сравнению с алефацептом, еженедельная п/к доза 7,5 мг LFA3-Fc M1d1 будет эффективной для людей.

Таблица 11

ФК-параметры M1d1 и WT LFA3-Fc

ФК-параметр	LFA3-Fc WT обезьяны (%CV)	LFA3-Fc M1d1 обезьяны (%CV)	Алефацепт человека %CV*	LFA3-Fc M1d1 человека %CV**
скорость абсорбции (Ka) (1/ч)			0,023 (7)	
Биодоступность (F) (%)			59 (5)	
Центральный объем (V1) (мл/кг)	37 (9)	32 (5,0)	49 (6)	32 (5)
Периферический объем (V2) (мл/кг)	34(15)	27 (8)	27 (10)	27 (8)
Клиренс из центрального объема (Cl) (мл/ч*кг)	0,24(4)	0,11 (6)	0,21 (6)	0,11 (6)
Клиренс распределения (Q) (мл/ч*кг)	0,67(32)	0,70 (10)	0,85 (45)	0,70 (10)

* На основании опубликованных данных;

** спрогнозировано.

Побочные эффекты, связанные с M1d1, не наблюдались в исследовании токсичности однократной дозы на обезьянах. Уменьшение Т-лимфоцитов было единственным изменением, связанным с исследуемым препаратом, у животных, которым вводили M1d1 в дозе 100 мг/кг, с последующим восстановлением к 57 дню. Основываясь на опубликованных данных о Алефацепте, целями токсичности являются только те, которые, как ожидается, будут связаны с умеренным или заметным истощением CD2-положительных лимфоцитов и соответствующей иммуносупрессией. Обзор токсикологических исследований M1d1 представлен в табл. 12.

Обзор токсикологических исследований M1d1

Исследования	Результаты
Подтверждены соответствующие токс виды	Гомология последовательностей (белок): обезьяна (>94%), собака (60%), крыса (57%), мышь (52%). Связывание с CD2 Вiasoge: заметного связывания у мыши, крысы или собаки не наблюдается, связывание с CD2 человека и яванского макака: $\text{Hu CD2 Kd (M): } 1.10\text{E-6}$; $\text{суно CD2 Kd (M): } 1,35\text{E-6}$. Имеет предполагаемую эффекторную функцию ADCC как часть MOA. Минимальные эффекты CDC ($\geq 10\%$ процентов убитых клеток-мишеней).
CRA человека (0,1, 1, 10, 100 мкг/мл)	Измерены TNF- α , IFN- γ и IL-6. Отсутствие значимого высвобождения цитокинов в растворимой фазе CRA после инкубации с образцами крови от 8 здоровых доноров.
ТК-исследование на обезьянах (0,3 и 100 мг/кг) 17MA005	При дозе 100 мг/кг клинических признаков, влияющих на массу тела или потребление пищи, связанных с исследуемым средством, не наблюдалось (запас безопасности ^a > 400X). Наблюдались изменения в иммунофенотипировании, связанные с исследуемым средством, по сравнению с исходными значениями, при 100 мг/кг. Мужчины: временное \downarrow в абсолютном количестве всех типов клеток, кроме В-клеток и НК-клеток. Женщины: временное \downarrow в PD1+ цитотоксических Т-клетках, регуляторных Т-клетках, цитотоксических Т-клетках центральной и эффекторной памяти, PD1+хелперных Т-клетках центральной и эффекторной памяти, а также в PD1+ цитотоксических Т-клетках центральной и эффекторной памяти.
Исследование ФК/ФД на обезьянах (0,03, 0,3 и 3 мг/кг) 17MA057	Никаких клинических признаков, влияющих на массу тела или потребление пищи, связанных с исследуемым средством, не наблюдались при всех уровнях доз. Средние значения C_{max} и AUC_{168} M1d1 при 3 мг/кг/дозу составляли 181 мкг/мл и 16 400 мкг*ч/мл в день 22. ^b

^a Запас представляет собой оценку, основанную на прогнозируемом эффективном воздействии по результатам исследования ФК/ФД (17MA057). Прогнозируемый диапазон AUC_{ss} при эффективной дозе для M1d1 составляет от 16 до 550 мкг*день/мл, диапазон доз составляет 0,22-7,5 мг.

^b C_{max} = самая высокая концентрация лекарственного средства, наблюдаемая в сыворотке; AUC_{168} = площадь под кривой зависимости концентрации лекарственного средства от 0 до 168 ч после введения дозы.

Пример 4. Биофизические характеристики и исследования стабильности LFA3-Fc M1d1 и LFA3-Fc WT.

LFA3-Fc M1d1 (также известный как "LFA3-Fc M1-d1", "M1d1", "M1-d1" или "M1d1-Pfe") и LFA3-Fc WT (также известный как "WT LFA3-Fc") были охарактеризованы по биофизическим свойствам и стабильности с целью прогнозирования сравнительных технологических свойств.

Оценка термостабильности.

Термостабильность LFA3-Fc M1d1 оценивали с помощью DSC (дифференциальная сканирующая калориметрия) в Трис-буфере, pH 7,5, гистидиновом буфере, pH 5,8 и глутаматном буфере, pH 4,5. Белок показал температуру перехода (T_{M1}) выше 65°C в гистидиновом и Трис-буферах (табл. 13 и фиг. 27).

Таблица 13

Температуры термического перехода для LFA3-Fc M1d1

Образец	T_{M1}	T_{M2}
LFA3-Fc M1d1 Tris pH 7,5	66,64	83,55
LFA3-Fc M1d1 His pH 5,8	65,08	82,99
LFA3-Fc M1d1 Glu pH 4,5	61,29	80,72

Для отдельного анализа домена LFA3 и домена Fc (CH2 и CH3) образцы обрабатывали FabRICATOR IdeS (Genovis AB, Кембридж, Массачусетс) при 37°C в течение 30 мин. Домен LFA3 (также называемый "фрагментом LFA3") проявлял температуру теплового перехода, близкую к температуре теплового перехода домена CH2 фрагмента Fc (фиг. 28).

Термостабильность LFA3-Fc M1d1 и LFA3-Fc WT сравнивали с помощью DSC. LFA3-Fc WT имел более низкую стабильность термического разворачивания во всех условиях по сравнению с LFA3-Fc

M1d1. Стабильность теплового разворачивания LFA3-Fc WT была значительно ниже целевой температуры для антитела (например, $T_{M1} > 65^{\circ}\text{C}$) (табл. 14).

Таблица 14
Температуры термического перехода для LFA3-Fc M1d1 и LFA3-Fc WT

Условие	Образец	T_{M1}
Трис pH 7,5	LFA3-Fc M1d1	66,3
	LFA3-Fc WT	59,7
Гистидин pH 5,8	LFA3-Fc M1d1	64,01
	LFA3-Fc WT	60,9
Глутамат pH 4,5	LFA3-Fc M1d1	61,4
	LFA3-Fc WT	56,4

Термостабильность LFA3-Fc M1d1 и LFA3-Fc WT сравнивали с использованием DSC с последующим использованием FabRICATOR IdeS, как описано выше. Расщепленный домен LFA3 и домены Fc (т.е. CH2 и CH3) также анализировали отдельно. Домен LFA3 M1d1/домен CH2 имел значительно большую стабильность теплового развёртывания, чем домен LFA3 дикого типа/домен CH2 ($64,8^{\circ}\text{C}$ против $52,2^{\circ}\text{C}$, соответственно) (табл. 15).

Таблица 15
Температуры теплового перехода для доменов LFA3-Fc M1d1 и LFA3-Fc WT

	LFA3/CH2	LFA3	CH2	CH3
LFA3-Fc M1d1	66,8		-	82,3
M1d1 Fc	-		73,4	80,7
M1d1 LFA3		64,8	-	-
LFA3-Fc WT	53,2		67	83,2
WT Fc	-		73,4	81,7
WT LFA3		52,2	-	-

Неоднородность заряда.

Гетерогенность изменений LFA3-Fc M1d1 и LFA3-Fc WT оценивали с помощью изоэлектрического капиллярного электрофореза в трех условиях: 20 мМ Трис pH 7,5, 20 мМ гистидин pH 5,8 и 20 мМ глутамат pH 4,5. Обе молекулы демонстрируют сложный профиль заряда, включающий 15-18 различных видов (фиг. 29А-29С). Гетерогенность LFA3-Fc WT и M1d1 (виды > 20 pI) отражает модификации кислотной аминокислоты на шести сайтах N-связанных гликанов LFA3-Fc. Наблюдали более низкое разрешение соединения LFA3-Fc WT по сравнению с LFA3-Fc M1d1.

Стабильность.

Стабильность LFA3-Fc M1d1 и LFA3-Fc WT оценивалась во временных исследованиях в течение 2, 4 или 6 недель. Образцы подвергали центрифужной ультрафильтрации/диафильтрации с использованием фильтра из регенерированной целлюлозы с отсечкой по молекулярной массе 30K (Amicon). 25 мкл или 100 мкл каждого полипептидного состава (табл. 16) помещали в криопробирку на 500 мкл. Условия исследования представлены в табл. 16.

Таблица 16
Условия исследования стабильности

Концентрация полипептида (мг/кг)	Состав	Температура	Время (недели)
150	20 мМ Трис pH 7,5 8.5% сахарозы 0.05 мг/мл ЕДТК	5°C или 25°C	2, 4, 6
150	20 мМ гистидин pH 5,8 8.5% сахарозы 0.05 мг/мл ЕДТК	5°C или 25°C	2, 4, 6
150	20 мМ глутамат pH 4,5 8.5% трегалозы 0,05 мг/мл ЕДТК	5°C или 25°C	2, 4, 6
5	20 мМ Трис pH 7.5	40°C	2, 4
5	20 мМ гистидин pH 5,8	40°C	2, 4
5	20 мМ глутамат pH 4,8	40°C	2, 4

Капиллярный гель-электрофорез.

Полипептиды анализировали через 2, 4 и 6 недель с помощью капиллярного гель-электрофореза (CGE) в невосстанавливающих условиях (NR) на фрагментацию, о чем свидетельствует увеличение процентного содержания низкомолекулярных видов (LMMS). Наблюдалось значительное увеличение фрагментации LFA3-Fc WT при 40°C по сравнению с LFA3-Fc M1d1 (фиг. 30А-30С). При 25°C тенденция к увеличению процента LMMS наблюдалась в образцах LFA3-Fc WT, однако не наблюдалось увеличения процента LMMS в образцах LFA3-Fc M1d1 (данные не показаны). Значительного изменения процентного

содержания LMMS при 5°C ни для LFA3-Fc WT, ни для M1d1 не было (данные не показаны). Стабильность LFA3-Fc M1d1 в каждом из составов буфера была аналогичной. Однако LFA3-Fc WT был значительно более стабильным при приготовлении в Трис по сравнению с гистидином или глутаматом.

Составы LFA3-Fc WT имели чистоту ~97% в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Составы LFA3-Fc M1d1 имели чистоту ~99% в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях.

Эксклюзионная хроматография.

Полипептиды анализировали с помощью эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC) после хранения в течение 2 или 4 недель при 40°C (фиг. 31A-31D). Наблюдалось значительное увеличение агрегации, о чем свидетельствует увеличение процента высокомолекулярных видов (HMMS) в составе LFA3-Fc WT с глутаматом на неделе 2 и неделе 4 по сравнению с неделей 0 и по сравнению с LFA3-Fc M1d1, приготовленным в глутаматном буфере (фиг. 31C). Также наблюдалось выраженное увеличение образования LMMS в LFA3-Fc WT, приготовленном в глутаматном или гистидиновом буфере (фиг. 31D). Увеличение LMMS на 2-3% наблюдалось через 4 недели в составах LFA3-Fc M1d1 с гистидином и глутаматом (фиг. 31D).

Полипептиды анализировали с помощью SE-HPLC после хранения в течение 2, 4 или 6 недель при 25°C (фиг. 32A-32D). Более высокий исходный процент HMMS был обнаружен в составах LFA3-Fc WT по сравнению с составами LFA3-Fc M1d1. Увеличение на 1-2% HMMS было обнаружено в составах LFA3-Fc M1d1, тогда как HMMS увеличилось на 2-10% в составах LFA3-Fc WT. Наиболее значительное увеличение процента HMMS (~10%) было обнаружено в LFA3-Fc WT, приготовленном в глутаматном/трегалозном буфере (фиг. 32C). Никакого значительного увеличения LMMS не наблюдалось ни в одном составе LFA3-Fc M1d1, тогда как увеличение LMMS на ~7% было обнаружено через 6 недель в LFA3-Fc WT, приготовленном в гистидиновом/сахарозном буфере и глутаматном/трегалозном буфере (фиг. 32D).

Полипептиды анализировали с помощью SE-HPLC после хранения в течение 2, 4 или 6 недель при 5°C (фиг. 33A-33D). Более высокий начальный процент HMMS был обнаружен в составах LFA3-Fc WT по сравнению с составами LFA3-Fc M1d1 (фиг. 33A-33C). Наиболее значительное увеличение процента HMMS было обнаружено в LFA3-Fc WT, приготовленном в глутамат/трегалозном буфере, после хранения в течение 6 недель (увеличение ~2,8%) (фиг. 33C).

В целом, LFA3-Fc M1d1 продемонстрировал превосходную стабильность против фрагментации по сравнению с LFA3-Fc WT во всех испытанных условиях. В частности, LFA3-Fc WT проявлял значительную нестабильность при низком pH в испытанных композициях. Скорость агрегации LFA3-Fc WT была выше при 25°C по сравнению с 40°C в трис- и гистидиновых буферах, что может указывать на зависимость от концентрации или несовместимость наполнителей.

Растворимость.

Растворимость LFA3-Fc WT тестировали до 165 мг/мл в буфере, содержащем глутамат, трегалозу и ЕДТК, при pH 4,5. Растворимость LFA3-Fc M1d1 тестировали до 148 мг/мл в буфере, содержащем глутамат, трегалозу и ЕДТК, при pH 4,5.

Гликановый анализ.

Оба полипептида LFA3-Fc WT и LFA3-Fc M1d1 содержали N-гликаны, характерные для доменов Fc из антител. Домен LFA3 WT-полипептида содержал сильно разветвленные гликаны и приблизительно 22 нмоль сиаловой кислоты/нмоль полипептида LFA3-Fc WT. Домен LFA3 полипептида M1d1 также содержал сильно разветвленные гликаны и приблизительно 14 нмоль сиаловой кислоты/нмоль полипептида LFA3-Fc M1d1.

Пример 5. Антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) LFA3-Fc M1d1.

В этом исследовании охарактеризовали *in vitro* ADCC LFA3-Fc M1d1 и LFA3-Fc WT против человеческих Т-клеток. CD2 экспрессируется на всех Т-клетках с наибольшей экспрессией на Т-клетках памяти по сравнению с наивными или регуляторными Т-клетками. LFA3-Fc связывается с CD2, и основным механизмом действия является ADCC.

Это исследование продемонстрировало, что LFA3-Fc M1d1 в 3-4 раза более эффективен при индукции ADCC CD4 клеток памяти, чем LFA3-Fc WT. Кроме того, LFA3-Fc M1d1 предпочтительно нацелены на CD4+ Т-клетки памяти по сравнению с наивными Т-клетками.

Способы.

Анализ ADCC РВМС и проточная цитометрия.

РВМС от здоровых доноров-людей выделяли центрифугированием в градиенте плотности с использованием пробирок SepMate™ и Lymphoprep™ в соответствии с инструкциями производителя (STEM-CELL Technologies, Теквила, Вашингтон). После выделения РВМС помещали в полную среду RPMI при плотности $2,0 \times 10^5$ клеток на лунку в 96-луночные планшеты с круглым дном. В этом анализе РВМС являются источником эффекторных клеток натуральных киллеров (NK) и целевых Т-клеток (CD4 памяти и непамяти, CD8 памяти и непамяти). Клетки памяти и клетки, не относящиеся к клеткам памяти, различали по экспрессии CD45RO+ (клетки памяти представляют собой CD45RO+; клетки, не относящиеся к

клеткам памяти, представляют собой CD45RO⁻). Серийные разведения гибридных белков LFA3-Fc добавляли в лунки, и клетки инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение приблизительно 20 ч.

Планшеты центрифугировали при 300×g (ускорение) в течение 5 мин при комнатной температуре (RT). PBMC промывали ледяным буфером для сортировки активируемых флуоресценцией клеток (FACS) и ресуспендировали в 50 мкл ледяного буфера для FACS, содержащего конъюгированные с флуоресценцией антитела для окрашивания субпопуляций лимфоцитов. Панель окрашивания включала: CD3 (BUV496), CD4 (BUV395), CD8 (PerCP-e710), CD45RO (PeCy7), CD45RA (FITC), CD25 (PE-CF594), CD56 (BV421), CD2 (PE), и жизнеспособность оценивали в ближнем инфракрасном (ИК) диапазоне.

После инкубации в течение 15-30 мин при 4°C, PBMC дважды промывали ледяным буфером для FACS и ресуспендировали в 100 мкл 0,5% параформальдегида (PFA) в ФСБ. Гранулы CountBright™ Absolute Counting (Thermo Fisher Scientific) добавляли в каждую лунку (10 мкл). Планшеты анализировали с помощью проточной цитометрии (BD LSRFortessa™ Cell Analyzer).

Анализ цитотоксичности титрованием НК.

Свежевыделенные PBMC оставляли на ночь в полной RPMI + 10% FBS при 5×10⁶ клеток/мл. На следующий день клетки-мишени (CD4 клетки памяти, CD4 наивные клетки или В-клетки) выделяли с использованием наборов для выделения от STEMCELL Technologies. Также были выделены соответствующие клетки-натуральные киллеры (НК) от того же донора. Объем 50 мкл клеток-мишеней высевали из расчета 30000 клеток на лунку в 96-луночный планшет с V-образным дном. НК-клетки были приготовлены в 2-кратных серийных разведениях и 50 мкл были добавлены к клеткам-мишеням. Полипептиды LFA3-Fc получали при 10-кратном увеличении до конечной рабочей концентрации 100 нМ. В соответствующие лунки добавляли 11 мкл полипептида и планшеты инкубировали в течение 4 ч при 37°C. Планшеты промывали и окрашивали буфером для окрашивания, содержащим аннексии V Alexa Fluor 488, 7-AAD, CD56 BV421 и CD4 APH-H7 в течение 30 мин. Клетки промывали связывающим буфером аннексии V, фиксировали в течение 10 мин 2% PFA в ФСБ, промывали, затем анализировали проточной цитометрией. Гранулы CountBright включали в каждую лунку для определения абсолютных количеств.

Анализ данных.

Кривые титрования цитотоксичности были построены путем построения графика процента цитотоксичности антиген-связывающей популяции против логарифма концентрации полипептида LFA3-Fc. Процент цитотоксичности рассчитывали как разницу в абсолютных количествах живых клеток в необработанных контролях за вычетом экспериментального образца, деленную на необработанные контроли, умноженную на 100. Процент специфической цитотоксичности рассчитывали как разницу в абсолютных количествах живых клеток в необработанных контролях минус экспериментальный образец, деленную на разницу между необработанными контролями минус изотипический контроль, умноженную на 100. Эффективную концентрацию при 50% максимального ответа (EC₅₀) определяли с использованием аппроксимации кривой нелинейной регрессии GraphPad Prism® (версия 6.0, GraphPad Software, Inc, Сан-Диего, Калифорния) и логарифма сигмоидальной функции модели дозозависимого эффекта антагониста.

Результаты.

LFA3-Fc WT и LFA3-Fc M1d1 индуцировали ADCC во всех протестированных типах клеток. LFA3-Fc M1d1 продемонстрировал повышенную активность ADCC в клетках памяти и без памяти по сравнению с LFA3-Fc WT (табл. 17, фиг. 12A-12E).

Таблица 17

Индукция ADCC полипептидом LFA3-Fc

Тип клетки	LFA3-Fc M1d1 EC ₅₀ (нМ)		LFA3-Fc WT EC ₅₀ (нМ)	
	Среднее	SEM	Среднее	SEM
CD4 CD45RO ⁺ клетки памяти	0,348	0,098	1,559	0,425
CD4 CD45RO ⁻ клетки непамяти	1,256	0,446	4,466	2,447
CD8 CD45RO ⁺ клетки памяти	0,716	0,116	57,2	55,2
CD8 CD45RO ⁻ клетки непамяти	0,787	0,279	49,7	47,3

n=5 для каждого типа клеток.

LFA3-Fc WT и LFA3-Fc M1d1 вызывали преимущественное уничтожение выделенных клеток памяти, которые экспрессируют высокие уровни CD2 по сравнению с наивными клетками или В-клетками.

Таблица 18

Цитотоксичность NK

Тип клеток	Максимальная цитотоксичность (%)	
	LFA3-Fc M1d1	LFA3-Fc WT
CD4 памяти	51,39	51,49
Наивные CD4	19,36	28,74
В клетки	4,08	ND

ND = не определено.

В альтернативном анализе для оценки цитотоксичности, опосредованной NK, использовали очищенные NK-клетки, культивируемые в возрастающих соотношениях с клетками-мишенями. Титрационный анализ цитотоксичности NK с использованием более концентрированного полипептида на множестве доноров подтвердил предпочтительное уничтожение выделенных клеток памяти. Очищенные популяции клеток-мишеней (CD4-клетки памяти, наивные CD4 и В-клетки) культивировали с NK-клетками при различных соотношениях эффектор-мишень и 100 нМ LFA3-Fc WT или LFA3-Fc M1d1 (фиг. 13B, 13C). При соотношении эффектор-мишень (E:T) 10:1 и концентрации белка 100 нМ LFA3-Fc WT и LFA3-Fc M1d1 индуцировали цитотоксичность в клетках памяти CD4 и наивных клетках (табл. 19).

Таблица 19

Цитотоксичность NK

Тип клеток	LFA3-Fc M1d1 Максимальная цитотоксичность (%)		LFA3-Fc WT Максимальная цитотоксичность (%)	
	Среднее	SEM	Среднее	SEM
	CD4 клетки памяти	22.31	4.23	9.07
Наивные CD4 клетки	3.98	2.86	0.14	1.99

n = 3 для каждого типа клеток.

Это исследование продемонстрировало индукцию белком LFA3-Fc ADCC CD2+ Т-клеток в анализах *in vitro* с использованием РВМС человека. LFA3-Fc M1d1 был в 3-4 раза более эффективен при индукции ADCC CD4 клеток памяти, чем LFA3-Fc WT. LFA3-Fc M1d1 преимущественно нацелен на CD4+ Т-клетки памяти, которые, как известно, экспрессируют более высокие уровни белка CD2 по сравнению с наивными CD4 Т-клетками. Таким образом, эти исследования демонстрируют, что терапевтический полипептид LFA3-Fc M1d1 индуцирует ADCC целевых CD2+ Т-клеток.

Новые и полезные характеристики вариантов LFA3-Fc

Характеристика	LFA3-Fc WT	LFA-Fc M1d1*
Аминокислотная последовательность		
Домен LFA3	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:26
Изменения относительно SEQ ID NO:3		A36V, L38F, F43V, M86F, 92insL
Домен Fc	SEQ ID NO: 128	SEQ ID NO: 16
Изменения относительно SEQ ID NO: 128		D136E, L138M, 226delK
LFA3-Fc	SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO:69
Изменения относительно SEQ ID NO: 4		A36V, L38F, F43V, M86F, V92_D93insL, D228E, L230M, 319delK
Нуклеотидная последовательность		
Домен LFA3	SEQ ID NO: 126	SEQ ID NO: 53
Домен Fc	SEQ ID NO: 127	SEQ ID NO: 43
LFA3-Fc	SEQ ID NO: 125	SEQ ID NO: 123
ADCC		
CD4 T _{mem} EC ₅₀	1,559 +/- 0,425 нМ	0,348 +/- 0,098 нМ
CD4 T _{non-mem} EC ₅₀	4,466 +/- 2,447 нМ	1,256 +/- 0,446 нМ
CD8 T _{mem} EC ₅₀	57,2 +/- 55,2 нМ	0,716 +/- 0,116 нМ
CD8 T _{non-mem} EC ₅₀	49,7 +/- 47,3 нМ	0,787 +/- 0,279 нМ
Термическая стабильность LFA3-Fc		
Tris pH 7.5	59,7°	66,3°
Гистидин pH 5.8	60,9°	64,01°
Глутамат pH 4.5	56,4°	61,4°
Термическая стабильность		
DSC	Tm1, 47°C	Tm1, 65°C
DSF	Tm1, 40°C	Tm1 60°C
Термическая стабильность домена LFA3	52,2°	64,8°
Стабильность в зависимости от времени	Значительная нестабильность при низком pH; более высокая скорость агрегации при 25°C и	Превосходная стабильность для фрагментации

	40°C	
Чистота	97%	99%
Растворимость в буфере с глутаматом, трегалозой и ЕДТК, рН4,5	165 мг/мл	148 мг/мл
Композиция гликанов	22 нмоль сиаловой кислоты/ нмоль полипептида	9-14 нмоль сиаловой кислоты/ нмоль полипептида
Выход	4,95 мг/20 мл культуры	7 мг/20 мл культуры
Мономерные виды белка А (%)	73,9% мономера; 18% HMWS; 7,1% LMWS	>99% мономера
Аналитическая SEC	99,2% мономера	99,6% мономера
Термическая стабильность		
DSC	T _{m1} , 47°C	T _{m1} , 65°C
DSF	T _{m1} , 40°C	T _{m1} 60°C
Склонность к принудительной агрегации	40°C HMWS увеличение до ~23% 50°C HMWS увеличение до ~29%	40°C нет увеличения HMWS 50°C HMWS увеличение до 3%
Удержание низкого рН (5 ч)	11% HMWS, нет увеличения LMWS	4% HMWS, нет увеличения LMWS
Замораживание-оттаивание (5 циклов)	~2% увеличение в HMWS	Нет увеличения в HWS
Аффинность с помощью SPR к рекомбинантному CD2 человека (K _D)	1,41-1,47 мкМ	0,73 – 1,08 мкМ
Аффинность с помощью SPR к рекомбинантному CD2 яванского макака CD2 (K _D)	1,5 мкМ	1,06 мкМ
Клеточное связывание (CD4 T _{mem}) K _d	501 пМ	94 пМ
MLR (IC ₅₀)	2,48 нМ	0,302 нМ
TTR (IC ₅₀)	28,4 нМ	1,34 нМ

* Приведенное в качестве примера воплощение, охватывающее все варианты LFA3-Fc, раскрытые в данном документе.

Хотя раскрытые руководства были описаны со ссылкой на различные применения, способы, наборы и композиции, следует принимать во внимание, что различные изменения и модификации могут быть сделаны без отступления от руководств в данном документе и заявленного ниже изобретения. Вышеупомянутые примеры предоставлены для лучшей иллюстрации раскрытых принципов и не предназначены для ограничения объема руководств, представленных в данном документе. Хотя настоящие руководства были описаны в терминах этих приведенных в качестве примера воплощений, квалифицированный специалист легко поймет, что многочисленные варианты и модификации этих приведенных в качестве примера воплощений возможны без проведения излишних экспериментов. Все такие вариации и модификации находятся в пределах объема настоящих руководств.

Все ссылки, процитированные в данном документе, включая патенты, заявки на патенты, статьи, учебники и т.п., а также ссылки, цитируемые в них, в той степени, в которой они еще не включены, настоящим включены путем отсылки во всей их полноте для всех целей. В случае, если один или несколько включенных литературных источников и подобных материалов отличаются от данной заявки или противоречат ей, включая, помимо прочего, определенные термины, использование терминов, описанные методы и т.п., данная заявка имеет преимущественную силу.

Специалистам в данной области техники будет очевидно, что в настоящее изобретение могут быть внесены различные модификации и изменения, не выходящие за рамки объема или сущности изобретения. Другие воплощения изобретения будут очевидны специалистам в данной области на основе рассмотрения описания и практического осуществления данного изобретения. Подразумевается, что описание и примеры, которые рассматриваются исключительно как приведенные в качестве примера, в то время как рамки и сущность изобретения определены с помощью формулы изобретения, представленной ниже.

Перечень последовательностей

<110> PFIZER INC.
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA

<120> ВАРИАНТЫ LFA3 И ИХ КОМПОЗИЦИИ И ПРИМЕНЕНИЕ

<130> PC72432A

<150> US 62/650,002

<151> 2018-03-29

<150> US 62/783,986

<151> 2018-12-21

<160> 130

<170> версия PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 250

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 1

Met Val Ala Gly Ser Asp Ala Gly Arg Ala Leu Gly Val Leu Ser Val
1 5 10 15

Val Cys Leu Leu His Cys Phe Gly Phe Ile Ser Cys Phe Ser Gln Gln
20 25 30

Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His Val Pro Ser Asn
35 40 45

Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys Asp Lys Val Ala
50 55 60

Glu Leu Glu Asn Ser Glu Phe Arg Ala Phe Ser Ser Phe Lys Asn Arg
65 70 75 80

Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile Tyr Asn Leu Thr
85 90 95

Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Pro Asn Ile Thr Asp
100 105 110

Thr Met Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu Glu Ser Leu Pro Ser Pro Thr
115 120 125

Leu Thr Cys Ala Leu Thr Asn Gly Ser Ile Glu Val Gln Cys Met Ile
130 135 140

Pro Glu His Tyr Asn Ser His Arg Gly Leu Ile Met Tyr Ser Trp Asp
145 150 155 160

Cys Pro Met Glu Gln Cys Lys Arg Asn Ser Thr Ser Ile Tyr Phe Lys
165 170 175

Met Glu Asn Asp Leu Pro Gln Lys Ile Gln Cys Thr Leu Ser Asn Pro
180 185 190

Leu Phe Asn Thr Thr Ser Ser Ile Ile Leu Thr Thr Cys Ile Pro Ser
195 200 205

Ser Gly His Ser Arg His Arg Tyr Ala Leu Ile Pro Ile Pro Leu Ala
210 215 220

Val Ile Thr Thr Cys Ile Val Leu Tyr Met Asn Gly Ile Leu Lys Cys
225 230 235 240

Asp Arg Lys Pro Asp Arg Thr Asn Ser Asn
245 250

<210> 2

<211> 222

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 2

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Ala Glu Leu Glu Asn Ser Glu Phe Arg Ala Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Pro
65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Met Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu Glu Ser Leu
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Leu Thr Cys Ala Leu Thr Asn Gly Ser Ile Glu Val
100 105 110

Gln Cys Met Ile Pro Glu His Tyr Asn Ser His Arg Gly Leu Ile Met
115 120 125

Tyr Ser Trp Asp Cys Pro Met Glu Gln Cys Lys Arg Asn Ser Thr Ser
130 135 140

Ile Tyr Phe Lys Met Glu Asn Asp Leu Pro Gln Lys Ile Gln Cys Thr
145 150 155 160

Leu Ser Asn Pro Leu Phe Asn Thr Thr Ser Ser Ile Ile Leu Thr Thr
165 170 175

Cys Ile Pro Ser Ser Gly His Ser Arg His Arg Tyr Ala Leu Ile Pro
180 185 190

Ile Pro Leu Ala Val Ile Thr Thr Cys Ile Val Leu Tyr Met Asn Gly
195 200 205

Ile Leu Lys Cys Asp Arg Lys Pro Asp Arg Thr Asn Ser Asn
210 215 220

<210> 3

<211> 92

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 3

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Ala Glu Leu Glu Asn Ser Glu Phe Arg Ala Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Pro
65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Met Lys Phe Phe Leu Tyr Val
85 90

<210> 4
<211> 319
<212> белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 4

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Ala Glu Leu Glu Asn Ser Glu Phe Arg Ala Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Pro
65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Met Lys Phe Phe Leu Tyr Val Asp Lys Thr His
85 90 95

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
100 105 110

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
115 120 125

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
130 135 140

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
145 150 155 160

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
165 170 175

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
180 185 190

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
195 200 205

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
210 215 220

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
225 230 235 240

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
245 250 255

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
260 265 270

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
275 280 285

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
290 295 300

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
305 310 315

<210> 5

<211> 69

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>

<221> прочий_признак

<222> (20)..(20)

<223> V представляет собой A, C или G

<220>

<221> прочий_признак

<222> (22)..(22)

<223> K представляет собой G или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (26)..(26)

<223> N представляет собой A, C, G или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (33)..(33)

<223> N представляет собой A, C, G или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (42)..(42)

<223> N представляет собой A, C, G или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (44)..(44)
 <223> V представляет собой A, C или G

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (46)..(46)
 <223> M представляет собой A или C

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (48)..(48)
 <223> N представляет собой A, C, G или T

<400> 5
 gagtaacgtt cctttgaagv akgtcntttg gangaaacaа angvamangg tggcagaatt 60
 agagaatag 69

<210> 6
 <211> 76
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (26)..(26)
 <223> V представляет собой A, C или G

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (28)..(28)
 <223> K представляет собой G или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (34)..(34)
 <223> M представляет собой A или C

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (41)..(41)
 <223> V представляет собой A, C или G

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (43)..(43)
 <223> K представляет собой G или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (48)..(48)
 <223> N представляет собой A, C, G, или T

<220>

<221> прочий_признак
 <222> (53)..(53)
 <223> N представляет собой A, C, G, или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (54)..(54)
 <223> W представляет собой A или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (56)..(56)
 <223> R представляет собой A или G

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (57)..(57)
 <223> S представляет собой G или C

<400> 6
 gaaaaaaaca aaagataaag tggcavaktt avamaatagt vaktttangg ctnwtrsttc 60
 atttaagaat agggtc 76

<210> 7
 <211> 52
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (18)..(18)
 <223> N представляет собой A, C, G или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (23)..(23)
 <223> N представляет собой A, C, G или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (29)..(29)
 <223> V представляет собой A, C или G

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (31)..(31)
 <223> M представляет собой A или C

<400> 7
 gtacgaaatg gagtcccnta atnttacava macaatgaag tttttttgt ac 52

<210> 8
 <211> 81
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>
<221> прочий_признак
<222> (19)..(19)
<223> N представляет собой A, C, G или T

<220>
<221> прочий_признак
<222> (25)..(25)
<223> N представляет собой A, C, G или T

<220>
<221> прочий_признак
<222> (43)..(43)
<223> N представляет собой A, C, G или T

<220>
<221> прочий_признак
<222> (52)..(52)
<223> N представляет собой A, C, G или T

<220>
<221> прочий_признак
<222> (59)..(59)
<223> K представляет собой G или T

<220>
<221> прочий_признак
<222> (60)..(60)
<223> S представляет собой G или C

<400> 8
gtttacggta atgtgactnt tcacnttccg agtaacgttc cntntaagga antttatks 60

aaaaaаааа ааgатаааgт g 81

<210> 9
<211> 78
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>
<221> прочий_признак
<222> (26)..(26)
<223> N представляет собой A, C, G, или T

<220>
<221> прочий_признак
<222> (29)..(29)
<223> K представляет собой G или T

<220>
<221> прочий_признак

<222> (30)..(30)

<223> Y представляет собой C или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (35)..(35)

<223> N представляет собой A, C, G, или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (50)..(50)

<223> N представляет собой A, C, G, или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (56)..(56)

<223> K представляет собой G или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (57)..(57)

<223> Y представляет собой C или T

<400> 9

cttatggaaa aaasaanaag ataaantky agaantgag aatagtagn ttaggkyatt 60

tagtcattt aagaatag 78

<210> 10

<211> 67

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>

<221> прочий_признак

<222> (21)..(21)

<223> N представляет собой A, C, G или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (36)..(36)

<223> R представляет собой A или G

<220>

<221> прочий_признак

<222> (37)..(37)

<223> S представляет собой G или C

<220>

<221> прочий_признак

<222> (42)..(42)

<223> N представляет собой A, C, G или T

<400> 10

catttaaga tagggtctat nttgatactg tatccrsttc tntaccatt tataatntaa 60

saagtag 67

<210> 11
 <211> 71
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (19)..(19)
 <223> W представляет собой A или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (21)..(21)
 <223> S представляет собой G или C

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (46)..(46)
 <223> W представляет собой A или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (48)..(48)
 <223> S представляет собой G или C

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (52)..(52)
 <223> N представляет собой A, C, G или T

<400> 11
 gatgaagacg agtacgaawt sgagtccct aatattacag acacawtsaa gnttttttg 60

tacgttttg g 71

<210> 12
 <211> 66
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (22)..(23)
 <223> N представляет собой A, C, G, или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (24)..(24)
 <223> K представляет собой G или T

<220>

<221> прочий_признак
 <222> (25)..(26)
 <223> N представляет собой A, C, G, или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (27)..(27)
 <223> K представляет собой G или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (28)..(29)
 <223> N представляет собой A, C, G, или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (30)..(30)
 <223> K представляет собой G или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (31)..(32)
 <223> N представляет собой A, C, G, или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (33)..(33)
 <223> K представляет собой G или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (34)..(35)
 <223> N представляет собой A, C, G, или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (36)..(36)
 <223> K представляет собой G или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (37)..(38)
 <223> N представляет собой A, C, G, или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (39)..(39)
 <223> K представляет собой G или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (40)..(41)
 <223> N представляет собой A, C, G, или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (42)..(42)
 <223> K представляет собой G или T

<400> 12
 gaagacgagt acgaaatgga gnnknnknnk nnknnknnkn nkatgaagtt tttttgtac 60

gttttg 66

<210> 13

<211> 65

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>

<221> прочий_признак

<222> (22)..(23)

<223> N представляет собой A, C, G, или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (24)..(24)

<223> K представляет собой G или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (25)..(26)

<223> N представляет собой A, C, G, или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (27)..(27)

<223> K представляет собой G или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (28)..(29)

<223> N представляет собой A, C, G, или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (30)..(30)

<223> K представляет собой G или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (31)..(32)

<223> N представляет собой A, C, G, или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (33)..(33)

<223> K представляет собой G или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (34)..(35)

<223> N представляет собой A, C, G, или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (36)..(36)

<223> K представляет собой G или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (37)..(38)
 <223> N представляет собой A, C, G, или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (39)..(39)
 <223> K представляет собой G или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (40)..(41)
 <223> N представляет собой A, C, G, или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (42)..(42)
 <223> K представляет собой G или T

<400> 13
 gaagacgagt acgaaatgga gnnknnknkn nnknnknkn nktcaagtt tttttgtac 60

gttgg 65

<210> 14
 <211> 64
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (22)..(23)
 <223> N представляет собой A, C, G или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (24)..(24)
 <223> K представляет собой G или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (25)..(26)
 <223> N представляет собой A, C, G или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (27)..(27)
 <223> K представляет собой G или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (28)..(29)
 <223> N представляет собой A, C, G или T

<220>
 <221> прочий_признак

<222> (30)..(30)

<223> К представляет собой G или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (31)..(32)

<223> N представляет собой A, C, G или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (33)..(33)

<223> К представляет собой G или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (34)..(35)

<223> N представляет собой A, C, G или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (36)..(36)

<223> К представляет собой G или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (37)..(38)

<223> N представляет собой A, C, G или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (39)..(39)

<223> К представляет собой G или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (40)..(41)

<223> N представляет собой A, C, G или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (42)..(42)

<223> К представляет собой G или T

<400> 14

gaagacgagt acgaattcga gnnknnknnk nnknnknnkn nktcaagtt tttttgtac 60

gttg 64

<210> 15

<211> 19

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 15

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser

<210> 16

<211> 226

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 16

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

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

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly
225

<210> 17

<211> 92

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 17

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Ala Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Pro
65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val
85 90

<210> 18

<211> 92

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 18

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys

20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Ala Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Phe Glu Ser Pro
65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val
85 90

<210> 19

<211> 92

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 19

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Val Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Pro
65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val
85 90

<210> 20

<211> 92

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 20

046734

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Val Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Phe Glu Ser Pro
65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val
85 90

<210> 21

<211> 92

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 21

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Ile Arg Val Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Phe Glu Ser Pro
65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val
85 90

<210> 22

<211> 92

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 22

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Leu Glu Phe Glu Asn Ser Glu Leu Arg Val Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Phe Glu Ser Pro
65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val
85 90

<210> 23

<211> 92

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 23

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Ala Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Pro
65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Met Lys Phe Phe Leu Tyr Val

85 90

<210> 24

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 24

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Ala Glu Leu Glu Asn Ser Glu Phe Arg Ala Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Pro
65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Met Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu
85 90

<210> 25

<211> 98

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 25

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Ala Glu Leu Glu Asn Ser Glu Phe Arg Ala Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Pro
65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Met Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu Glu Ser Leu
85 90 95

Pro Ser

<210> 26

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 26

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Ala Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Pro
65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu
85 90

<210> 27

<211> 98

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 27

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys

20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Ala Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Pro
65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu Glu Ser Leu
85 90 95

Pro Ser

<210> 28

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 28

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Val Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Phe Glu Ser Pro
65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu
85 90

<210> 29

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 29

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Ala Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Pro
65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Met Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu
85 90

<210> 30

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 30

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Ala Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Arg
65 70 75 80

Asn Gly Gly Pro Asp Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu
85 90

<210> 31
<211> 93
<212> белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 31

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Ala Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Arg
65 70 75 80

Asn Pro Tyr Arg Arg Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu
85 90

<210> 32
<211> 93
<212> белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 32

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Ala Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Arg

65 70 75 80

Asn Pro Tyr Arg Asp Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu
85 90

<210> 33

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 33

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Ala Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Trp
65 70 75 80

Asn Gly Gly Pro Asp Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu
85 90

<210> 34

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 34

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Ala Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Trp
65 70 75 80

Asn Pro Tyr Arg Arg Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu
85 90

<210> 35

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 35

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Ala Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Trp
65 70 75 80

Asn Pro Tyr Arg Asp Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu
85 90

<210> 36

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 36

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys

20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Ala Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Gly Arg
65 70 75 80

Tyr Pro Tyr Glu Ser Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu
85 90

<210> 37

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 37

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Val Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Phe Glu Ser Trp
65 70 75 80

Glu Pro Gly Arg Glu Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu
85 90

<210> 38

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 38

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Ala Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ala Arg
65 70 75 80

Tyr Pro Tyr Arg Gln Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu
85 90

<210> 39

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 39

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Ala Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Met Arg
65 70 75 80

Asn Gly Gly Pro Asp Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu
85 90

<210> 40

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 40

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Ala Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ala Arg
65 70 75 80

Asp Gly Gly Pro Asp Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu
85 90

<210> 41

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 41

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Ala Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Trp
65 70 75 80

Ser Pro Tyr Lys Ala Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu

85 90

<210> 42
 <211> 57
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 42
 atgggctggt cctgtatcat cctcttctg gtggccacag ctaccggagt gcatagc 57

<210> 43
 <211> 678
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 43
 gacaaaactc acacatgccc accgtgcccc gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 60
 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggta agttcaactg gtacgtggac 180
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240
 cgtgtggta cgcctctcac cgtctgcac caggactggc tgaatggca ggagtacaag 300
 tgcaaggtct ccaacaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa 360
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggaaga gatgaccaag 420
 aaccaggta ccctgacctg cctgtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gttggactcc 540
 gacggtctct tcttctcta cagcaagtc accgtggaca agagcagggt gcagcagggg 600
 aacgtcttct catgctcctg gatgatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660
 ctctccctgt ctccgggt 678

<210> 44
 <211> 276
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 44
 tttcacagc agatttacgg tgtgtttac ggtaatgtga ctttcacgt tccgagtaac 60
 gttccttga aggaagtctt atggaaaaa caaaaagata aagttgtaga atttgagaat 120

agtgaggta gggcatttag tcatttaag aatagggtct attggatac tgtatccggt 180
tccttgacca ttataattt aacaagtagt gatgaagacg agtacgaaat ggagtcacct 240
aatattacag acacattcaa gtttttttg tacgtt 276

<210> 45
<211> 276
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 45
tttcacagc agattacgg tgtgtttac ggtaatgtga ctttcacgt tccgagtaac 60
gttccttga aggaagtct atggaaaaa caaaaagata aagttgtaga attgagaat 120
agtgaggta gggcatttag tcatttaag aatagggtct attggatac tgtatccggt 180
tccttgacca ttataattt aacaagtagt gatgaagacg agtacgaaat cgagtcacct 240
aatattacag acacattcaa gtttttttg tacgtt 276

<210> 46
<211> 276
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 46
tttcacagc agattacgg tgtgtttac ggtaatgtga ctttcacgt tccgagtaac 60
gttccttga aggaagtct atggaaaaa caaaaagata aagttgtaga attgagaat 120
agtgaggta gggcatttag tcatttaag aatagggtct attggatac tgtatccggt 180
tccttgacca ttataattt aacaagtagt gatgaagacg agtacgaaat ggagtcacct 240
aatattacag acacattcaa gtttttttg tacgtt 276

<210> 47
<211> 276
<212> ДНК
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 47
tttcacagc agattacgg tgtgtttac ggtaatgtga ctttcacgt tccgagtaac 60
gttccttga aggaagtct atggaaaaa caaaaagata aagttgtaga attgagaat 120
agtgaggta gggcatttag tcatttaag aatagggtct attggatac tgtatccggt 180

tccttgacca ttataattt aacaagtagt gatgaagacg agtacgaatt cgagtcacct 240

aatattacag acacattcaa gtttttttg tacgtt 276

<210> 48

<211> 276

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 48

tttcacagc agatttacgg tgtgtttac ggtaatgtga ctttcacgt tccgagtaac 60

gttcctttga aggaagtctt atggaaaaa caaaaagata aagttgtaga attgagaat 120

agtgagatta gggattttag tcatttaag aatagggtct attggatac tgtatccggt 180

tccttgacca ttataattt aacaagtagt gatgaagacg agtacgaatt cgagtcacct 240

aatattacag acacattcaa gtttttttg tacgtt 276

<210> 49

<211> 276

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 49

tttcacagc agatttacgg tgtgtttac ggtaatgtga ctttcacgt tccgagtaac 60

gttcctttga aggaagtctt atggaaaaa caaaaagata aagttttaga attgagaat 120

agtgagctta gggattttag tcatttaag aatagggtct attggatac tgtatccggt 180

tccttgacca ttataattt aacaagtagt gatgaagacg agtacgaatt cgagtcacct 240

aatattacag acacattcaa gtttttttg tacgtt 276

<210> 50

<211> 276

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 50

tttcacagc agatttacgg tgtgtttac ggtaatgtga ctttcacgt tccgagtaac 60

gttcctttga aggaagtctt atggaaaaa caaaaagata aagttgtaga attgagaat 120

agtgagggta gggcatttag tcatttaag aatagggtct attggatac tgtatccggt 180

tccttgacca ttataattt aacaagtagt gatgaagacg agtacgaaat ggagtcacct 240

aatattacag acacaatgaa gtttttttg tacgtt 276

<210> 51

<211> 279

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 51

ttttcccaac aaatatatgg tgttgtgtat gggaatgtaa ctttccatgt accaagcaat 60

gtgcctttaa aagaggtcct atggaaaaa caaaaggata aagttgcaga actggaaaat 120

tctgaattca gagctttctc atctttaaa aatagggttt attagacac tgtgtcaggt 180

agcctcacta tctacaactt aacatcatca gatgaagatg agtatgaaat ggaatcgcca 240

aatattactg ataccatgaa gttctttctt tatgtcctc 279

<210> 52

<211> 294

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 52

ttttcccaac aaatatatgg tgttgtgtat gggaatgtaa ctttccatgt accaagcaat 60

gtgcctttaa aagaggtcct atggaaaaa caaaaggata aagttgcaga actggaaaat 120

tctgaattca gagctttctc atctttaaa aatagggttt attagacac tgtgtcaggt 180

agcctcacta tctacaactt aacatcatca gatgaagatg agtatgaaat ggaatcgcca 240

aatattactg ataccatgaa gttctttctt tatgtccttg agagtctgcc cagc 294

<210> 53

<211> 279

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 53

tttccacagc agatttacgg tgtgttttac ggtaatgtga ctttccatgt tccgagtaac 60

gttcctttga aggaagtctt atggaaaaa caaaaagata aagttgtaga atttgagaat 120

agtgaggtta gggcatttag tcatttaag aatagggtct atttggatac tgtatccggt 180

tctttgacca ttataattt aacaagtagt gatgaagacg agtacgaaat ggagtcccct 240

aatattacag acacattcaa gtttttttg tacgttctc 279

<210> 54
 <211> 294
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 54
 ttttcacagc agatttacgg tgtgttttac ggtaatgtga ctttcacgt tccgagtaac 60
 gttcctttga aggaagtctt atggaaaaaa саааааgата aagttgtaga atttgagaat 120
 agtgaggtta gggcatttag tcatttaag aatagggtct atttgatac tgtatccggt 180
 tctttgacca ttataattt аасааgtagt gatgaagacg agtacgaaat ggagtcccct 240
 аататтасаg асааттсаа gtttttttg tacgttctg agagtctgcc cagc 294

<210> 55
 <211> 279
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 55
 ttttcacagc agatttacgg tgtgttttac ggtaatgtga ctttcacgt tccgagtaac 60
 gttcctttga aggaagtctt atggaaaaaa саааааgата aagttgtaga atttgagaat 120
 agtgaggtta gggcatttag tcatttaag aatagggtct atttgatac tgtatccggt 180
 tctttgacca ttataattt аасааgtagt gatgaagacg agtacgaatt cgagtcccct 240
 аататтасаg асааттсаа gtttttttg tacgttctc 279

<210> 56
 <211> 279
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 56
 ttttcacagc agatttacgg tgtgttttac ggtaatgtga ctttcacgt tccgagtaac 60
 gttcctttga aggaagtctt atggaaaaaa саааааgата aagttgtaga atttgagaat 120
 agtgaggtta gggcatttag tcatttaag aatagggtct atttgatac tgtatccggt 180
 tctttgacca ttataattt аасааgtagt gatgaagacg agtacgaaat ggagtcccct 240
 аататтасаg асааатгаа gtttttttg tacgttctc 279

<210> 57

<211> 279
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 57
 ttttcacagc agatttacgg tgtgtttac ggtaatgtga ctttcacgt tccgagtaac 60
 gttcctttga aggaagtctt atggaaaaa caaaaagata aagttgtaga attgagaat 120
 agtgaggta gggcatttag tcatttaag aatagggtct attggatac tgtatccggt 180
 tctttgacca ttataattt aacaagtagt gatgaagacg agtacgaaat ggagtccagg 240
 aatggggac ctgattcaa gtttttttg tacgttttg 279

<210> 58
 <211> 279
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 58
 ttttcacagc agatttacgg tgtgtttac ggtaatgtga ctttcacgt tccgagtaac 60
 gttcctttga aggaagtctt atggaaaaa caaaaagata aagttgtaga attgagaat 120
 agtgaggta gggcatttag tcatttaag aatagggtct attggatac tgtatccggt 180
 tctttgacca ttataattt aacaagtagt gatgaagacg agtacgaaat ggagtccagg 240
 aatcctata gaaggtcaa gtttttttg tacgttttg 279

<210> 59
 <211> 279
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 59
 ttttcacagc agatttacgg tgtgtttac ggtaatgtga ctttcacgt tccgagtaac 60
 gttcctttga aggaagtctt atggaaaaa caaaaagata aagttgtaga attgagaat 120
 agtgaggta gggcatttag tcatttaag aatagggtct attggatac tgtatccggt 180
 tctttgacca ttataattt aacaagtagt gatgaagacg agtacgaaat ggagtccagg 240
 aatcctata gagactcaa gtttttttg tacgttttg 279

<210> 60
 <211> 279
 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 60

ttttcacagc agatttacgg tgtgtttac ggtaatgtga ctttcacgt tccgagtaac 60

gttcctttga aggaagtctt atggaaaaaa caaaaagata aagttgtaga atttgagaat 120

agtgaggta gggcatttag tcatttaag aatagggtct attggatac tgtatccggt 180

tctttgacca ttataattt aacaagtagt gatgaagacg agtacgaaat ggagtcctgg 240

aatggtggac ctgattcaa gtttttttg tacgttttg 279

<210> 61

<211> 279

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 61

ttttcacagc agatttacgg tgtgtttac ggtaatgtga ctttcacgt tccgagtaac 60

gttcctttga aggaagtctt atggaaaaaa caaaaagata aagttgtaga atttgagaat 120

agtgaggta gggcatttag tcatttaag aatagggtct attggatac tgtatccggt 180

tctttgacca ttataattt aacaagtagt gatgaagacg agtacgaaat ggagtcctgg 240

aatccttata gaaggtcaa gtttttttg tacgttttg 279

<210> 62

<211> 279

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 62

ttttcacagc agatttacgg tgtgtttac ggtaatgtga ctttcacgt tccgagtaac 60

gttcctttga aggaagtctt atggaaaaaa caaaaagata aagttgtaga atttgagaat 120

agtgaggta gggcatttag tcatttaag aatagggtct attggatac tgtatccggt 180

tctttgacca ttataattt aacaagtagt gatgaagacg agtacgaaat ggagtcctgg 240

aatccttata gagactcaa gtttttttg tacgttttg 279

<210> 63

<211> 279

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 63

tttcacagc agatttacgg tgtgtttac ggtaatgtga ctttcacgt tccgagtaac 60

gttcctttga aggaagtctt atggaaaaa caaaaagata aagttgtaga atttgagaat 120

agtgaggta gggcatttag tcatttaag aatagggtct attggatac tgtatccggt 180

tctttgacca ttataattt aacaagtagt gatgaagacg agtacgaaat ggagggtcgg 240

tatccgatg agtcgttcaa gtttttttg tacgtttg 279

<210> 64

<211> 279

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 64

tttcacagc agatttacgg tgtgtttac ggtaatgtga ctttcacgt tccgagtaac 60

gttcctttga aggaagtctt atggaaaaa caaaaagata aagttgtaga atttgagaat 120

agtgaggta gggcatttag tcatttaag aatagggtct attggatac tgtatccggt 180

tctttgacca ttataattt aacaagtagt gatgaagacg agtacgaaat cgagagttgg 240

gagcctggga gggagtcaa gtttttttg tacgtttg 279

<210> 65

<211> 279

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 65

tttcacagc agatttacgg tgtgtttac ggtaatgtga ctttcacgt tccgagtaac 60

gttcctttga aggaagtctt atggaaaaa caaaaagata aagttgtaga atttgagaat 120

agtgaggta gggcatttag tcatttaag aatagggtct attggatac tgtatccggt 180

tctttgacca ttataattt aacaagtagt gatgaagacg agtacgaaat ggaggctcgg 240

tatccttacc ggcagtcaa gtttttttg tacgtttg 279

<210> 66

<211> 279

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 66

ttttcacagc agatttacgg tggtgtttac ggtaatgtga cttttcacgt tccgagtaac 60

gttcctttga aggaagtctt atggaaaaaa caaaaagata aagttgtaga atttgagaat 120

agtgaggta gggcatttag ttcatttaag aatagggtct atttggatac tgtatccggt 180

tctttgacca ttataattt aacaagtagt gatgaagacg agtacgaaat ggagatgcgg 240

aatggtggtc ctgattcaa gtttttttg tacgtttg 279

<210> 67

<211> 279

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 67

ttttcacagc agatttacgg tggtgtttac ggtaatgtga cttttcacgt tccgagtaac 60

gttcctttga aggaagtctt atggaaaaaa caaaaagata aagttgtaga atttgagaat 120

agtgaggta gggcatttag ttcatttaag aatagggtct atttggatac tgtatccggt 180

tctttgacca ttataattt aacaagtagt gatgaagacg agtacgaaat ggagcgcgg 240

gatgggggtc ctgattcaa gtttttttg tacgtttg 279

<210> 68

<211> 279

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 68

ttttcacagc agatttacgg tggtgtttac ggtaatgtga cttttcacgt tccgagtaac 60

gttcctttga aggaagtctt atggaaaaaa caaaaagata aagttgtaga atttgagaat 120

agtgaggta gggcatttag ttcatttaag aatagggtct atttggatac tgtatccggt 180

tctttgacca ttataattt aacaagtagt gatgaagacg agtacgaaat ggagtcgtgg 240

tctccttata aggcgtcaa gtttttttg tacgtttg 279

<210> 69

<211> 319

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 69

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Ala Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Pro
65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val Leu Asp Lys Thr
85 90 95

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
100 105 110

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
115 120 125

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
130 135 140

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
145 150 155 160

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
165 170 175

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
180 185 190

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
195 200 205

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
210 215 220

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
225 230 235 240

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

245 250 255

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
260 265 270

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
275 280 285

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
290 295 300

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
305 310 315

<210> 70

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>

<221> прочий_признак

<222> (25)..(25)

<223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>

<221> прочий_признак

<222> (27)..(27)

<223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>

<221> прочий_признак

<222> (29)..(29)

<223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>

<221> прочий_признак

<222> (32)..(34)

<223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>

<221> прочий_признак

<222> (37)..(37)

<223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>

<221> прочий_признак

<222> (39)..(39)

<223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>

<221> прочий_признак

<222> (42)..(42)

<223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (44)..(44)
 <223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (46)..(47)
 <223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (80)..(80)
 <223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (82)..(82)
 <223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (84)..(84)
 <223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (93)..(93)
 <223> Хаа отсутствует, представляет собой L или LESLPS

<400> 70

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
 1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Xaa Val Xaa Trp Xaa Lys Gln Xaa
 20 25 30

Xaa Xaa Val Ala Xaa Leu Xaa Asn Ser Xaa Phe Xaa Ala Xaa Xaa Ser
 35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
 50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Xaa
 65 70 75 80

Asn Xaa Thr Xaa Thr Met Lys Phe Phe Leu Tyr Val Xaa
 85 90

<210> 71
 <211> 93
 <212> белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>

<221> прочий_признак

<222> (25)..(25)

<223> Хаа представляет собой D, E, N, K, Q, или H

<220>

<221> прочий_признак

<222> (27)..(27)

<223> Хаа представляет собой F, I, L, V, Nle, M, или A

<220>

<221> прочий_признак

<222> (29)..(29)

<223> Хаа представляет собой K, R, M, T, Q, или N

<220>

<221> прочий_признак

<222> (32)..(32)

<223> Хаа представляет собой K, R, M, T, Q, или N

<220>

<221> прочий_признак

<222> (33)..(33)

<223> Хаа представляет собой D, E, N, K, Q, или H

<220>

<221> прочий_признак

<222> (34)..(34)

<223> Хаа представляет собой K, R, M, T, Q, или N

<220>

<221> прочий_признак

<222> (37)..(37)

<223> Хаа представляет собой D, E, N, K, Q, или H

<220>

<221> прочий_признак

<222> (39)..(39)

<223> Хаа представляет собой D, E, N, K, Q, или H

<220>

<221> прочий_признак

<222> (42)..(42)

<223> Хаа представляет собой D, E, N, K, Q, или H

<220>

<221> прочий_признак

<222> (44)..(44)

<223> Хаа представляет собой K, R, M, T, Q, или N

<220>

<221> прочий_признак

<222> (46)..(46)

<223> Хаа представляет собой F, Y, L, H, I, N, V, D, A, или Y

<220>

<221> прочий_признак

<222> (47)..(47)

<223> Хаа представляет собой S, T, A, или G

<220>

<221> прочий_признак

<222> (80)..(80)

<223> Хаа представляет собой P, L, H, R, или A

<220>

<221> прочий_признак

<222> (82)..(82)

<223> Хаа представляет собой F, I, L, V, M, A, или Nle

<220>

<221> прочий_признак

<222> (84)..(84)

<223> Хаа представляет собой D, E, N, K, Q, или H

<220>

<221> прочий_признак

<222> (93)..(93)

<223> Хаа отсутствует, представляет собой L или LESLPS

<400> 71

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Xaa Val Xaa Trp Xaa Lys Gln Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Val Ala Xaa Leu Xaa Asn Ser Xaa Phe Xaa Ala Xaa Xaa Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Xaa
65 70 75 80

Asn Xaa Thr Xaa Thr Met Lys Phe Phe Leu Tyr Val Xaa
85 90

<210> 72

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>

<221> прочий_признак

<222> (25)..(25)

<223> Хаа представляет собой D, E, N, K, Q, или H

- <220>
<221> прочий_признак
<222> (27)..(27)
<223> Хаа представляет собой F, I, L, или V
- <220>
<221> прочий_признак
<222> (29)..(29)
<223> Хаа представляет собой K, R, M, или T
- <220>
<221> прочий_признак
<222> (32)..(32)
<223> Хаа представляет собой K, R, M, или T
- <220>
<221> прочий_признак
<222> (33)..(33)
<223> Хаа представляет собой D, E, N, K, Q, или H
- <220>
<221> прочий_признак
<222> (34)..(34)
<223> Хаа представляет собой K, R, M, или T
- <220>
<221> прочий_признак
<222> (37)..(37)
<223> Хаа представляет собой D, E, N, K, Q, или H
- <220>
<221> прочий_признак
<222> (39)..(39)
<223> Хаа представляет собой D, E, N, K, Q, или H
- <220>
<221> прочий_признак
<222> (42)..(42)
<223> Хаа представляет собой D, E, N, K, Q, или H
- <220>
<221> прочий_признак
<222> (44)..(44)
<223> Хаа представляет собой K, R, M, или T
- <220>
<221> прочий_признак
<222> (46)..(46)
<223> Хаа представляет собой F, Y, L, H, I, N, V, или D
- <220>
<221> прочий_признак
<222> (47)..(47)
<223> Хаа представляет собой S, T, A, или G
- <220>
<221> прочий_признак
<222> (80)..(80)
<223> Хаа представляет собой P, L, H, или R
- <220>
<221> прочий_признак

<222> (82)..(82)

<223> Хаа представляет собой F, I, L, или V

<220>

<221> прочий_признак

<222> (84)..(84)

<223> Хаа представляет собой D, E, N, K, Q, или H

<220>

<221> прочий_признак

<222> (93)..(93)

<223> Хаа отсутствует, представляет собой L или LESLPS

<400> 72

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Xaa Val Xaa Trp Xaa Lys Gln Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Val Ala Xaa Leu Xaa Asn Ser Xaa Phe Xaa Ala Xaa Xaa Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Xaa
65 70 75 80

Asn Xaa Thr Xaa Thr Met Lys Phe Phe Leu Tyr Val Xaa
85 90

<210> 73

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>

<221> прочий_признак

<222> (15)..(15)

<223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>

<221> прочий_признак

<222> (17)..(17)

<223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>

<221> прочий_признак

<222> (23)..(23)

<223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>
<221> прочий_признак
<222> (26)..(26)
<223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>
<221> прочий_признак
<222> (28)..(28)
<223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>
<221> прочий_признак
<222> (35)..(36)
<223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>
<221> прочий_признак
<222> (38)..(38)
<223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>
<221> прочий_признак
<222> (43)..(43)
<223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>
<221> прочий_признак
<222> (45)..(45)
<223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>
<221> прочий_признак
<222> (55)..(55)
<223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>
<221> прочий_признак
<222> (60)..(60)
<223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>
<221> прочий_признак
<222> (62)..(62)
<223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>
<221> прочий_признак
<222> (77)..(77)
<223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>
<221> прочий_признак
<222> (86)..(86)
<223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>
<221> прочий_признак
<222> (88)..(88)
<223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>

<221> прочий_признак

<222> (93)..(93)

<223> Хаа отсутствует, представляет собой L или LESLPS

<400> 73

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Xaa His
1 5 10 15

Xaa Pro Ser Asn Val Pro Xaa Lys Glu Xaa Leu Xaa Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Xaa Xaa Glu Xaa Glu Asn Ser Glu Xaa Arg Xaa Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Xaa Asp Thr Val Ser Xaa Ser Xaa Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Xaa Glu Ser Pro
65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Xaa Lys Xaa Phe Leu Tyr Val Xaa
85 90

<210> 74

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>

<221> прочий_признак

<222> (15)..(15)

<223> Хаа представляет собой F, I, L, V, A, или Y

<220>

<221> прочий_признак

<222> (17)..(17)

<223> Хаа представляет собой F, I, L, V, M, A, или Nle

<220>

<221> прочий_признак

<222> (23)..(23)

<223> X представляет собой F, I, L, V, Nle, M, или A

<220>

<221> прочий_признак

<222> (26)..(26)

<223> Хаа представляет собой F, I, L, V, M, A, или Nle

<220>

<221> прочий_признак

<222> (28)..(28)

<223> Хаа представляет собой W, F, L, C, или Y

<220>

<221> прочий_признак

<222> (35)..(35)

<223> Хаа представляет собой F, I, L, V, M, A, или Nle

<220>

<221> прочий_признак

<222> (36)..(36)

<223> Хаа представляет собой A, V, S, L, или I

<220>

<221> прочий_признак

<222> (38)..(38)

<223> Хаа представляет собой F, I, L, V, Nle, M, или A

<220>

<221> прочий_признак

<222> (43)..(43)

<223> Хаа представляет собой F, I, L, V, A, или Y

<220>

<221> прочий_признак

<222> (45)..(45)

<223> Хаа представляет собой A, V, S, L, или I

<220>

<221> прочий_признак

<222> (55)..(55)

<223> Хаа представляет собой F, I, L, V, Nle, M, или A

<220>

<221> прочий_признак

<222> (60)..(60)

<223> Хаа представляет собой S, T, A, или G

<220>

<221> прочий_признак

<222> (62)..(62)

<223> Хаа представляет собой F, I, L, V, Nle, M, или A

<220>

<221> прочий_признак

<222> (77)..(77)

<223> Хаа представляет собой M, L, I, или F

<220>

<221> прочий_признак

<222> (86)..(86)

<223> Хаа представляет собой M, L, I, или F

<220>

<221> прочий_признак

<222> (88)..(88)

<223> Хаа представляет собой F, I, L, V, A, или Y

<220>

<221> прочий_признак

<222> (93)..(93)

<223> Хаа отсутствует, представляет собой L или LESLPS

<400> 74

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Xaa His
1 5 10 15

Xaa Pro Ser Asn Val Pro Xaa Lys Glu Xaa Leu Xaa Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Xaa Xaa Glu Xaa Glu Asn Ser Glu Xaa Arg Xaa Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Xaa Asp Thr Val Ser Xaa Ser Xaa Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Xaa Glu Ser Pro
65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Xaa Lys Xaa Phe Leu Tyr Val Xaa
85 90

<210> 75

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>

<221> прочий_признак

<222> (15)..(15)

<223> Хаа представляет собой F, I, L, или V

<220>

<221> прочий_признак

<222> (17)..(17)

<223> X представляет собой F, I, L, или V

<220>

<221> прочий_признак

<222> (23)..(23)

<223> Хаа представляет собой F, I, L, или V

<220>

<221> прочий_признак

<222> (26)..(26)

<223> Хаа представляет собой F, I, L, или V

<220>

<221> прочий_признак

<222> (28)..(28)

<223> Хаа представляет собой W, F, L, или C

<220>

<221> прочий_признак

<222> (35)..(35)

<223> Хаа представляет собой F, I, L, или V

<220>

<221> прочий_признак

<222> (36)..(36)

<223> Хаа представляет собой A, V, S, или L

<220>

<221> прочий_признак

<222> (38)..(38)

<223> Хаа представляет собой F, I, L, или V

<220>

<221> прочий_признак

<222> (43)..(43)

<223> Хаа представляет собой F, I, L, или V

<220>

<221> прочий_признак

<222> (45)..(45)

<223> Хаа представляет собой A, V, S, или L

<220>

<221> прочий_признак

<222> (55)..(55)

<223> Хаа представляет собой F, I, L, или V

<220>

<221> прочий_признак

<222> (60)..(60)

<223> Хаа представляет собой S, T, A, или G

<220>

<221> прочий_признак

<222> (62)..(62)

<223> Хаа представляет собой F, I, L, или V

<220>

<221> прочий_признак

<222> (77)..(77)

<223> Хаа представляет собой M, L, I, или F

<220>

<221> прочий_признак

<222> (86)..(86)

<223> Хаа представляет собой M, L, I, или F

<220>

<221> прочий_признак

<222> (88)..(88)

<223> Хаа представляет собой F, I, L, или V

<220>

<221> прочий_признак

<222> (93)..(93)

<223> Хаа отсутствует, представляет собой L или LESLPS

<400> 75

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Xaa His
1 5 10 15

Xaa Pro Ser Asn Val Pro Xaa Lys Glu Xaa Leu Xaa Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Xaa Xaa Glu Xaa Glu Asn Ser Glu Xaa Arg Xaa Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Xaa Asp Thr Val Ser Xaa Ser Xaa Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Xaa Glu Ser Pro
65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Xaa Lys Xaa Phe Leu Tyr Val Xaa
85 90

<210> 76

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>

<221> прочий_признак

<222> (36)..(36)

<223> Xaa может быть любой природной аминокислотой

<220>

<221> прочий_признак

<222> (38)..(38)

<223> Xaa может быть любой природной аминокислотой

<220>

<221> прочий_признак

<222> (43)..(43)

<223> Xaa может быть любой природной аминокислотой

<220>

<221> прочий_признак

<222> (45)..(45)

<223> Xaa может быть любой природной аминокислотой

<220>

<221> прочий_признак

<222> (77)..(77)

<223> Xaa может быть любой природной аминокислотой

<220>

<221> прочий_признак

<222> (86)..(86)

<223> Xaa может быть любой природной аминокислотой

<220>

<221> прочий_признак

<222> (93)..(93)

<223> Хаа отсутствует, представляет собой L или LESLPS

<400> 76

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Xaa Glu Xaa Glu Asn Ser Glu Xaa Arg Xaa Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Xaa Glu Ser Pro
65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Xaa Lys Phe Phe Leu Tyr Val Xaa
85 90

<210> 77

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>

<221> прочий_признак

<222> (36)..(36)

<223> Хаа представляет собой A, V, S, L, или I

<220>

<221> прочий_признак

<222> (38)..(38)

<223> Хаа представляет собой F, I, L, V, Nle, M, или A

<220>

<221> прочий_признак

<222> (43)..(43)

<223> Хаа представляет собой F, I, L, V, A, или Y

<220>

<221> прочий_признак

<222> (45)..(45)

<223> Хаа представляет собой A, V, S, L, или I

<220>

<221> прочий_признак

<222> (77)..(77)

<223> Хаа представляет собой M, L, I, или F

<220>

<221> прочий_признак

<222> (86)..(86)

<223> Хаа представляет собой M, L, I, или F

<220>

<221> прочий_признак

<222> (93)..(93)

<223> Хаа отсутствует, представляет собой L или LESLPS

<400> 77

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Xaa Glu Xaa Glu Asn Ser Glu Xaa Arg Xaa Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Xaa Glu Ser Pro
65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Xaa Lys Phe Phe Leu Tyr Val Xaa
85 90

<210> 78

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>

<221> прочий_признак

<222> (36)..(36)

<223> Хаа представляет собой A, V, S, или L

<220>

<221> прочий_признак

<222> (38)..(38)

<223> Хаа представляет собой F, I, L, или V

<220>

<221> прочий_признак

<222> (43)..(43)

<223> Хаа представляет собой F, I, L, или V

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (45)..(45)
 <223> Хаа представляет собой A, V, S, или L

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (77)..(77)
 <223> Хаа представляет собой M, L, I, или F

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (86)..(86)
 <223> Хаа представляет собой M, L, I, или F

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (93)..(93)
 <223> Хаа отсутствует, представляет собой L или LESLPS

<400> 78

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
 1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
 20 25 30

Asp Lys Val Xaa Glu Xaa Glu Asn Ser Glu Xaa Arg Xaa Phe Ser Ser
 35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
 50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Xaa Glu Ser Pro
 65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Xaa Lys Phe Phe Leu Tyr Val Xaa
 85 90

<210> 79
 <211> 93
 <212> белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (36)..(36)
 <223> Хаа представляет собой V, L, или A

<220>
 <221> прочий_признак

<222> (38)..(38)

<223> Хаа представляет собой F или L

<220>

<221> прочий_признак

<222> (43)..(43)

<223> Хаа представляет собой V, I, L, или F

<220>

<221> прочий_признак

<222> (45)..(45)

<223> Хаа представляет собой A, V, или S

<220>

<221> прочий_признак

<222> (77)..(77)

<223> Хаа представляет собой M, F, I, или L

<220>

<221> прочий_признак

<222> (86)..(86)

<223> Хаа представляет собой F, M, I, или L

<220>

<221> прочий_признак

<222> (93)..(93)

<223> Хаа отсутствует, представляет собой L или LESLPS

<400> 79

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Xaa Glu Xaa Glu Asn Ser Glu Xaa Arg Xaa Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Xaa Glu Ser Pro
65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Xaa Lys Phe Phe Leu Tyr Val Xaa
85 90

<210> 80

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (36)..(36)
 <223> Хаа представляет собой V или L

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (43)..(43)
 <223> Хаа представляет собой V, I, или L

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (45)..(45)
 <223> Хаа представляет собой A или V

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (77)..(77)
 <223> Хаа представляет собой M или F

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (86)..(86)
 <223> Хаа представляет собой F или M

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (93)..(93)
 <223> Хаа отсутствует, представляет собой L или LESLPS

<400> 80

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
 1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
 20 25 30

Asp Lys Val Xaa Glu Phe Glu Asn Ser Glu Xaa Arg Xaa Phe Ser Ser
 35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
 50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Xaa Glu Ser Pro
 65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Xaa Lys Phe Phe Leu Tyr Val Xaa
 85 90

<210> 81
 <211> 93
 <212> белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>
<221> прочий_признак
<222> (36)..(36)
<223> Хаа представляет собой V или L

<220>
<221> прочий_признак
<222> (43)..(43)
<223> Хаа представляет собой V, I, или L

<220>
<221> прочий_признак
<222> (45)..(45)
<223> Хаа представляет собой A или V

<220>
<221> прочий_признак
<222> (77)..(77)
<223> Хаа представляет собой M или F

<220>
<221> прочий_признак
<222> (93)..(93)
<223> Хаа отсутствует, представляет собой L или LESLPS

<400> 81

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Xaa Glu Phe Glu Asn Ser Glu Xaa Arg Xaa Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Xaa Glu Ser Pro
65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val Xaa
85 90

<210> 82
<211> 93
<212> белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (43)..(43)
 <223> Хаа представляет собой V или I

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (45)..(45)
 <223> Хаа представляет собой A или V

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (77)..(77)
 <223> Хаа представляет собой M или F

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (93)..(93)
 <223> Хаа отсутствует, представляет собой L или LESLPS

<400> 82

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
 1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
 20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Xaa Arg Xaa Phe Ser Ser
 35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
 50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Xaa Glu Ser Pro
 65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val Xaa
 85 90

<210> 83
 <211> 7
 <212> белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 83

Ser Pro Asn Ile Thr Asp Thr
 1 5

<210> 84
 <211> 7
 <212> белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (1)..(1)
 <223> Хаа представляет собой S, G, A, M, или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа представляет собой R, W, P, или A

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (3)..(3)
 <223> Хаа представляет собой N, Y, S, E, D, Q, H, K, или R

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (4)..(4)
 <223> Хаа представляет собой P, G, I, L, V, M, A, F, или Nle

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа представляет собой Y, G, T, или S

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (6)..(6)
 <223> Хаа представляет собой R, E, K, P, D, или N

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (7)..(7)
 <223> Хаа представляет собой R, D, S, Q, A, E, T, или S

<400> 84

Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа
 1 5

<210> 85
 <211> 7
 <212> белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (1)..(1)

<223> Хаа представляет собой S, G, A, или M

<220>

<221> прочий_признак

<222> (2)..(2)

<223> Хаа представляет собой R, W, или P

<220>

<221> прочий_признак

<222> (3)..(3)

<223> Хаа представляет собой N, Y, S, E, или D

<220>

<221> прочий_признак

<222> (4)..(4)

<223> Хаа представляет собой P, G, или I

<220>

<221> прочий_признак

<222> (5)..(5)

<223> Хаа представляет собой Y, G, или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (6)..(6)

<223> Хаа представляет собой R, E, K, P, или D

<220>

<221> прочий_признак

<222> (7)..(7)

<223> Хаа представляет собой R, D, S, Q, A, E, или T

<400> 85

Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа

1 5

<210> 86

<211> 7

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>

<221> прочий_признак

<222> (1)..(1)

<223> Хаа представляет собой S, G, A, или M

<220>

<221> прочий_признак

<222> (2)..(2)

<223> Хаа представляет собой R или W

<220>

<221> прочий_признак

<222> (3)..(3)

<223> Хаа представляет собой N, Y, S, E, или D

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (4)..(4)
 <223> Хаа представляет собой Р или G

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа представляет собой Y или G

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (6)..(6)
 <223> Хаа представляет собой R, E, K, или P

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (7)..(7)
 <223> Хаа представляет собой R, D, S, Q, A, или E

<400> 86

Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа
 1 5

<210> 87
 <211> 7
 <212> белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа представляет собой R, W, P, или A

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (4)..(4)
 <223> Хаа представляет собой P, G, I, L, V, M, A, F, или Nle

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа представляет собой Y, G, T, или S

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (6)..(6)
 <223> Хаа представляет собой R, P, D, или N

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (7)..(7)
 <223> Хаа представляет собой R, D, T, или S

<400> 87

Ser Хаа Asn Хаа Хаа Хаа Хаа
1 5

<210> 88
<211> 7
<212> белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>
<221> прочий_признак
<222> (2)..(2)
<223> Хаа представляет собой R, W, или P

<220>
<221> прочий_признак
<222> (4)..(4)
<223> Хаа представляет собой P, G, или I

<220>
<221> прочий_признак
<222> (5)..(5)
<223> Хаа представляет собой Y, G, или T

<220>
<221> прочий_признак
<222> (6)..(6)
<223> Хаа представляет собой R, P, или D

<220>
<221> прочий_признак
<222> (7)..(7)
<223> Хаа представляет собой R, D, или T

<400> 88

Ser Хаа Asn Хаа Хаа Хаа Хаа
1 5

<210> 89
<211> 7
<212> белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>
<221> прочий_признак
<222> (2)..(2)
<223> Хаа представляет собой R или W

<220>
<221> прочий_признак
<222> (4)..(4)
<223> Хаа представляет собой P или G

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа представляет собой Y или G

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (6)..(6)
 <223> Хаа представляет собой R или P

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (7)..(7)
 <223> Хаа представляет собой R или D

<400> 89

Ser Хаа Asn Хаа Хаа Хаа Хаа
 1 5

<210> 90
 <211> 7
 <212> белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (1)..(1)
 <223> Хаа представляет собой S, G, A, M, или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа представляет собой R, W, P, или A

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (3)..(3)
 <223> Хаа представляет собой N, Y, S, E, D, Q, H, K, или R

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (4)..(4)
 <223> Хаа представляет собой P, G, I, L, V, M, A, F, или Nle

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа представляет собой Y, G, T, или S

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (6)..(6)
 <223> Хаа представляет собой R, E, K, P, D, или N

<220>

<221> прочий_признак
<222> (7)..(7)
<223> Хаа представляет собой D, S, Q, A, E, T, или S

<400> 90

Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа
1 5

<210> 91
<211> 7
<212> белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>
<221> прочий_признак
<222> (1)..(1)
<223> Хаа представляет собой S, G, A, или M

<220>
<221> прочий_признак
<222> (2)..(2)
<223> X представляет собой R, W, или P

<220>
<221> прочий_признак
<222> (3)..(3)
<223> Хаа представляет собой N, Y, S, E, или D

<220>
<221> прочий_признак
<222> (4)..(4)
<223> Хаа представляет собой P, G, или I

<220>
<221> прочий_признак
<222> (5)..(5)
<223> Хаа представляет собой Y, G, или T

<220>
<221> прочий_признак
<222> (6)..(6)
<223> Хаа представляет собой R, E, K, P, или D

<220>
<221> прочий_признак
<222> (7)..(7)
<223> Хаа представляет собой D, S, Q, A, E, или T

<400> 91

Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа
1 5

<210> 92
<211> 7

<212> белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (1)..(1)
 <223> Хаа представляет собой S, G, A, или M

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (2)..(2)
 <223> Хаа представляет собой R или W

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (3)..(3)
 <223> Хаа представляет собой N, Y, S, E, или D

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (4)..(4)
 <223> Хаа представляет собой P или G

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (5)..(5)
 <223> Хаа представляет собой Y или G

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (6)..(6)
 <223> Хаа представляет собой R, E, K, или P

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (7)..(7)
 <223> Хаа представляет собой D, S, Q, A, или E

<400> 92

Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа Хаа
 1 5

<210> 93
 <211> 93
 <212> белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (36)..(36)
 <223> Хаа представляет собой V, L, или A

<220>

<221> прочий_признак

<222> (38)..(38)

<223> Хаа представляет собой F или L

<220>

<221> прочий_признак

<222> (43)..(43)

<223> Хаа представляет собой V, I, L, или F

<220>

<221> прочий_признак

<222> (45)..(45)

<223> Хаа представляет собой A, V, или S

<220>

<221> прочий_признак

<222> (77)..(77)

<223> Хаа представляет собой M, F, I, или L

<220>

<221> прочий_признак

<222> (79)..(79)

<223> Хаа представляет собой S, G, A, или M

<220>

<221> прочий_признак

<222> (80)..(80)

<223> Хаа представляет собой R или W

<220>

<221> прочий_признак

<222> (81)..(81)

<223> Хаа представляет собой N, Y, S, E, или D

<220>

<221> прочий_признак

<222> (82)..(82)

<223> Хаа представляет собой P или G

<220>

<221> прочий_признак

<222> (83)..(83)

<223> Хаа представляет собой Y или G

<220>

<221> прочий_признак

<222> (84)..(84)

<223> Хаа представляет собой R, E, K, или P

<220>

<221> прочий_признак

<222> (85)..(85)

<223> Хаа представляет собой R, D, S, Q, A, или E

<220>

<221> прочий_признак

<222> (86)..(86)

<223> Хаа представляет собой F, M, I, или L

<220>

<221> прочий_признак

<222> (93)..(93)

<223> Хаа отсутствует, представляет собой L или LESLPS

<400> 93

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Xaa Glu Xaa Glu Asn Ser Glu Xaa Arg Xaa Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Xaa Glu Xaa Xaa
65 70 75 80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Phe Phe Leu Tyr Val Xaa
85 90

<210> 94

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>

<221> прочий_признак

<222> (36)..(36)

<223> Хаа представляет собой V или A

<220>

<221> прочий_признак

<222> (38)..(38)

<223> Хаа представляет собой F или L

<220>

<221> прочий_признак

<222> (43)..(43)

<223> Хаа представляет собой V, I, или F

<220>

<221> прочий_признак

<222> (45)..(45)

<223> Хаа представляет собой A или V

<220>

<221> прочий_признак

<222> (77)..(77)

<223> Хаа представляет собой M или F

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (79)..(79)
 <223> Хаа представляет собой S, G, A, или M

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (80)..(80)
 <223> Хаа представляет собой R или W

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (81)..(81)
 <223> Хаа представляет собой N, Y, S, E, или D

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (82)..(82)
 <223> Хаа представляет собой P или G

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (83)..(83)
 <223> Хаа представляет собой Y или G

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (84)..(84)
 <223> Хаа представляет собой R, E, K, или P

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (85)..(85)
 <223> Хаа представляет собой R, D, S, Q, A, или E

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (86)..(86)
 <223> Хаа представляет собой F или M

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (93)..(93)
 <223> Хаа отсутствует, представляет собой L или LESLPS

<400> 94

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
 1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
 20 25 30

Asp Lys Val Xaa Glu Xaa Glu Asn Ser Glu Xaa Arg Xaa Phe Ser Ser
 35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
 50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Xaa Glu Xaa Xaa
65 70 75 80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Phe Phe Leu Tyr Val Xaa
85 90

<210> 95

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>

<221> прочий_признак

<222> (45)..(45)

<223> Xaa может быть любой природной аминокислотой

<220>

<221> прочий_признак

<222> (77)..(77)

<223> Xaa может быть любой природной аминокислотой

<220>

<221> прочий_признак

<222> (79)..(85)

<223> Xaa может быть любой природной аминокислотой

<220>

<221> прочий_признак

<222> (93)..(93)

<223> Xaa отсутствует, представляет собой L или LESLPS

<400> 95

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Xaa Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Xaa Glu Xaa Xaa
65 70 75 80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val Xaa

85 90

<210> 96

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>

<221> прочий_признак

<222> (45)..(45)

<223> Хаа представляет собой A, V, L, или I

<220>

<221> прочий_признак

<222> (77)..(77)

<223> Хаа представляет собой M, F, L, или I

<220>

<221> прочий_признак

<222> (79)..(79)

<223> Хаа представляет собой S, G, A, M, или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (80)..(80)

<223> Хаа представляет собой R, W, P, или A

<220>

<221> прочий_признак

<222> (81)..(81)

<223> Хаа представляет собой N, Y, S, E, D, Q, H, K, или R

<220>

<221> прочий_признак

<222> (82)..(82)

<223> Хаа представляет собой P, G, I, L, V, M, A, F, или Nle

<220>

<221> прочий_признак

<222> (83)..(83)

<223> Хаа представляет собой Y, G, T, или S

<220>

<221> прочий_признак

<222> (84)..(84)

<223> Хаа представляет собой R, E, K, P, D, или N

<220>

<221> прочий_признак

<222> (85)..(85)

<223> Хаа представляет собой R, D, S, Q, A, E, T, или S

<220>

<221> прочий_признак

<222> (93)..(93)

<223> Хаа отсутствует, представляет собой L или LESLPS

<400> 96

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Xaa Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Xaa Glu Xaa Xaa
65 70 75 80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val Xaa
85 90

<210> 97

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>

<221> прочий_признак

<222> (45)..(45)

<223> Xaa представляет собой A или V

<220>

<221> прочий_признак

<222> (77)..(77)

<223> Xaa представляет собой M или F

<220>

<221> прочий_признак

<222> (79)..(79)

<223> Xaa представляет собой S, G, A, или M

<220>

<221> прочий_признак

<222> (80)..(80)

<223> Xaa представляет собой R, W, или P

<220>

<221> прочий_признак

<222> (81)..(81)

<223> Xaa представляет собой N, Y, S, E, или D

<220>

<221> прочий_признак

<222> (82)..(82)

<223> Хаа представляет собой P, G, или I

<220>

<221> прочий_признак

<222> (83)..(83)

<223> Хаа представляет собой Y, G, или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (84)..(84)

<223> Хаа представляет собой R, E, K, P, или D

<220>

<221> прочий_признак

<222> (85)..(85)

<223> Хаа представляет собой R, D, S, Q, A, E, или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (93)..(93)

<223> Хаа отсутствует, представляет собой L или LESLPS

<400> 97

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Xaa Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Xaa Glu Xaa Xaa
65 70 75 80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val Xaa
85 90

<210> 98

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>

<221> прочий_признак

<222> (45)..(45)

<223> Хаа представляет собой A или V

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (77)..(77)
 <223> Хаа представляет собой M или F

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (79)..(79)
 <223> Хаа представляет собой S, G, A, или M

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (80)..(80)
 <223> Хаа представляет собой R или W

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (81)..(81)
 <223> Хаа представляет собой N, Y, S, E, или D

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (82)..(82)
 <223> Хаа представляет собой P или G

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (83)..(83)
 <223> Хаа представляет собой Y или G

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (84)..(84)
 <223> Хаа представляет собой R, E, K, или P

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (85)..(85)
 <223> Хаа представляет собой R, D, S, Q, A, или E

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (93)..(93)
 <223> Хаа отсутствует, представляет собой L или LESLPS

<400> 98

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
 1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
 20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Xaa Phe Ser Ser
 35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
 50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Xaa Glu Xaa Xaa
65 70 75 80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val Xaa
85 90

<210> 99

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>

<221> прочий_признак

<222> (80)..(80)

<223> Xaa может быть любой природной аминокислотой

<220>

<221> прочий_признак

<222> (82)..(85)

<223> Xaa может быть любой природной аминокислотой

<220>

<221> прочий_признак

<222> (93)..(93)

<223> Xaa отсутствует, представляет собой L или LESLPS

<400> 99

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Ala Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Xaa
65 70 75 80

Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val Xaa
85 90

<210> 100

<211> 93

<212> белок
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (80)..(80)
 <223> Хаа представляет собой R, W, P, или A

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (82)..(82)
 <223> Хаа представляет собой P, G, I, L, V, M, A, F, или Nle

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (83)..(83)
 <223> Хаа представляет собой Y, G, T, или S

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (84)..(84)
 <223> Хаа представляет собой R, P, D, или N

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (85)..(85)
 <223> Хаа представляет собой R, D, T, или S

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (93)..(93)
 <223> Хаа отсутствует, представляет собой L или LESLPS

<400> 100

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
 1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
 20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Ala Phe Ser Ser
 35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
 50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Xaa
 65 70 75 80

Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val Xaa
 85 90

<210> 101
 <211> 93
 <212> белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (80)..(80)
 <223> Хаа представляет собой R, W, или P

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (82)..(82)
 <223> Хаа представляет собой P, G, или I

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (83)..(83)
 <223> Хаа представляет собой Y, G, или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (84)..(84)
 <223> Хаа представляет собой R, P, или D

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (85)..(85)
 <223> Хаа представляет собой R, D, или T

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (93)..(93)
 <223> Хаа отсутствует, представляет собой L или LESLPS

<400> 101

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
 1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
 20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Ala Phe Ser Ser
 35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
 50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Xaa
 65 70 75 80

Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val Xaa
85 90

<210> 102

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>

<221> прочий_признак

<222> (80)..(80)

<223> Xaa представляет собой R или W

<220>

<221> прочий_признак

<222> (82)..(82)

<223> Xaa представляет собой P или G

<220>

<221> прочий_признак

<222> (83)..(83)

<223> Xaa представляет собой Y или G

<220>

<221> прочий_признак

<222> (84)..(84)

<223> Xaa представляет собой R или P

<220>

<221> прочий_признак

<222> (85)..(85)

<223> Xaa представляет собой R или D

<220>

<221> прочий_признак

<222> (93)..(93)

<223> Xaa отсутствует, представляет собой L или LESLPS

<400> 102

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Ala Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Xaa

65 70 75 80

Asn Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val Xaa
85 90

<210> 103

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>

<221> прочий_признак

<222> (45)..(45)

<223> Xaa представляет собой A, V, L, или I

<220>

<221> прочий_признак

<222> (77)..(77)

<223> Xaa представляет собой M, F, L, или I

<220>

<221> прочий_признак

<222> (79)..(79)

<223> Xaa представляет собой S, G, A, M, или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (80)..(80)

<223> Xaa представляет собой R, W, P, или A

<220>

<221> прочий_признак

<222> (81)..(81)

<223> Xaa представляет собой N, Y, S, E, D, Q, H, K, или R

<220>

<221> прочий_признак

<222> (82)..(82)

<223> Xaa представляет собой P, G, I, L, V, M, A, F, или Nle

<220>

<221> прочий_признак

<222> (83)..(83)

<223> Xaa представляет собой Y, G, T, или S

<220>

<221> прочий_признак

<222> (84)..(84)

<223> Xaa представляет собой R, E, K, P, D, или N

<220>

<221> прочий_признак

<222> (85)..(85)

<223> Xaa представляет собой D, S, Q, A, E, T, или S

<220>

<221> прочий_признак

<222> (93)..(93)

<223> Хаа отсутствует, представляет собой L или LESLPS

<400> 103

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Xaa Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Xaa Glu Xaa Xaa
65 70 75 80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val Xaa
85 90

<210> 104

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>

<221> прочий_признак

<222> (45)..(45)

<223> Хаа представляет собой A или V

<220>

<221> прочий_признак

<222> (77)..(77)

<223> Хаа представляет собой M или F

<220>

<221> прочий_признак

<222> (79)..(79)

<223> Хаа представляет собой S, G, A, или M

<220>

<221> прочий_признак

<222> (80)..(80)

<223> Хаа представляет собой R, W, или P

<220>

<221> прочий_признак

<222> (81)..(81)

<223> Хаа представляет собой N, Y, S, E, или D

<220>

<221> прочий_признак

<222> (82)..(82)

<223> Хаа представляет собой P, G, или I

<220>

<221> прочий_признак

<222> (83)..(83)

<223> Хаа представляет собой Y, G, или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (84)..(84)

<223> Хаа представляет собой R, E, K, P, или D

<220>

<221> прочий_признак

<222> (85)..(85)

<223> Хаа представляет собой D, S, Q, A, E, или T

<220>

<221> прочий_признак

<222> (93)..(93)

<223> Хаа отсутствует, представляет собой L или LESLPS

<400> 104

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Xaa Phe Ser Ser
35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Xaa Glu Xaa Xaa
65 70 75 80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val Xaa
85 90

<210> 105

<211> 93

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (45)..(45)
 <223> Хаа представляет собой A или V

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (77)..(77)
 <223> Хаа представляет собой M или F

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (79)..(79)
 <223> Хаа представляет собой S, G, A, или M

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (80)..(80)
 <223> Хаа представляет собой R или W

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (81)..(81)
 <223> Хаа представляет собой N, Y, S, E, или D

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (82)..(82)
 <223> Хаа представляет собой P или G

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (83)..(83)
 <223> Хаа представляет собой Y или G

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (84)..(84)
 <223> Хаа представляет собой R, E, K, или P

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (85)..(85)
 <223> Хаа представляет собой D, S, Q, A, или E

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (93)..(93)
 <223> Хаа отсутствует, представляет собой L или LESLPS

<400> 105

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His
 1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys
 20 25 30

Asp Lys Val Val Glu Phe Glu Asn Ser Glu Val Arg Xaa Phe Ser Ser
 35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile
50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Xaa Glu Xaa Xaa
65 70 75 80

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Lys Phe Phe Leu Tyr Val Xaa
85 90

<210> 106

<211> 7

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 106

Ser Arg Asn Gly Gly Pro Asp
1 5

<210> 107

<211> 7

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 107

Ser Arg Asn Pro Tyr Arg Arg
1 5

<210> 108

<211> 7

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 108

Ser Arg Asn Pro Tyr Arg Asp
1 5

<210> 109

<211> 7

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 109

Ser Trp Asn Gly Gly Pro Asp
1 5

<210> 110

<211> 7

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 110

Ser Trp Asn Pro Tyr Arg Arg
1 5

<210> 111

<211> 7

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 111

Ser Trp Asn Pro Tyr Arg Asp
1 5

<210> 112

<211> 7

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 112

Gly Arg Tyr Pro Tyr Glu Ser
1 5

<210> 113

<211> 7

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 113

Ser Trp Glu Pro Gly Arg Glu
1 5

<210> 114
<211> 7
<212> белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 114

Ala Arg Tyr Pro Tyr Arg Gln
1 5

<210> 115
<211> 7
<212> белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 115

Met Arg Asn Gly Gly Pro Asp
1 5

<210> 116
<211> 7
<212> белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 116

Ala Arg Asp Gly Gly Pro Asp
1 5

<210> 117
<211> 7
<212> белок
<213> Искусственная последовательность

<220>
<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 117

Ser Trp Ser Pro Tyr Lys Ala
1 5

<210> 118
<211> 6
<212> белок
<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 118

Leu Glu Ser Leu Pro Ser

1 5

<210> 119

<211> 20

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 119

Leu Glu Ser Leu Pro Ser Pro Thr Leu Thr Cys Ala Leu Thr Asn Gly

1 5 10 15

Ser Ile Glu Val

20

<210> 120

<211> 318

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 120

Phe Ser Gln Gln Ile Tyr Gly Val Val Tyr Gly Asn Val Thr Phe His

1 5 10 15

Val Pro Ser Asn Val Pro Leu Lys Glu Val Leu Trp Lys Lys Gln Lys

20 25 30

Asp Lys Val Ala Glu Leu Glu Asn Ser Glu Phe Arg Ala Phe Ser Ser

35 40 45

Phe Lys Asn Arg Val Tyr Leu Asp Thr Val Ser Gly Ser Leu Thr Ile

50 55 60

Tyr Asn Leu Thr Ser Ser Asp Glu Asp Glu Tyr Glu Met Glu Ser Pro

65 70 75 80

Asn Ile Thr Asp Thr Met Lys Phe Phe Leu Tyr Val Asp Lys Thr His

85 90 95

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
100 105 110

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
115 120 125

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
130 135 140

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
145 150 155 160

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
165 170 175

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
180 185 190

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
195 200 205

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
210 215 220

Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
225 230 235 240

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
245 250 255

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
260 265 270

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
275 280 285

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
290 295 300

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
305 310 315

<210> 121

<211> 327

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 121

Lys Glu Ile Thr Asn Ala Leu Glu Thr Trp Gly Ala Leu Gly Gln Asp
1 5 10 15

Ile Asn Leu Asp Ile Pro Ser Phe Gln Met Ser Asp Asp Ile Asp Asp
20 25 30

Ile Lys Trp Glu Lys Thr Ser Asp Lys Lys Lys Ile Ala Gln Phe Arg
35 40 45

Lys Glu Lys Glu Thr Phe Lys Glu Lys Asp Thr Tyr Lys Leu Phe Lys
50 55 60

Asn Gly Thr Leu Lys Ile Lys His Leu Lys Thr Asp Asp Gln Asp Ile
65 70 75 80

Tyr Lys Val Ser Ile Tyr Asp Thr Lys Gly Lys Asn Val Leu Glu Lys
85 90 95

Ile Phe Asp Leu Lys Ile Gln Glu Arg Val Ser Lys Pro Lys Ile Ser
100 105 110

Trp Thr Cys Ile Asn Thr Thr Leu Thr Cys Glu Val Met Asn Gly Thr
115 120 125

Asp Pro Glu Leu Asn Leu Tyr Gln Asp Gly Lys His Leu Lys Leu Ser
130 135 140

Gln Arg Val Ile Thr His Lys Trp Thr Thr Ser Leu Ser Ala Lys Phe
145 150 155 160

Lys Cys Thr Ala Gly Asn Lys Val Ser Lys Glu Ser Ser Val Glu Pro
165 170 175

Val Ser Cys Pro Glu Lys Gly Leu Asp Ile Tyr Leu Ile Ile Gly Ile
180 185 190

Cys Gly Gly Gly Ser Leu Leu Met Val Phe Val Ala Leu Leu Val Phe
195 200 205

Tyr Ile Thr Lys Arg Lys Lys Gln Arg Ser Arg Arg Asn Asp Glu Glu
210 215 220

Leu Glu Thr Arg Ala His Arg Val Ala Thr Glu Glu Arg Gly Arg Lys
225 230 235 240

Pro His Gln Ile Pro Ala Ser Thr Pro Gln Asn Pro Ala Thr Ser Gln
245 250 255

His Pro Pro Pro Pro Gly His Arg Ser Gln Ala Pro Ser His Arg
260 265 270

Pro Pro Pro Pro Gly His Arg Val Gln His Gln Pro Gln Lys Arg Pro
275 280 285

Pro Ala Pro Ser Gly Thr Gln Val His Gln Gln Lys Gly Pro Pro Leu
290 295 300

Pro Arg Pro Arg Val Gln Pro Lys Pro Pro His Gly Ala Ala Glu Asn
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Ser Ser Asn
325

<210> 122

<211> 1014

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 122

atgggctggt cctgtatcat cctctttctg gtggccacag ctaccggagt gcatagcttt 60

tcacagcaga ttacgggtgt tgttacgggt aatgtgactt tcacgttc gagtaacgtt 120

cctttgaagg aagtctatg gaaaaaaca aaagataaag ttgtagaatt tgagaatagt 180

gaggtaggg catttagtc atttaagaat agggctctatt tggatactgt atccggttct 240

ttgaccattt ataattaac aagtagtgat gaagacgagt acgaaatgga gtcccctaat 300

attacagaca cattcaagtt tttttgtac gttctcgaca aaactcacac atgcccaccg 360

tgcccagcac ctgaactct ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccc aaaaccaag 420

gacacctca tgatctccc gaccctgag gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac 480

gaagacctg aggtcaagtt caactgttac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag 540

acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagegt cctcaccgtc 600

ctgaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctcaa caaagccctc 660

ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg 720

tacacctgc cccatcccg ggaagagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 780

gtcaaaggct tctatcccag cgacatgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 840

aacaactaca agaccacgcc tcccgtgtg gactccgacg gtccttctt cctctacagc 900
 aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 960
 catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct ccctgtctcc gggt 1014

<210> 123
 <211> 957
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 123
 tttcacagc agatttacgg tgtgtttac ggtaatgtga ctttcacgt tccgagtaac 60
 gttcctttga aggaagtctt atggaaaaa caaaaagata aagttgtaga atttgagaat 120
 agtgaggtta gggcatttag tcatttaag aatagggtct atttggatac tgtatccggt 180
 tctttgacca ttataattt aacaagtagt gatgaagacg agtacgaaat ggagtcccct 240
 aatattacag acacattcaa gtttttttg tacgttctcg aaaaaactca cacatgccca 300
 ccgtgccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctctccc cccaaaaacc 360
 aaggacacc tcattgatct ccggaccct gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc 420
 cacgaagacc ctgaggtaaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 480
 aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gttggtcag cgtcctcacc 540
 gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 600
 ctcccagccc ccattcgaaa aacctctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 660
 gtgtacacc tgcacctc ccgggaagag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 720
 ctggtaaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 780
 gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ttggactccg acggtcctt cttctctac 840
 agcaagctca ccgtggacaa gacaggtgg cagcagggga acgtctctc atgctccgtg 900
 atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag cagaagagcc tctccctgtc tccgggt 957

<210> 124
 <211> 1041
 <212> ДНК
 <213> Искусственная последовательность

<220>
 <223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 124
 atggtgctg ggagcgacgc gggcgggcc ctgggggtcc tcagcgtgtg ctgcctgctg 60
 cactgcttg gtttcatcag ctgttttcc caacaaatat atggtgtgtg gtatgggaat 120

gtaactttcc atgtaccaag caatgtgcct ttaaagagg tcctatggaa aaaacaaaag 180
 gataaagttg cagaactgga aaattctgaa tcagagctt tctcatctt taaaaatagg 240
 gtttatttag aactgtgtc aggtagcctc actatctaca acttaacatc atcagatgaa 300
 gatgagtatg aatggaatc gccaaatatt actgatacca tgaagtctt tctttatgtc 360
 gacaaaaact acacatgccc accgtgccc gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 420
 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 480
 tgcgtggtgg tggactgtg ccacgaagac cctgaggta agttcaactg gtactgtggac 540
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 600
 cgtgtggtca ggcctctcac cgtctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 660
 tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa 720
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag 780
 aaccaggtca gcctgacctg cctgtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 840
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gttggactcc 900
 gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 960
 aacgtctct catgctccgt gatgatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1020
 ctctccctgt ctccgggtaa a 1041

<210> 125

<211> 957

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 125

ttttcccaac aaatatatgg tgtgtgtat gggaatgtaa ctttccatgt accaagcaat 60
 gtgcctttaa aagaggtcct atgaaaaaaa caaaaggata aagttgcaga actggaaaat 120
 tctgaattca gagcttctc atctttaaa aatagggttt atttagacac tgtgtcaggt 180
 agcctcacta tctacaactt aacatcatca gatgaagatg agtatgaaat ggaatcgcca 240
 aatattactg ataccatgaa gttcttctt tatgtcgaca aaactcacac atgcccaccg 300
 tgcccagcac ctgaactct ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccc aaacccaag 360
 gacacctca tgatctccc gaccctgag gtcacatgcg tgggtgtgga cgtgagccac 420
 gaagacctg aggtcaagtt caactgttac gtgacggcg tggaggtgca taatgccaag 480
 acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 540
 ctgaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtgca aggtctcaa caaagcctc 600

ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg 660
 tacaccctgc ccccatcccc ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 720
 gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 780
 aacaactaca agaccacgcc tcccgtgttg gactccgacg gctccttctt cctctacagc 840
 aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 900
 catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct cctgtctcc gggtaaa 957

<210> 126

<211> 276

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 126

tttcccaac aaatatatgg tgttgtgat gggaatgtaa ctttccatgt accaagcaat 60

gtgccttaa aagaggtcct atggaaaaaa caaaaggata aagttgcaga actggaaaat 120

tctgaattca gagctttctc atctttaaa aatagggttt atttagacac tgtgtcaggt 180

agcctcacta tctacaactt aacatcatca gatgaagatg agtatgaaat ggaatcgcca 240

aatattactg ataccatgaa gttctttctt tatgtc 276

<210> 127

<211> 681

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 127

gacaaaaact acacatgccc accgtgcccc gcacctgaac tctggggggg accgtcagtc 60

ttctcttcc ccccaaaacc саaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 120

tgcgtgggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggatca agttcaactg gtacgtggac 180

ggcgtggagg tgcataatgc саagacaaaг ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 240

cggtgggtca gegtctctac cgtctctcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 300

tgcaaggctt ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa 360

gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag 420

aaccaggtca gcctgacctg cctgtgcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 480

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gttggactcc 540

gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 600

aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 660

ctctccctgt ctccgggtaa a 681

<210> 128

<211> 227

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 128

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35 40 45

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

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115 120 125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
130 135 140

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

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165 170 175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180 185 190

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195 200 205

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210 215 220

Pro Gly Lys
225

<210> 129

<211> 28

<212> белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 129

Met Val Ala Gly Ser Asp Ala Gly Arg Ala Leu Gly Val Leu Ser Val
1 5 10 15

Val Cys Leu Leu His Cys Phe Gly Phe Ile Ser Cys
20 25

<210> 130

<211> 84

<212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> СИНТЕТИЧЕСКАЯ КОНСТРУКЦИЯ

<400> 130

atggttgctg ggagcgacgc ggggcgggcc ctgggggtcc tcagcgtggt ctgcctgctg 60

cactgctttg gtttcatcag ctgt 84

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный полипептид, который специфически связывается с CD2, где молекула полипептида включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69 или ее функциональный вариант, имеющий по меньшей мере примерно 95% идентичности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 69, и где функциональный вариант содержит одну или несколько замен в остатках 36, 38, 43, 45, 77 и 86 относительно SEQ ID NO: 3, пронумерованных согласно SEQ ID NO: 3.

2. Выделенный полипептид, который специфически связывается с CD2, включающий функциональный домен антигена 3, ассоциированного с функцией лимфоцитов, (LFA3), включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере примерно 95% идентичности с аминокислотной последовательностью, выбранной из SEQ ID NO: 17-41, где указанная аминокислотная последовательность содержит одну или несколько замен в остатках 36, 38, 43, 45, 77 и 86 относительно SEQ ID NO: 3, пронумерованных согласно SEQ ID NO: 3.

3. Выделенный полипептид по п.2, отличающийся тем, что:

(а) аминокислотная последовательность представляет собой SEQ ID NO: 17, 18, 19, 20, 21, 22 или 23 и где С-концевая граница домена LFA3 удлинена для включения аминокислотного остатка Leu или аминокислотной последовательности LESLPS (SEQ ID NO: 118); или

(b) домен LFA3 включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 26 или ее функциональный вариант, имеющий по меньшей мере 95% идентичность с SEQ ID NO: 26.

4. Выделенный полипептид, модулирующий активность CD2, включающий функциональный вариант домена LFA3, где функциональный вариант включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 с одной или несколькими заменами в остатках 36, 38, 43 и 86, пронумерованных в соответствии с SEQ ID NO: 3.

5. Выделенный полипептид по п.4, отличающийся тем, что одна или несколько замен в остатках 36, 38, 43 и 86, пронумерованных согласно SEQ ID NO: 3, представляют собой A36V, L38F, F43V и M86F, и/или где С-концевая граница домена LFA3 удлинена для включения аминокислотного остатка Leu или аминокислотной последовательности LESLPS (SEQ ID NO: 118).

6. Выделенный полипептид по любому из пп.2-5, дополнительно включающий второй домен, где:

(а) второй домен включает белок иммуноглобулина, например константную область тяжелой цепи, например константную область тяжелой цепи человека;

где второй домен включает область Fc тяжелой цепи, который может быть тяжелой цепью IgG1 человека; или

второй домен включает шарнирную область, область CH2 и область CH3; и/или

(b) второй домен включает область Fc, включающую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 75, 80, 85, 90, 95 или 99% идентичности с SEQ ID NO: 16, или где второй домен включает аминокислотную последовательность из SEQ ID NO: 16.

7. Выделенный полипептид по п.6, отличающийся тем, что:

I) дополнительно включает линкер, причем линкер связывает N-конец второго домена с С-концом домена LFA3;

II) второй домен способен образовывать димер с областью Fc, например, через межмолекулярную дисульфидную связь;

III. второй домен способен опосредовать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC);

IV) второй домен способен опосредовать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и образовывать димер с доменом Fc, например, посредством межмолекулярной дисульфидной связи;

V) указанный выделенный полипептид дополнительно содержит линкер, причем линкер связывает N-конец второго домена с С-концом домена LFA3, и второй домен способен образовывать димер с доменом Fc, например, посредством межмолекулярной дисульфидной связи;

VI) указанный выделенный полипептид дополнительно содержит линкер, причем линкер связывает N-конец второго домена с С-концом домена LFA3, и второй домен способен опосредовать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC);

VII) указанный выделенный полипептид дополнительно содержит линкер, причем линкер связывает N-конец второго домена с С-концом домена LFA3, и второй домен способен опосредовать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и формировать димер с доменом Fc, например, через межмолекулярную дисульфидную связь;

VIII) домен LFA3 включает полипептид, включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности с SEQ ID NO: 26, а домен Fc включает полипептид, включающий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности с SEQ ID NO: 16;

IX) домен LFA3 содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность с SEQ ID NO: 26, а домен Fc содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с SEQ ID NO: 16, причем указанный выделенный полипептид дополнительно содержит линкер, причем линкер связывает N-конец второго домена с С-концом домена LFA3;

X) домен LFA3 содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность с SEQ ID NO: 26, а домен Fc содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с SEQ ID NO: 16, где второй домен способен образовывать димер с доменом Fc, например, посредством межмолекулярной дисульфидной связи;

XI) домен LFA3 содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере на 95% идентичность с SEQ ID NO: 26, а домен Fc содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с SEQ ID NO: 16, причем второй домен способен опосредовать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC);

XII) домен LFA3 содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере на 95% идентичность с SEQ ID NO: 26, а домен Fc содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичность с SEQ ID NO: 16, причем второй домен способен опосредовать антителозависимую клеточно-опосредованную ци-

36, 38, 43, 86, 92, 228 и 230, пронумерованных согласно SEQ ID NO: 4, представляют собой A36V, L38F, F43V, M86F, V92_D93insL, D228E и L230M, причем указанный выделенный полипептид дополнительно содержит линкер, причем линкер связывает N-конец второго домена с C-концом домена LFA3, и второй домен способен опосредовать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC); или

XXIII) полипептид содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при этом эта аминокислотная последовательность содержит одну или более замен в остатках 36, 38, 43, 86, 92, 228 и 230, пронумерованных согласно SEQ ID NO: 4; необязательно, при этом одна или несколько замен в остатках 36, 38, 43, 86, 92, 228 и 230, пронумерованных согласно SEQ ID NO: 4, представляют собой A36V, L38F, F43V, M86F, V92_D93insL, D228E и L230M, причем указанный выделенный полипептид дополнительно содержит линкер, причем линкер связывает N-конец второго домена с C-концом домена LFA3, а второй домен способен опосредовать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC) и образовывать димер с Fc доменом, например, через межмолекулярную дисульфидную связь.

8. Выделенный полипептид по любому из предшествующих пунктов, который обладает одним или несколькими из следующих свойств:

i) повышенная мономерная экспрессия, продемонстрированная процентным содержанием мономера, которое на около 70, 75, 80, 85, 90 или 95% выше по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, при измерении с помощью эксклюзионной хроматографии,

ii) повышенная мономерная экспрессия и сниженная мультимерная экспрессия, демонстрируемые процентным содержанием мономера, превышающим около 75, 80, 85, 90 или 95%, процентным содержанием низкомолекулярных веществ (LMWS), которое меньше чем около 10, 8, 6, 4 или 2%, и/или процентным содержанием высокомолекулярных веществ (HMWS), которое меньше чем около 5, 2 или 1%, по отношению к молекуле полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с использованием эксклюзионной хроматографии,

iii) снижение склонности к агрегации при тепловом стрессе, демонстрируемое процентным содержанием мономера, превышающим около 90, 92 или 95% после инкубации при 37,4°C в течение 24 ч, и/или показывающим процентное содержание мономера, которое больше чем около 75, 80 или 85% после инкубации при 40°C в течение 24 ч относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, при измерении с помощью эксклюзионной хроматографии,

iv) снижение склонности к агрегации при термическом стрессе, демонстрируемое увеличением HMWS не более чем на около 5, 10, 15 или 20% при 40°C и/или не более чем около 5, 10, 15, 20 или 25% увеличением HMWS при 50°C относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с помощью эксклюзионной хроматографии,

v) сниженная склонность к агрегации при низком pH, продемонстрированная не более чем около 6, 7, 8 или 9% увеличением HMWS при низком pH в течение 5 ч по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с использованием эксклюзионной хроматографии,

vi) повышенная стабильность, о чем свидетельствует увеличение HMMS не более чем на 0,5, 1, 1,5 или 2% и/или увеличение LMMS на около 0,5, 1, 2, 3, 4 или 5% после 2 или 4 недель хранения при 40°C относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с помощью капиллярного гель-электрофореза (CGE) или эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SE-HPLC),

vii) повышенная стабильность по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, демонстрирующая не более чем около 0,5, 1, 1,5 или 2% увеличения HMMS и/или около 0,5, 1 или 1,5% увеличения LMMS через 2, 4 или 6 недель хранения при 25°C, при измерении с помощью SE-HPLC,

viii) повышенная стабильность по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, например, демонстрирующая не более чем около 0,5, 1 или 1,5% увеличения HMMS и/или около 0,5, 1 или 1,5% увеличения LMMS через 2, 4 или 6 недель хранения при 5°C, при измерении с помощью SE-HPLC,

ix) повышенная стабильность при замораживании-оттаивании, продемонстрированная не более чем около 0,5, 1 или 1,5% увеличения HMWS после 5 циклов замораживания-оттаивания по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с использованием эксклюзионной хроматографии,

x) повышенный выход, о чем свидетельствует выход, который составляет более чем около 5,5, 6, 6,5 или 7 мг на 20 мл культуры Expi293 по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120,

xi) повышенная температура плавления (T_m), о чем свидетельствует T_m, которая составляет более чем около 38, 40, 42, 45 или 50°C относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 120, при измерении с помощью дифференциальной сканирующей флуориметрии (DSF),

xii) повышенная T_m, о чем свидетельствует T_m, которая составляет более чем около 40, 45, 50, 55

или 60°C относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с помощью DSF,

xiii) повышенная T_m , о чем свидетельствует T_m , которая составляет более чем около 50 или 60°C относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, измеренную с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC),

xiv) T_{m1} составляет более чем около 55, 58, 60, 62, 64 или 66°C и T_{m2} составляет более чем около 75, 78, 80 или 82°C при pH 7,5; T_{m1} составляет более чем около 55, 58, 60, 62 или 64°C и T_{m2} составляет более чем около 75, 78, 80 или 82°C при pH 5,8; или T_{m1} составляет более чем около 55, 58 или 60°C и T_{m2} составляет более чем около 75, 78 или 80°C при pH 4,5, при измерении с помощью DSC,

xv) повышенная T_m , о чем свидетельствует T_m , которая составляет более чем около 50 или 60°C при pH 7,5 или pH 4,5, или T_m , которая составляет более чем около 50 или 62°C при pH 5,8 относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 при измерении с помощью DSC,

xvi) повышенная T_m , о чем свидетельствует T_m , которая составляет более чем около 50 или 60°C относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с помощью DSC и FabRICATOR IdeS,

xvii) повышенная аффинность связывания с CD2, о чем свидетельствует K_D для CD2 человека, которая составляет менее около 1,2, 1, 0,8, 0,6, 0,4, 0,2, 0,1 или 0,08 мкМ по отношению к молекуле полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с помощью SPR,

xviii) повышенная аффинность связывания с CD2, о чем свидетельствует K_D для CD2 человека, которая составляет менее около 1,3, 1,2, 1,1 или 1 мкМ, и/или K_D для CD2 яванского макака, которая составляет менее 1,4, 1,3, 1,2, 1,1 или 1 мкМ относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с помощью SPR,

xix) повышенная аффинность связывания с CD2-экспрессирующими клетками, о чем свидетельствует K_D связывания с CD4 T_{mem} -клетками, которая составляет не более чем около 100, 200, 300 или 400 пМ относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с помощью SPR,

xx) повышенная аффинность связывания с CD2-экспрессирующими клетками, что продемонстрировано рассчитанным значением IC50 для связывания с CD4 T-клетками памяти, которое составляет не более чем около 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 1200 или 1500 пМ; рассчитанным значением IC50 для связывания с CD4+ T_{EM} -клетками, которое составляет не более чем около 150, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000 или 1200 пМ; рассчитанным значением IC50 для связывания с CD4+ T_{CM} -клетками, которое составляет не более чем около 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 или 800 пМ; рассчитанным значением IC50 для связывания с наивными CD4 T-клетками, которое составляет не более чем около 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000 или 1200 пМ; рассчитанным значением IC50 для связывания с размноженными CD4 Treg-клетками, которое составляет не более чем около 100, 200, 300, 400 или 500 пМ; рассчитанным значением IC50 для связывания с CD8 T-клетками памяти, которое составляет не более чем около 100, 200, 300, 400, 500 или 600 пМ; и/или рассчитанным значением IC50 для связывания с нативными CD8 T-клетками, которое составляет не более чем около 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 1200, 1500, 1600 или 1700 пМ, например, при измерении с использованием SPR и/или способов, описанных в примере 2 с учетом табл. 10 и фиг. 11, относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с помощью SPR,

xxi) повышенная аффинность связывания с CD2-экспрессирующими клетками, что продемонстрировано рассчитанным значением K_d для связывания с CD4 T-клетками памяти, которое составляет не более чем около 100, 200, 300, 400 или 500 пМ; рассчитанным значением K_d для связывания с CD4+ T_{EM} -клетками, которое составляет не более чем около 100, 200, 300, 400, 500 или 600 пМ; рассчитанным значением K_d для связывания с CD4+ T_{CM} -клетками, которое составляет не более чем около 100, 200, 300, 400 или 500 пМ; рассчитанным значением K_d для связывания с наивными CD4 T-клетками, которое составляет не более чем около 100, 200, 300 или 400 пМ; рассчитанным значением K_d для связывания с размноженными CD4 Treg-клетками, которое составляет не более чем около 100, 200 или 300 пМ; рассчитанным значением K_d для связывания с CD8 T-клетками памяти, которое составляет не более чем около 50, 100 или 150 пМ; рассчитанным значением K_d для связывания с наивными CD8 T-клетками, которое составляет не более чем около 50, 100, 200, 300, 400 или 500 пМ относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с помощью SPR,

xxii) повышенная аффинность связывания с CD2-экспрессирующими клетками, что продемонстрировано сниженным EC50 для связывания с CD4+ T_{EM} -клетками яванского макака по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с помощью SPR,

xxiii) повышенная цитотоксичность против CD2-экспрессирующих клеток, продемонстрированная EC50 для уничтожения CD4 T_{mem} -клеток, которая составляет не более чем около 400, 600, 800, 1000, 1200 или 1400 пМ относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность

SEQ ID NO: 4, при измерении с помощью анализа антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC),

xxiv) повышенная цитотоксичность против CD2-экспрессирующих клеток, продемонстрированная EC50 для уничтожения CD8 T_{mem}-клеток, которая составляет не более чем около 1, 5, 10, 20, 30, 40 или 50 нМ относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с использованием анализа антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC),

xxv) усиленное ингибирование аллогенного T-клеточного ответа, где аллогенный T-клеточный ответ представляет собой пролиферацию T-клеток и/или продуцирование цитокинов, как продемонстрировано с помощью IC50 для анализа смешанной реакции лимфоцитов (MLR), который составляет не более чем около 400, 800, 1200, 1600, 2000 или 2400 пМ относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4,

xxvi) усиленное ингибирование аллогенного T-клеточного ответа, где аллогенный T-клеточный ответ представляет собой пролиферацию T-клеток и/или продуцирование цитокинов, что продемонстрировано с помощью IC50 для анализа смешанной реакции лимфоцитов (MLR) в отсутствие NK-клеток, которое составляет не более чем около 330, 400, 500, 600, 800, 1000, 1500 или 2000 пМ относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4,

xxvii) усиленное ингибирование вторичного ответа на столбнячный токсин, что продемонстрировано с помощью IC50 для продуцирования IFN γ CD4 T_{mem}-клетками, которое составляет не более чем около 1, 2, 5, 10, 15, 20 или 25 нМ относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении в анализе вторичного ответа на столбнячный токсин (TTR),

xxviii) более медленный клиренс *in vivo*, о чем свидетельствует клиренс из центрального объема, который составляет не более чем около 0,14, 0,16, 0,18, 0,2 или 0,22 мл/ч/кг относительно молекулы полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении в исследованиях ФК/ФД, и/или

xxix) повышенная чистота в по меньшей мере около 98 или 99% по сравнению с молекулой полипептида, включающей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, при измерении с помощью капиллярного гель-электрофореза.

9. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая выделенный полипептид по любому из пп.1-8.

10. Выделенная нуклеиновая кислота по п.9, включающая последовательность нуклеиновой кислоты, имеющую по меньшей мере около 95 или 98% идентичности с SEQ ID NO: 43, 53 и/или 123, или включающая последовательность нуклеиновой кислоты из SEQ ID NO: 43, 53 и/или 123.

11. Вектор, включающий нуклеиновую кислоту по любому из пп.9 или 10.

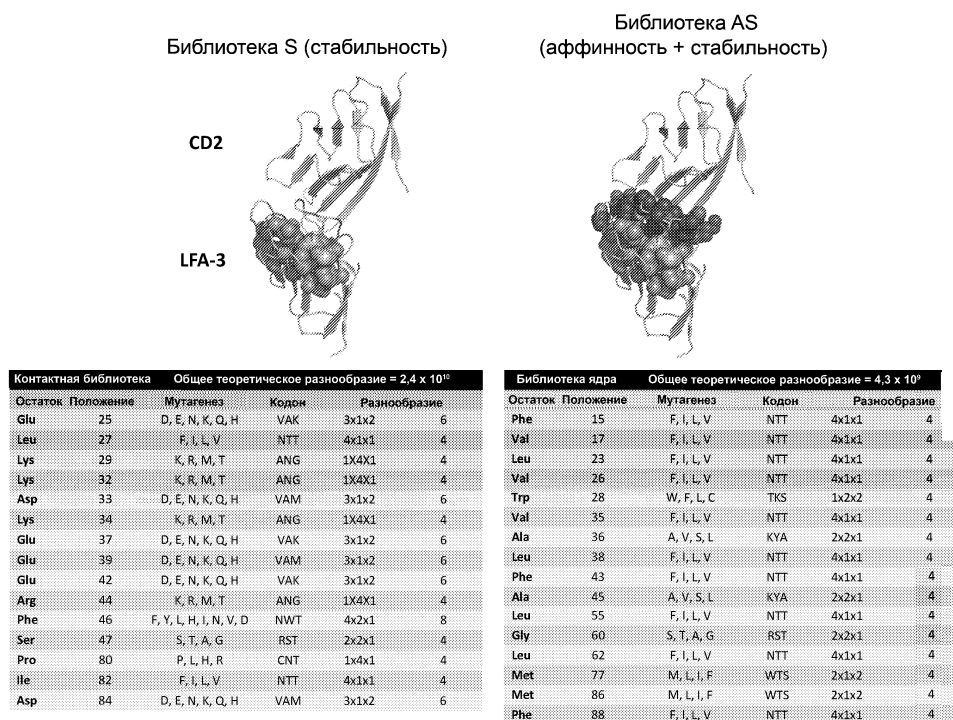
12. Клетка-хозяин, включающая нуклеиновую кислоту по п.9 или 10 или вектор по п.11.

13. Фармацевтическая композиция, включающая полипептид по любому из пп.1-8 и фармацевтически приемлемый носитель или наполнитель.

14. Способ получения выделенного полипептида, который специфически связывается с CD2, включающий культивирование клетки-хозяина по п.12, в условиях, при которых полипептид экспрессируется клеткой-хозяином, и выделение полипептида.

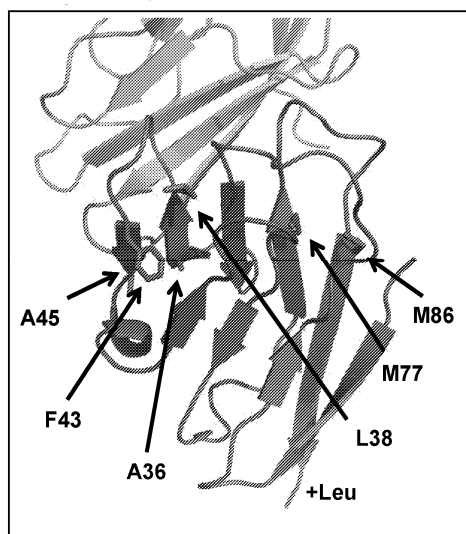
15. Выделенный полипептид по любому из пп.1-8 или фармацевтическая композиция по п.13 для лечения иммунного заболевания, расстройства или состояния.

16. Фармацевтическая композиция по п.13 для лечения или профилактики иммунного заболевания, расстройства или состояния, опосредованного CD2, у объекта-человека, нуждающегося в этом, где указанное заболевание, нарушение или состояние выбрано из группы, состоящей из диабета 1 типа, псориаза, пятнистого псориаза, пальмоплантарного пустулеза, пустулезного псориаза ладоней и ступней, ладонно-подошвенного пустулеза, пустулеза ладоней и ступней, атопического дерматита, красного плоского лишая, болезни трансплантат против хозяина (GVHD), витилиго, красного волосистого питириаза, трансплантации, где трансплантация может представлять собой трансплантацию органов, причем органом может быть почка, псориатического артрита, заболевания, расстройства или состояния, требующего аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, талассемии, серповидноклеточной анемии, тромбастении Гланцмана, синдрома Вискотта-Олдрича, хронической гранулематозной болезни, тяжелой врожденной нейтропении, недостаточности адгезии лейкоцитов, синдрома Швахмана-Даймонда, анемии Даймонда-Блэкфана, анемии Фанкони, врожденного дискератоза, синдрома Чедиака-Хигаши, апластической анемии, очаговой алопеции и T-клеточной лимфомы, где T-клеточная лимфома может быть кожной T-клеточной лимфомой или периферической T-клеточной неходжкинской лимфомой.



Фиг. 1

Остатки в «горячих точках»



Фиг. 2A

Остатки LFA3, выявленные в библиотеках

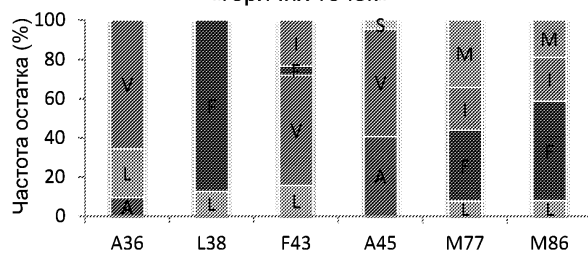
```

FSQQIYGVVYGNVTFHVP SNVPLKEVLWKKQKDKV
AELENSEFR AFSSFKNRVYLDTVSGSLTIYNLTS
DEDEYEMESP NITDTMKFFLYV (SEQ ID NO:
3)

```

Фиг. 2B

Частота изменений аминокислот в положениях
«горячих точек»



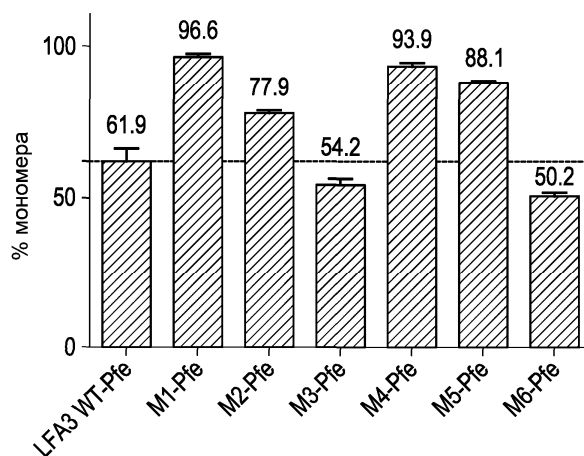
Фиг. 2С

Рекомбинантные варианты

	36	38	43	45	77	86
M1	V	F	V	A	M	F
M2	V	F	V	A	F	F
M3	V	F	V	V	M	F
M4	V	F	V	V	F	F
M5	V	F	I	V	F	F
M6	L	F	L	V	F	F

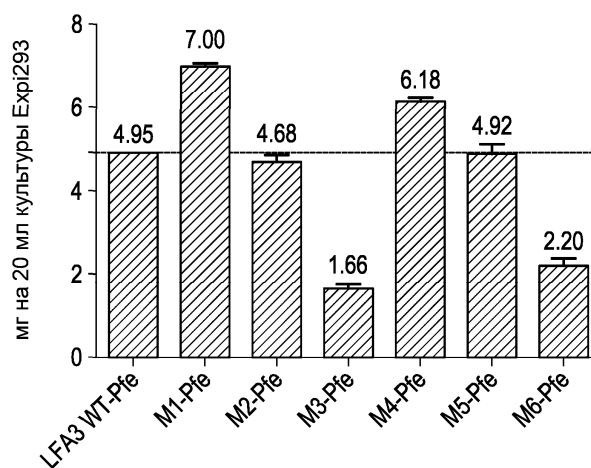
Фиг. 2D

Профиль экспрессии (% мономера)



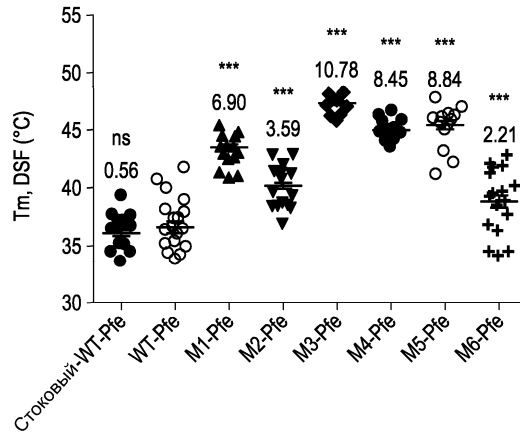
Фиг. 3А

Технологичность (выход)



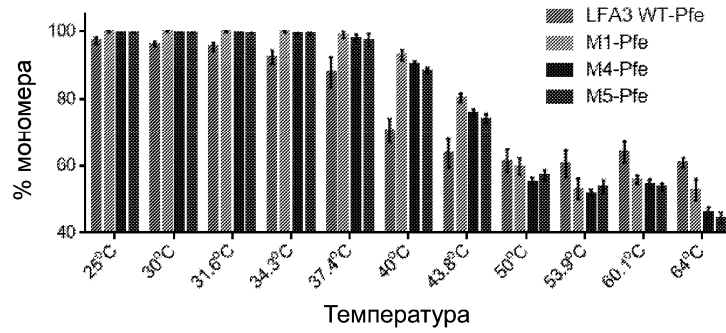
Фиг. 3В

Термическая стабильность (DSF)



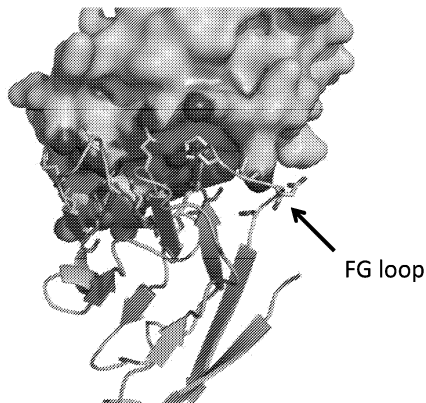
Фиг. 3С

Склонность к агрегации: агрегация, вызванная нагреванием



Фиг. 3D

Библиотека петли



Теоретическое разнообразие = $3,4 \times 10^{10}$

Остаток	Положение	Кодон
Ser	79	NNK
Pro	80	NNK
Asn	81	NNK
Ile	82	NNK
Thr	83	NNK
Asp	84	NNK
Ser	85	NNK

- Использованные матрицы: WT, M1, M4 и M5
- Размер библиотеки = $2,9 \times 10^8$

Фиг. 4

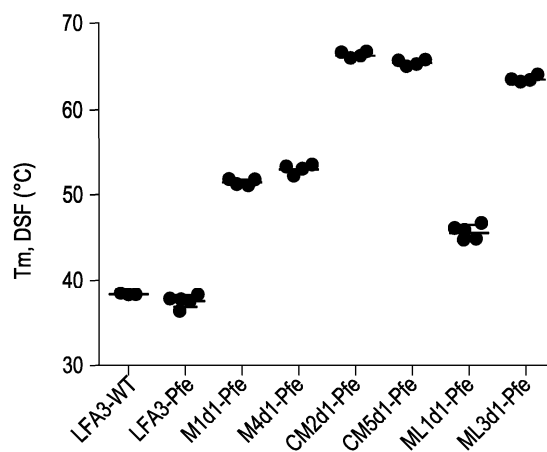
Аффинность связывания CD2,
при измерении с помощью SPR

Конструкция	Аффинность (мкМ)
WT LFA3-Fc	1.41
M1d1-Pfe	0.73
M4d1-Pfe	0.75
ML1d1-Pfe	0.082
ML3d1-Pfe	0.052
CM1d1-Pfe	0.13
CM2d1-Pfe	0.10
CM3d1-Pfe	0.088
CM5d1-Pfe	0.063
CM6d1-Pfe	0.061

n=1-3 exp

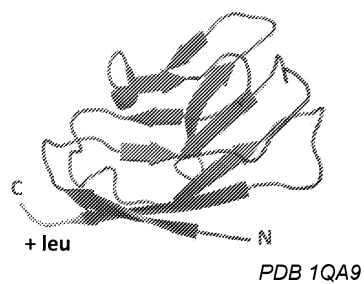
Фиг. 5А

Термическая стабильность (DSF)



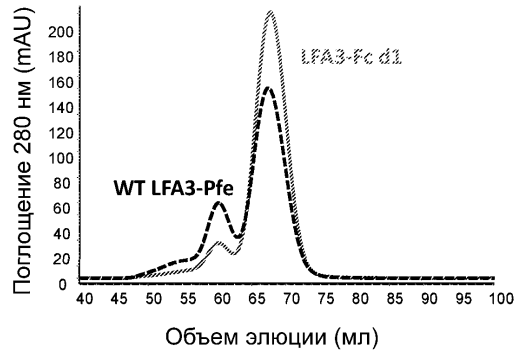
Фиг. 5В

Кристаллическая структура LFA3



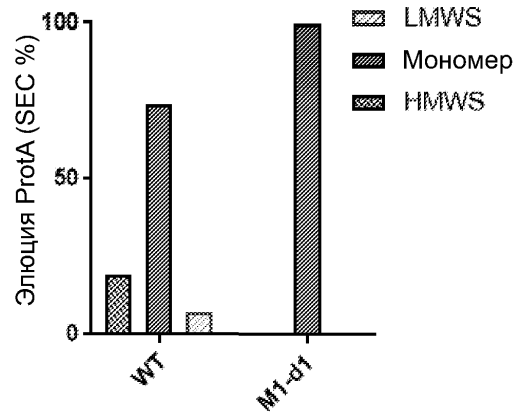
Фиг. 6А

Эксклюзионная хроматография



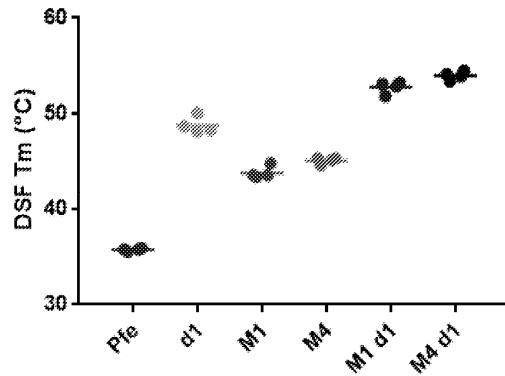
Фиг. 6B

Чистота на выходе



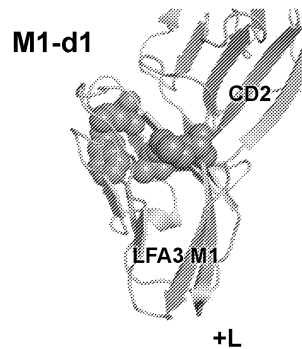
Фиг. 6C

Термическая стабильность (DSF)

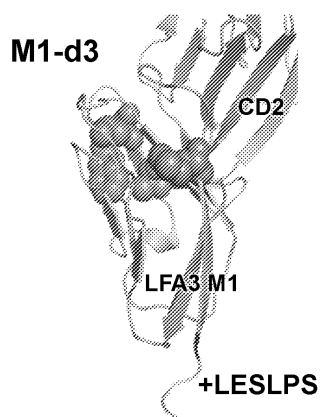


Вариант LFA3-Fc

Фиг. 6D



Фиг. 7A



Фиг. 7B

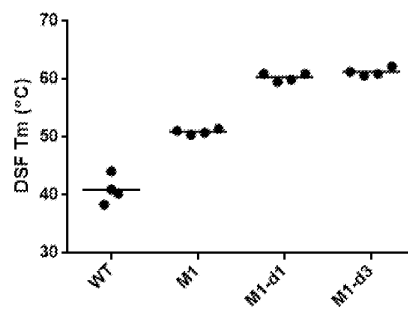
Аффинность с помощью SPR

Конструкция	Человек (мкМ)	Яванский макак (мкМ)
LFA3-WT	1.47	1.50
M1-d1	1.08	1.06
M1-d3	1.04	1.08

Среднее измерений в трех повторях

Фиг. 7C

Термическая стабильность (DSF)



Вариант LFA3-Fc

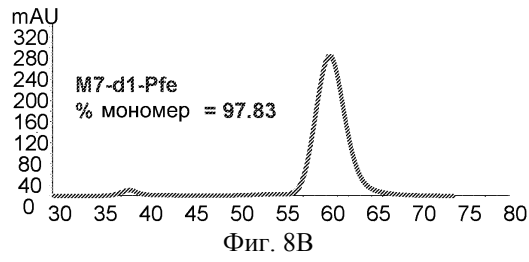
Фиг. 7D

Последовательность

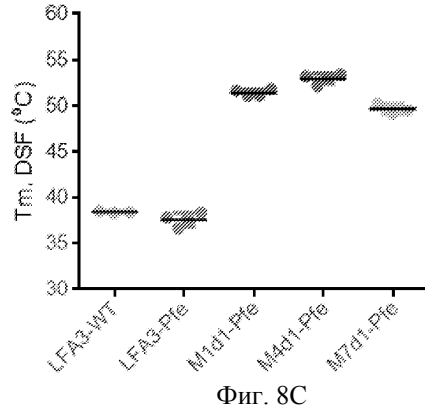
	36	38	43	45	77	86
WT	A	L	F	A	M	M
M1	V	F	V			F
M4	V	F	V	V	F	F
M7	V	F	V			

Фиг. 8A

Хроматограмма SEC



Термическая стабильность по DSF

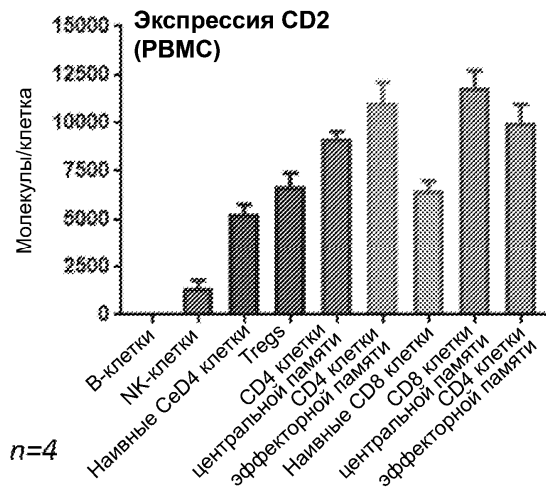


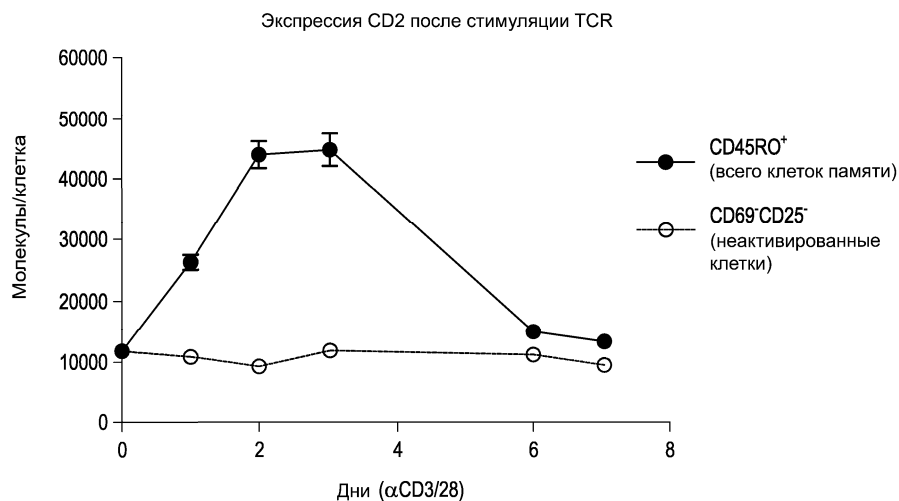
Аффинность по SPR

Конструкция	Аффинность (мкМ)
WT	1.41
M1-d1 Pfe	0.73
M4-d1 Pfe	0.75
M7-d1-Pfe	0.92

n=4-7

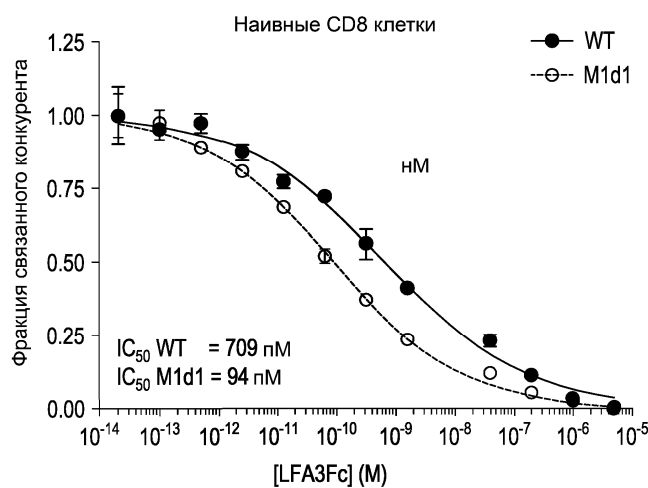
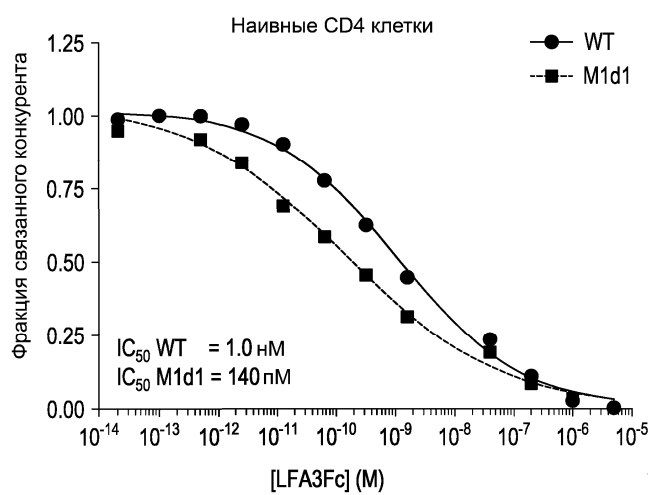
Фиг. 8D

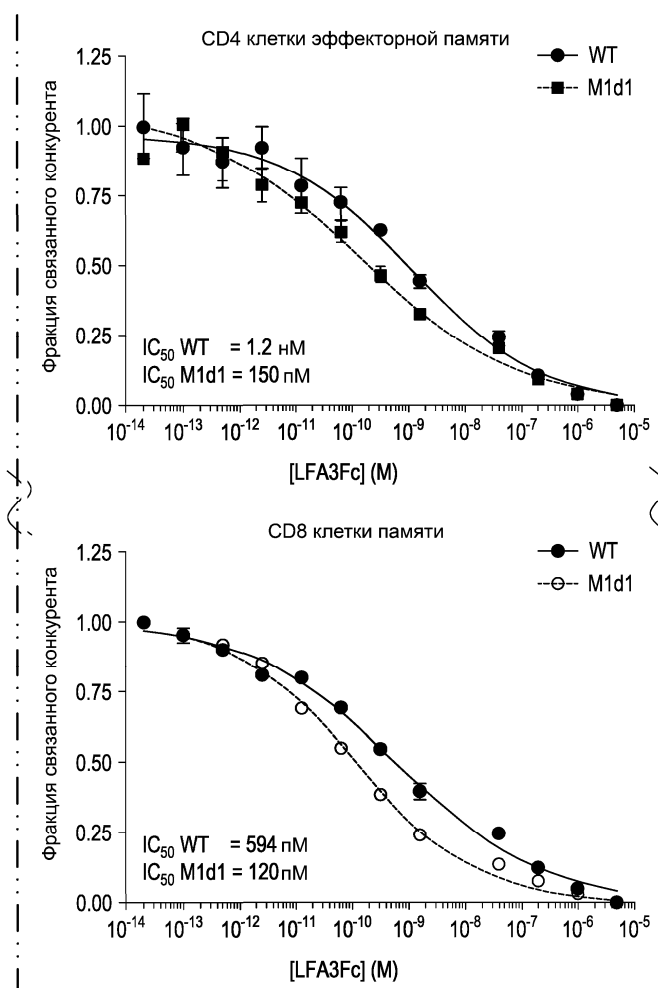


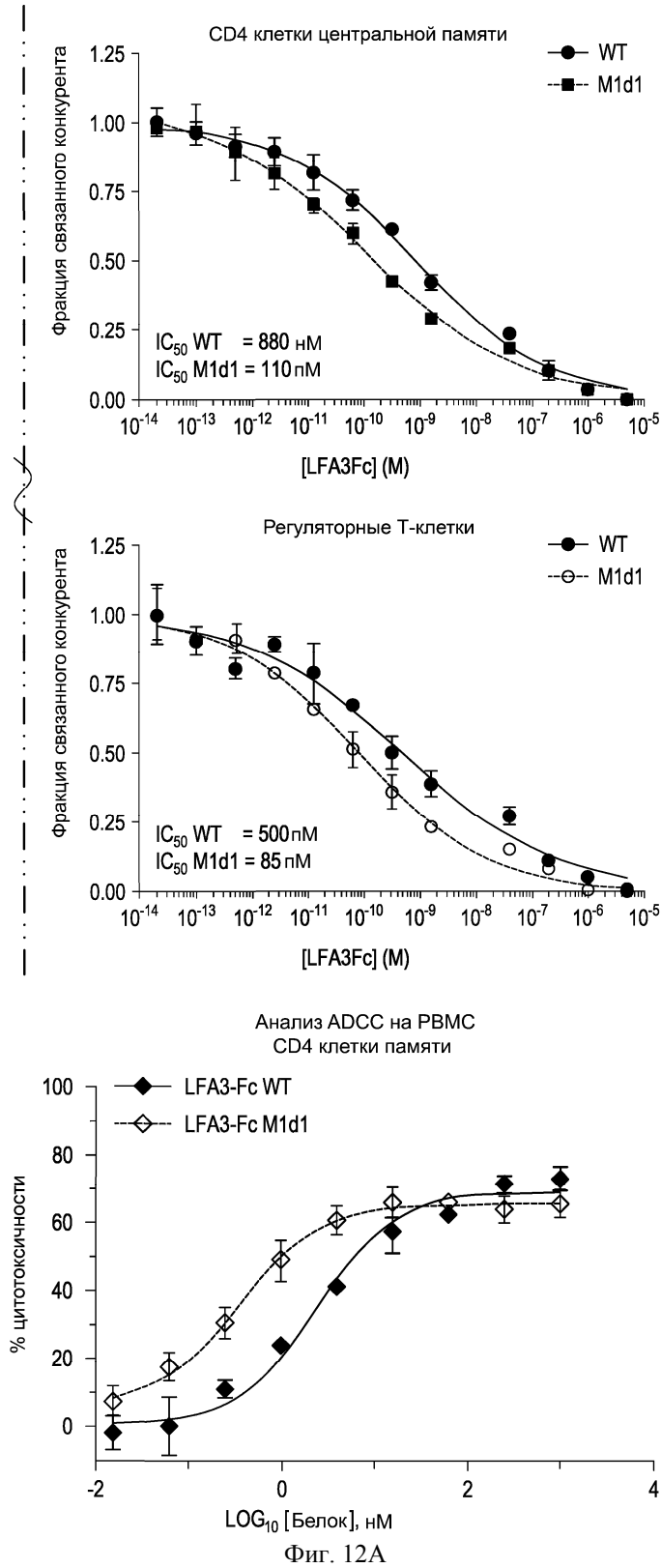


показан 1 из 4 доноров

Фиг. 10

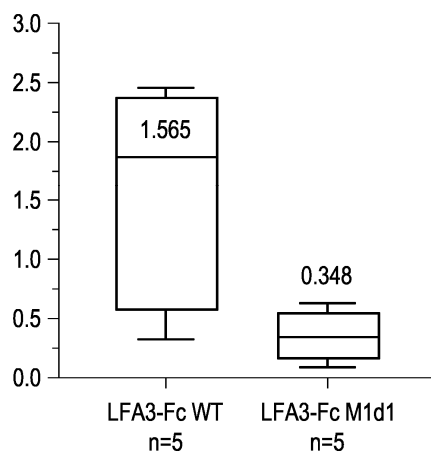






046734

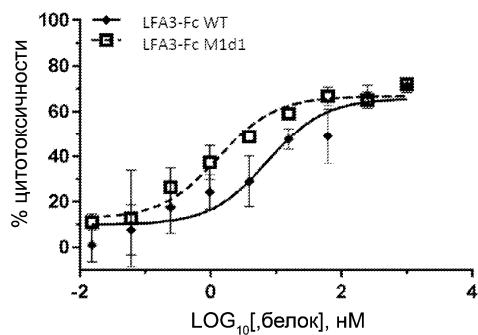
EC₅₀ (нМ)
CD4 клетки памяти



Фиг. 12В

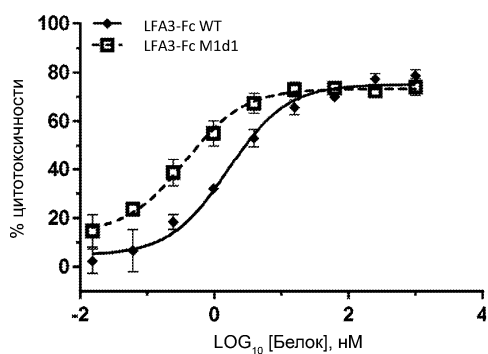
CD4 CD45RO-

клетки, не относящиеся к клеткам памяти



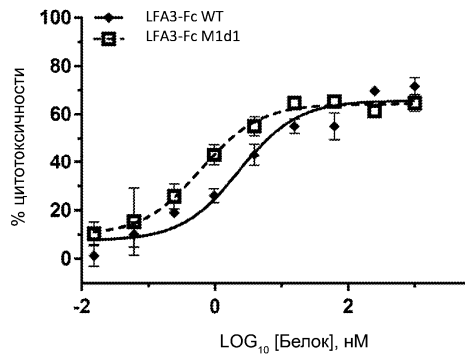
Фиг. 12С

CD8 CD45RO+



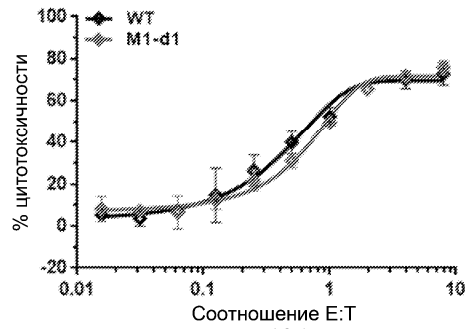
Фиг. 12D

CD8 CD45RO-



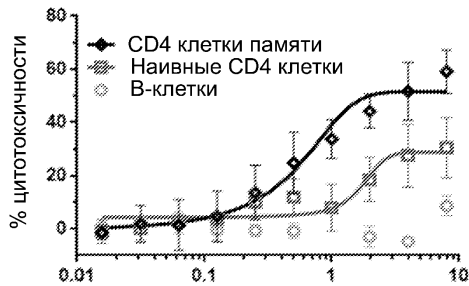
Фиг. 12Е

Анализ цитотоксичности: титрование NK CD4 клетки памяти



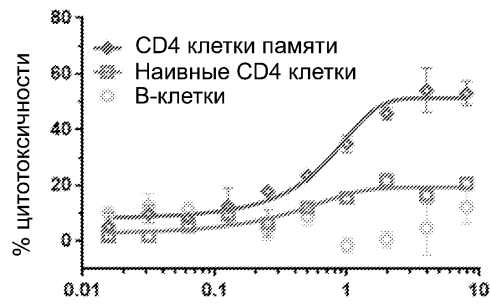
Фиг. 13А

Анализ цитотоксичности: титрование NK WT 100 нМ



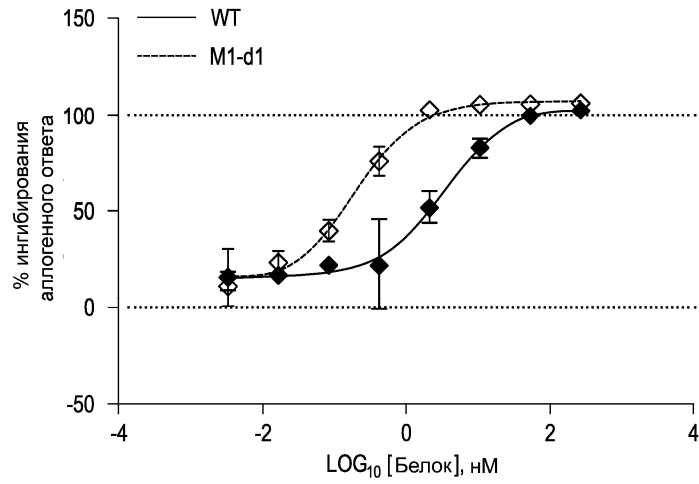
Фиг. 13В

M1-d1 100 нМ



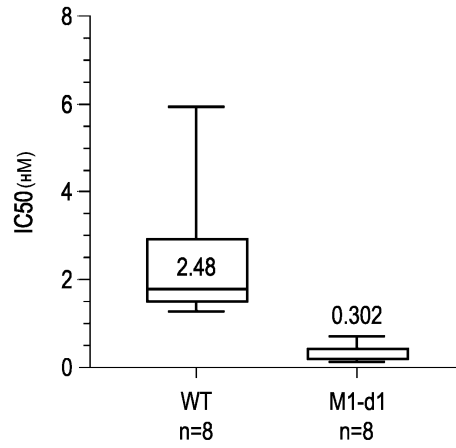
Фиг. 13С

Реакция смешанных лимфоцитов
Активированные CD4 клетки памяти



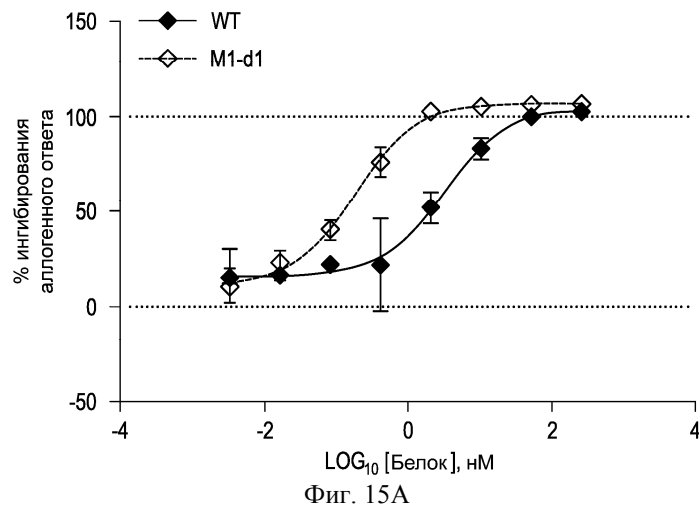
Фиг. 14А

Реакция смешанных лимфоцитов
Ингибирование размножения CD4 клеток памяти



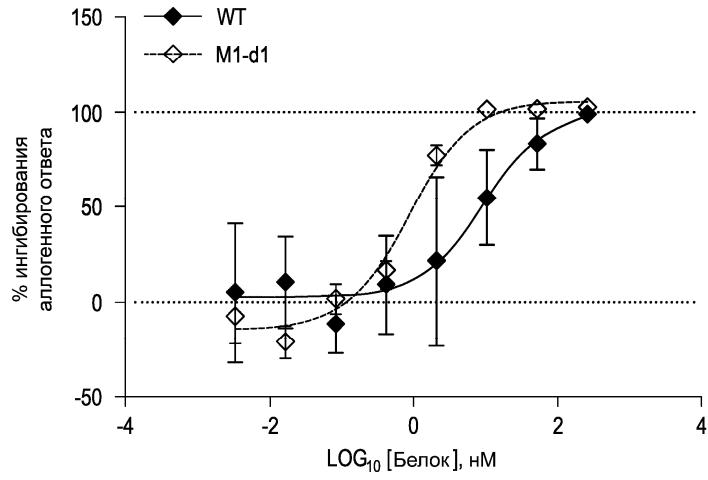
Фиг. 14В

Активированные CD4 клетки памяти
Нормальные NK-клетки



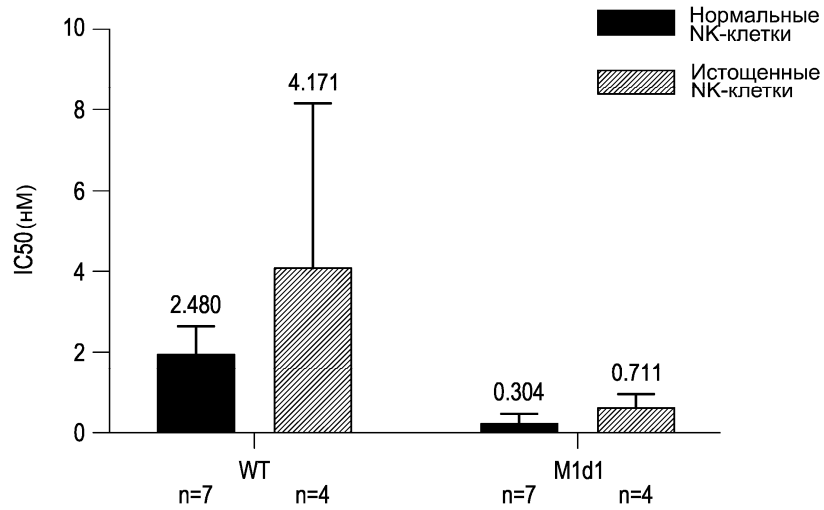
Фиг. 15А

Активированные CD4 клетки памяти
Истощенные NK-клетки



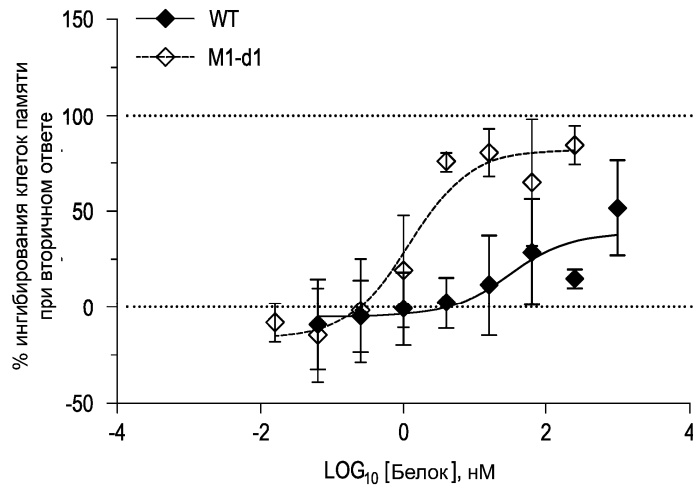
Фиг. 15B

Сравнение MLR при истощении NK



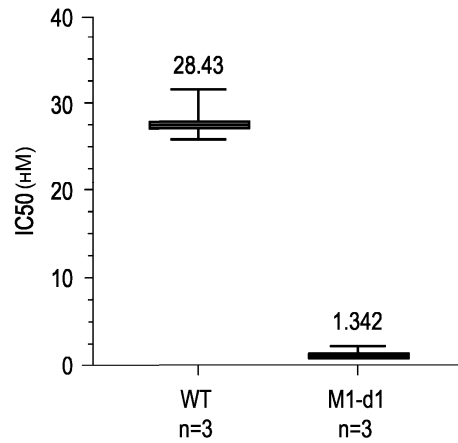
Фиг. 15C

Вторичный ответ на столбнячный токсин
Высвобождение IFNγ



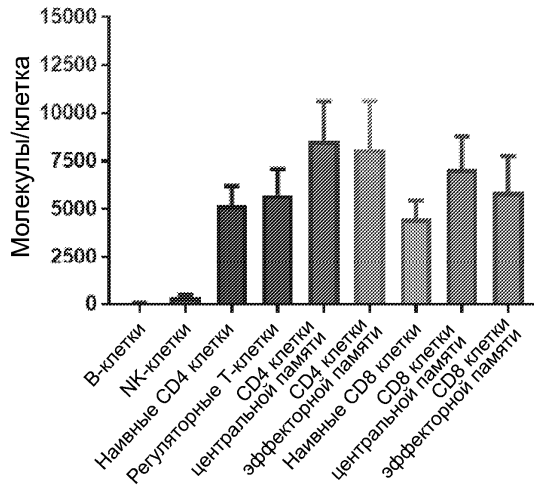
Фиг. 16A

Вторичный ответ на столбнячный токсин
Ингибирование продуцирования IFNγ



Фиг. 16В

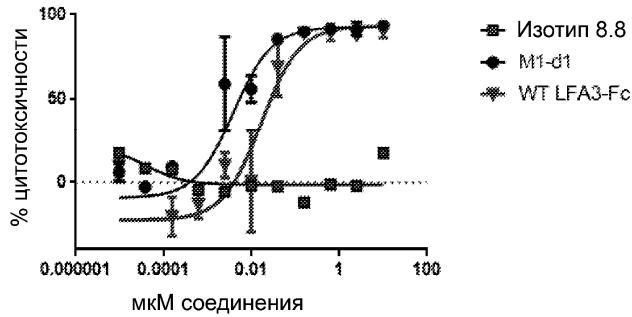
CD2 яванского макака от Quantibrite



N=8; CD8+ клетки, гейтированные по CD2+ (бимодальная экспрессия)

Фиг. 17

CD4 TEM

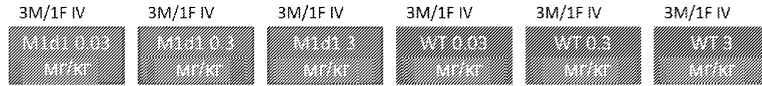


Фиг. 18А

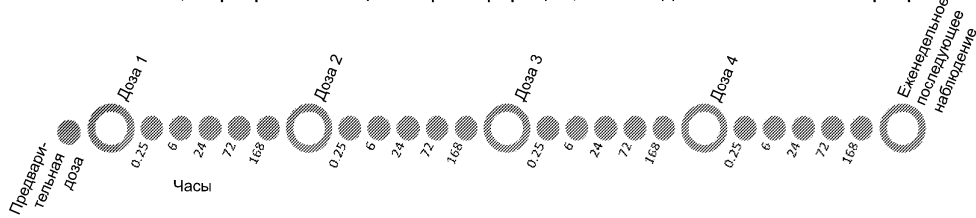
CD4+ TEM	M1d1 EC50 нМ	WT EC50нМ
Супо 1	22.05	33.88
M12817	3.78	16.32
YR669M	1.96	7.71

Фиг. 18В

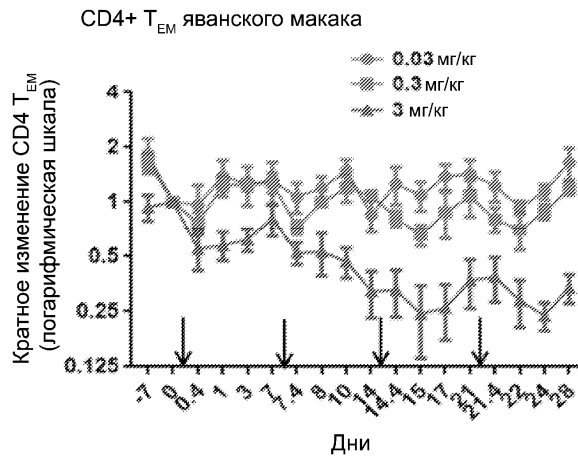
Цель: установление взаимоотношения ответа ФК/ФД повторной дозы для истощения Tmem и соотношение Treg/TEM in vivo. Включение WT LFA3-Fc для обеспечения сравнения с клиническим набором данных для алефацепта



- ФК-анализ
- Экстенсивный иммунофенотипический анализ, включающий подмножество Т-клеток, маркеры активации и пролиферации, и исследовательские биомаркеры

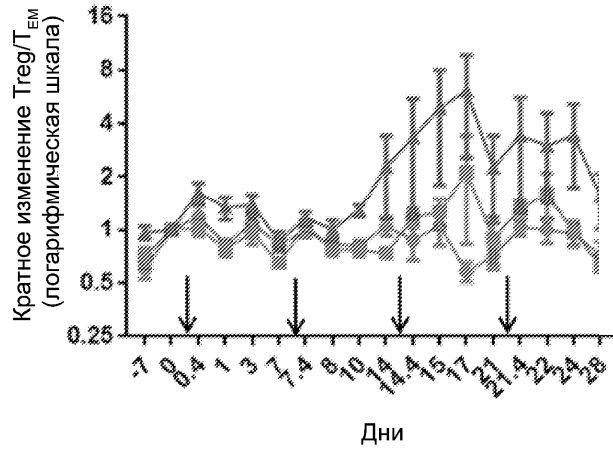


Фиг. 19

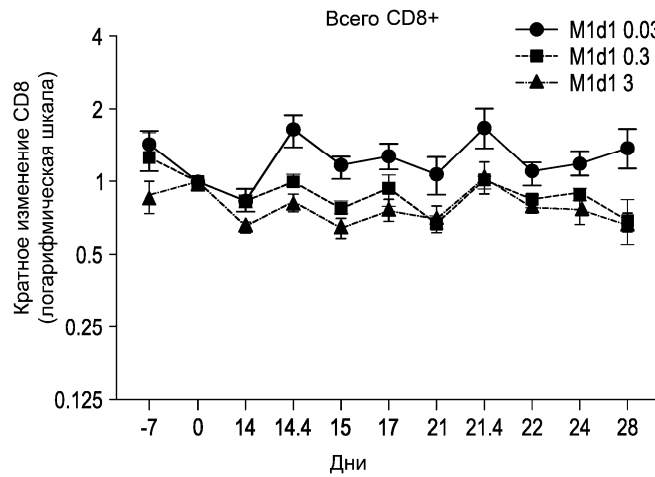
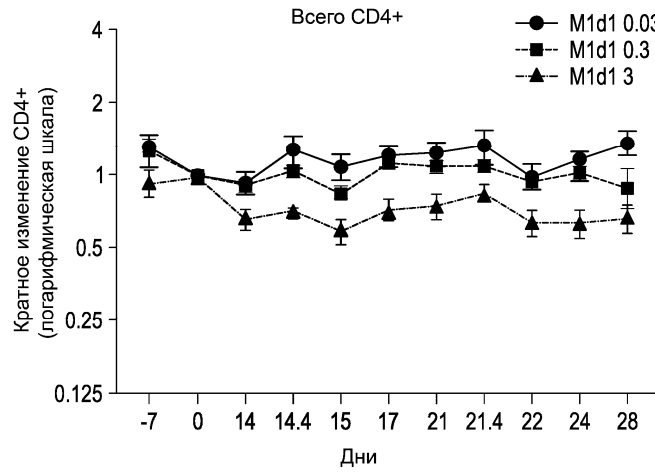


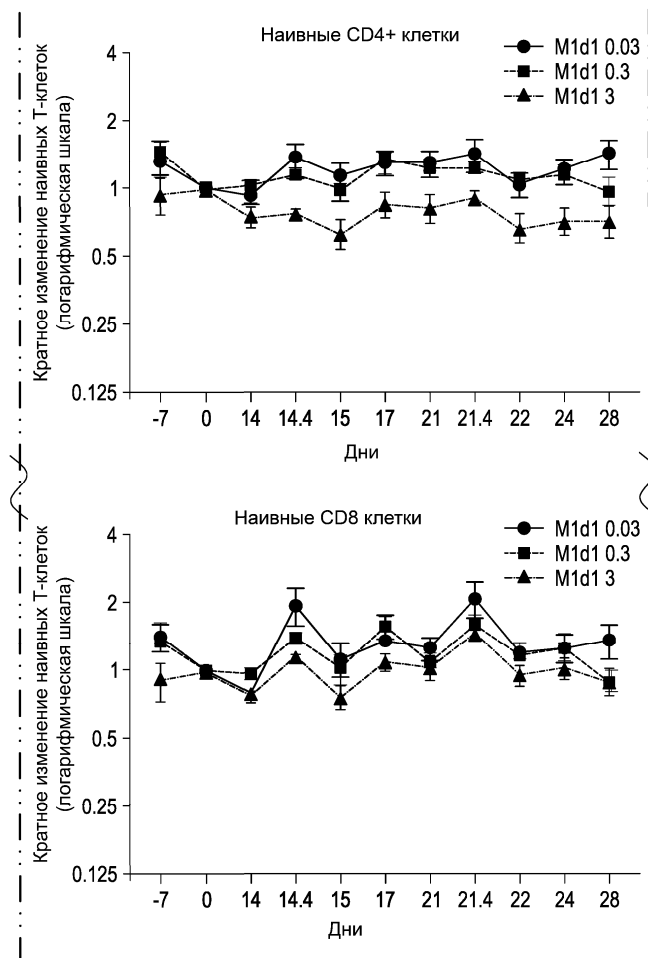
Фиг. 20А

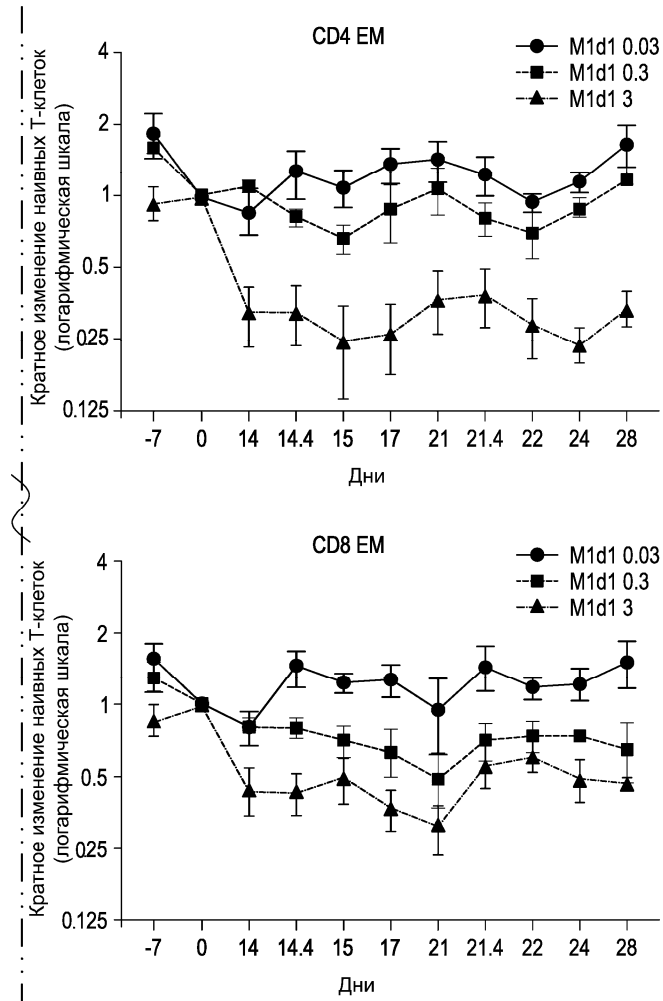
CD4+ Treg/ Γ_{EM} яванского макака



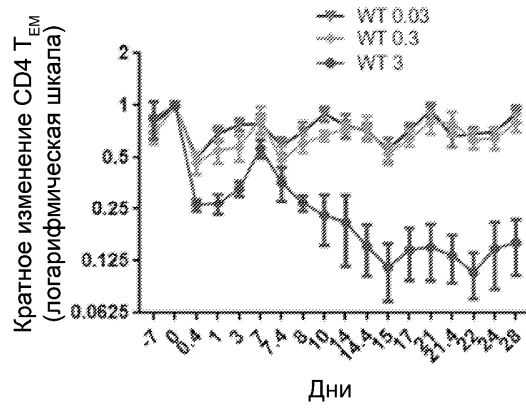
Фиг. 20В



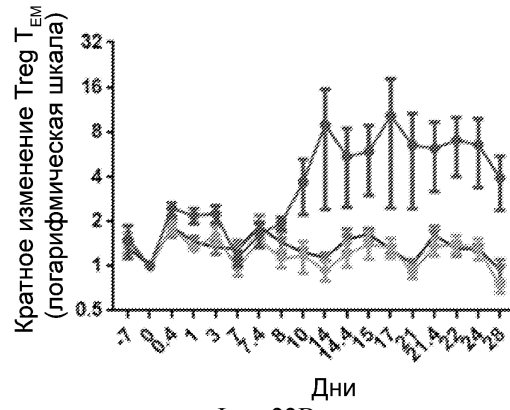




Фиг. 21

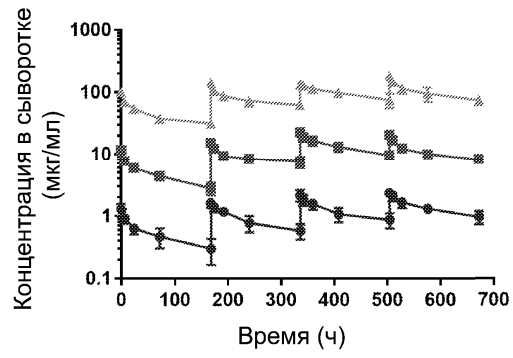


Фиг. 22А



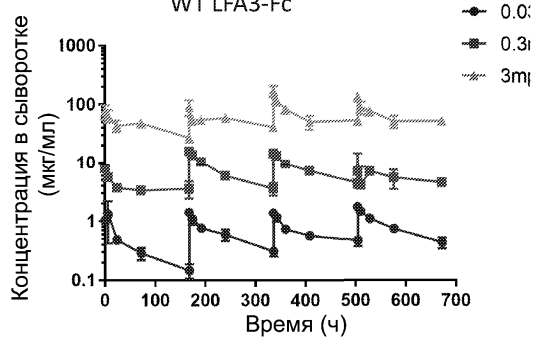
Фиг. 22В

M1d1



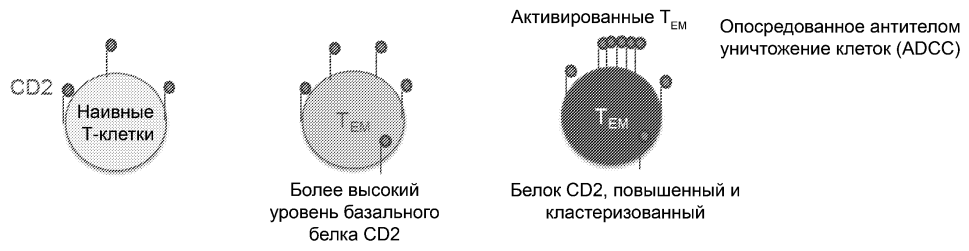
Фиг. 23А

WT LFA3-Fc

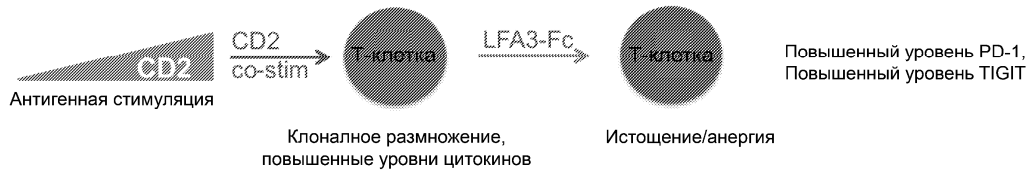


Фиг. 23В

1. Истощение клеток – предпочтительно направленно воздействует на Т-клетки эффекторной памяти

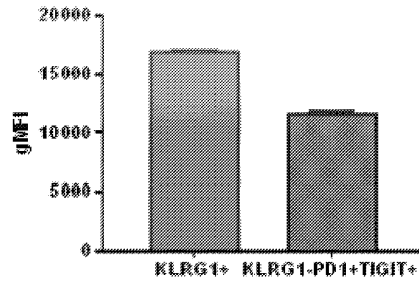


2. Модуляция CD2-индуцированных сигналов выживания, приводящих к истощению клеток/анергии



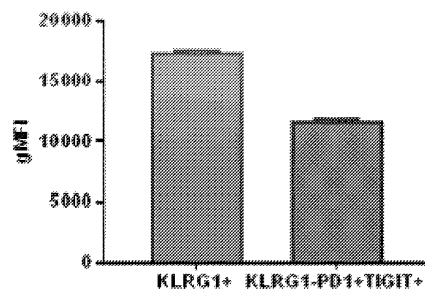
Фиг. 24

Экспрессия CD2 в CD4 EM

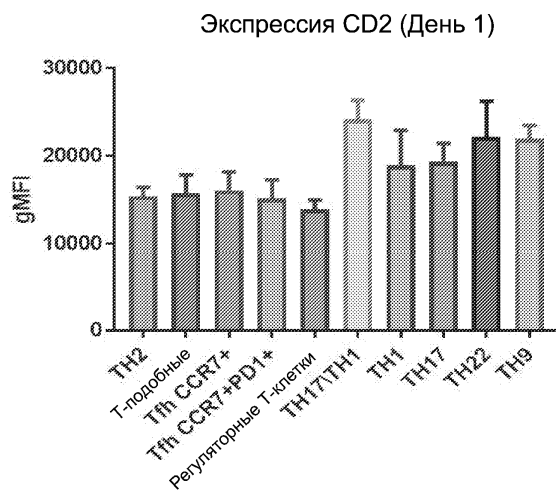


Фиг. 25А

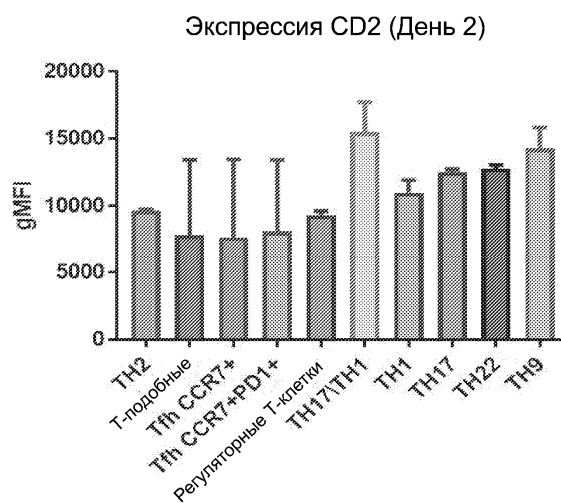
Экспрессия CD2 в CD4 EM



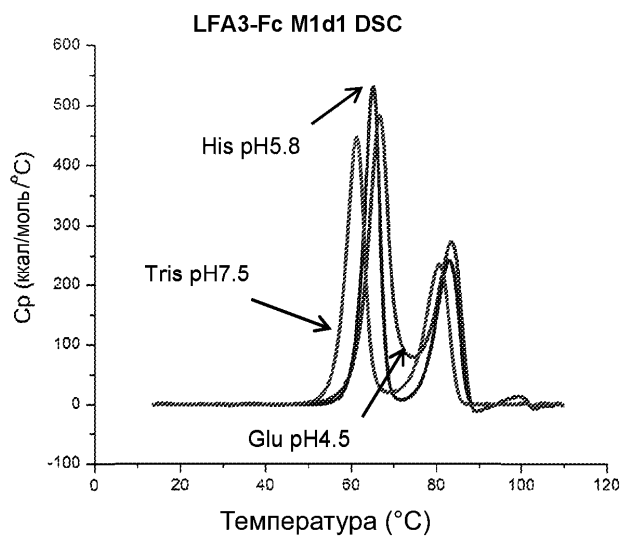
Фиг. 25В



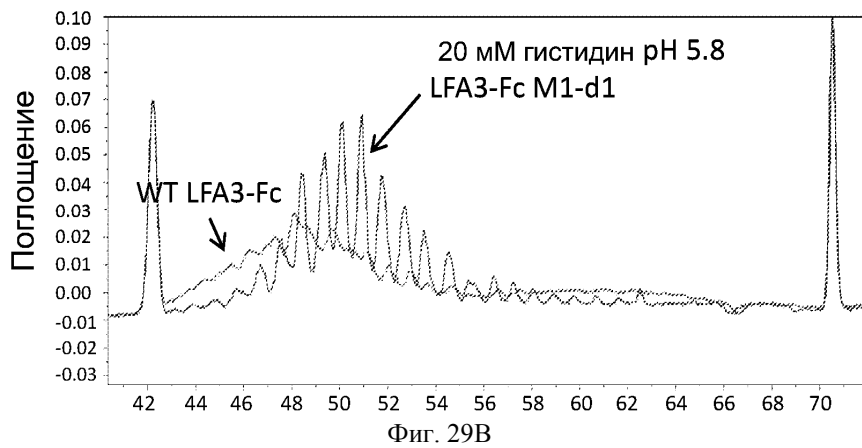
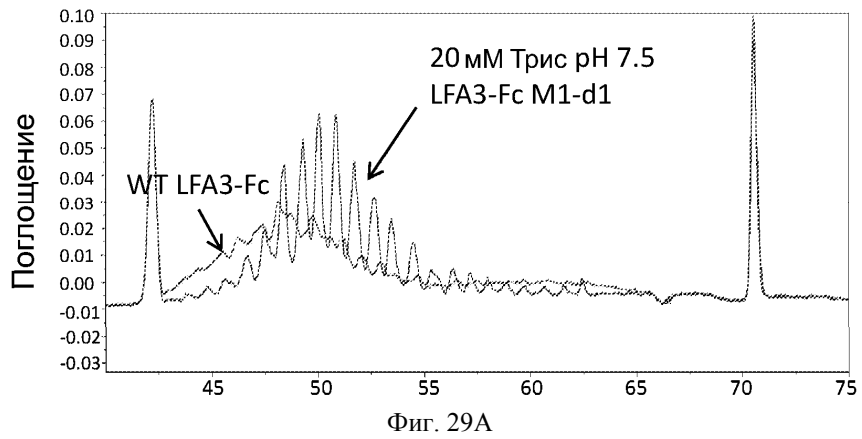
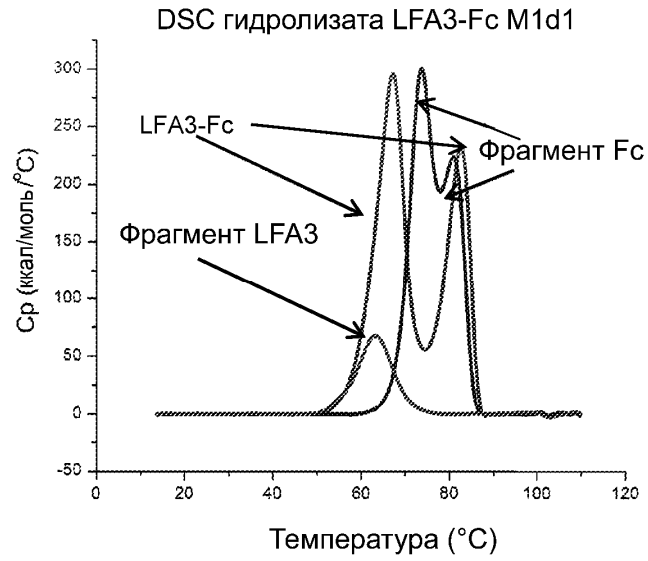
Фиг. 26А

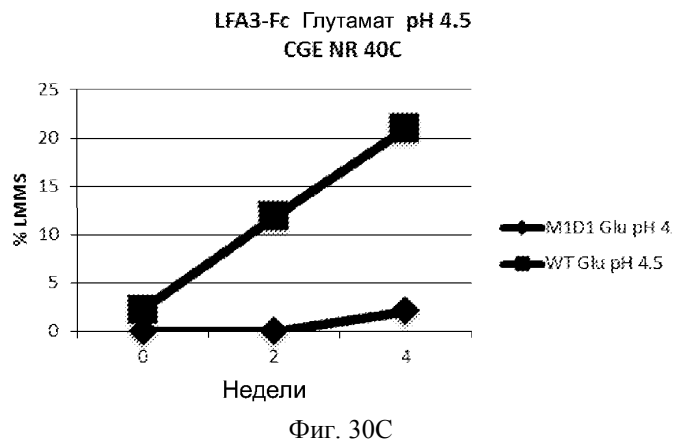
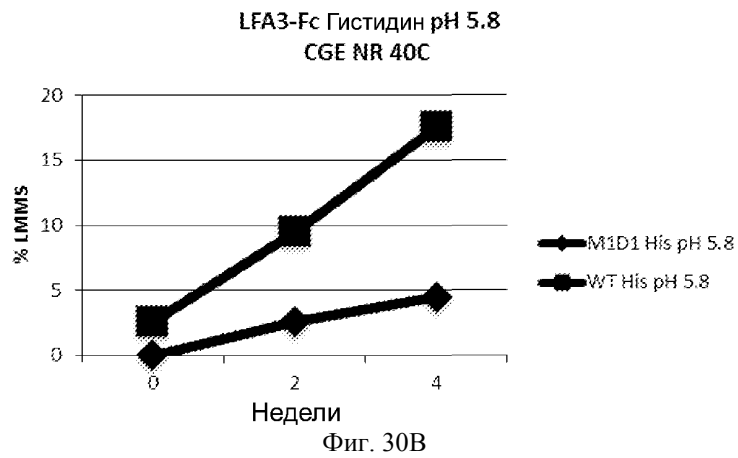
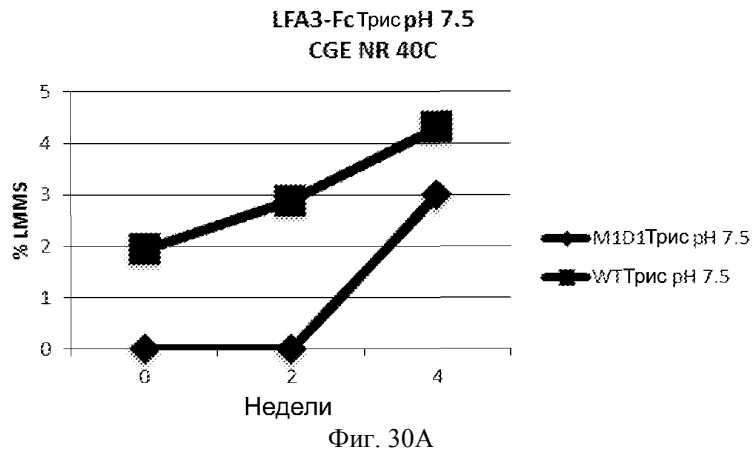
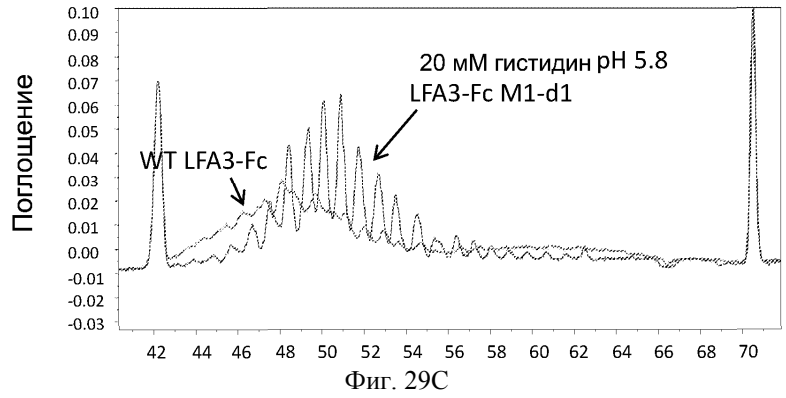


Фиг. 26В

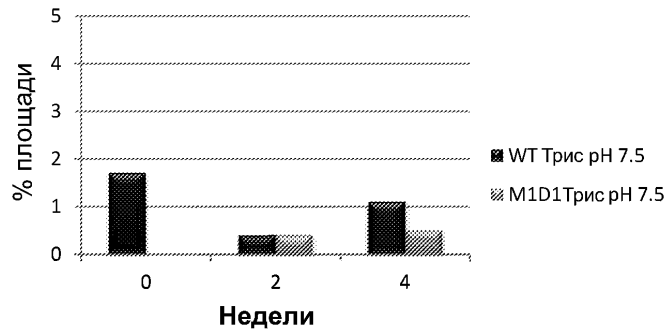


Фиг. 27



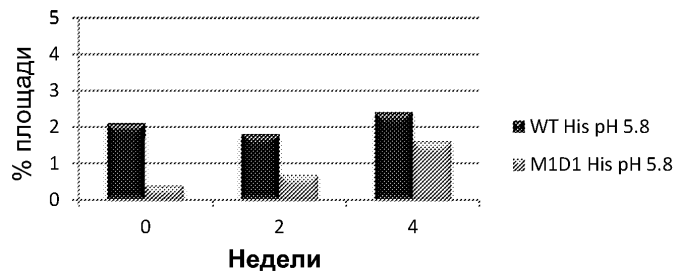


LFA3-Fc Трис pH 7.5 40C Стабильность-
HMMS SE-HPLC



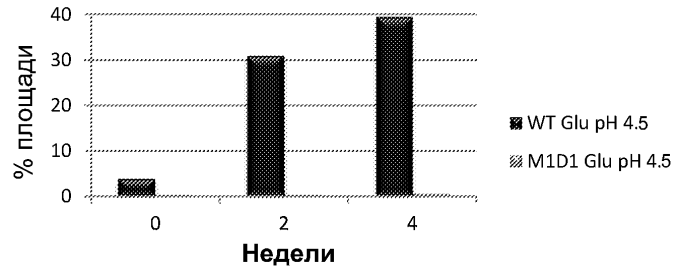
Фиг. 31А

LFA3-Fc Гистидин 5.8 40C Стабильность-
HMMS SE-HPLC



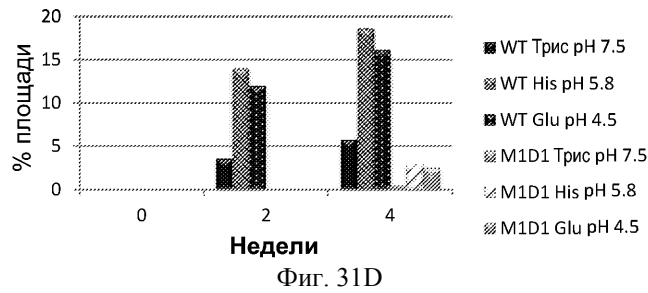
Фиг. 31В

LFA3-Fc Глутамат pH 4.5 40C Стабильность-
HMMS SE-HPLC



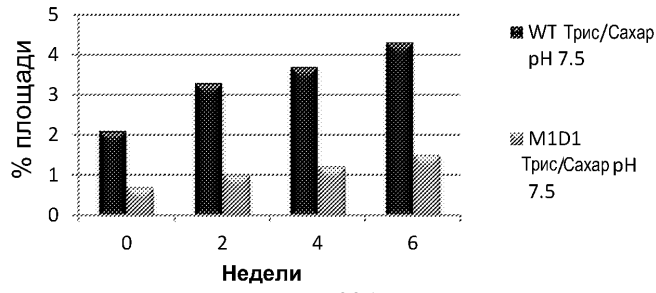
Фиг. 31С

LFA3-Fc 40C Стабильность-
LMMS SE-HPLC



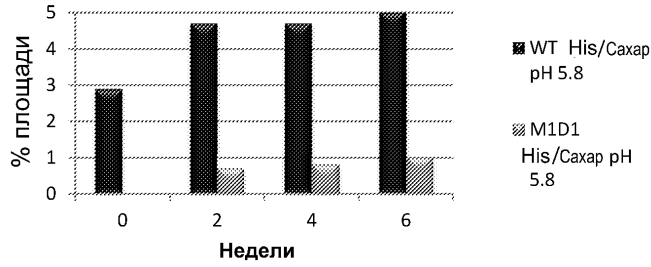
Фиг. 31D

**LFA3-Fc 25C Стабильность-
HMMS SE-HPLC**



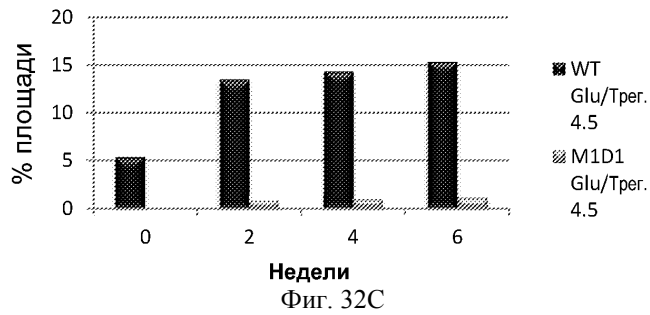
Фиг. 32А

**LFA3-Fc 25C Стабильность-
HMMS SE-HPLC**



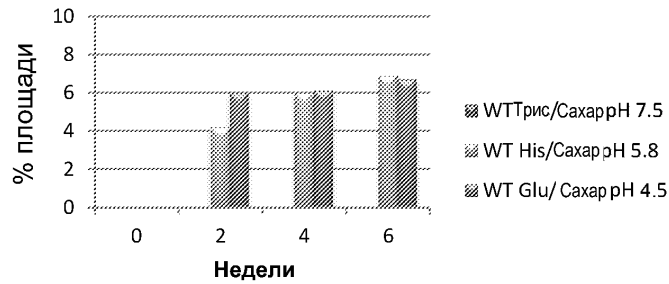
Фиг. 32В

**LFA3-Fc 25C Стабильность-
HMMS SE-HPLC**



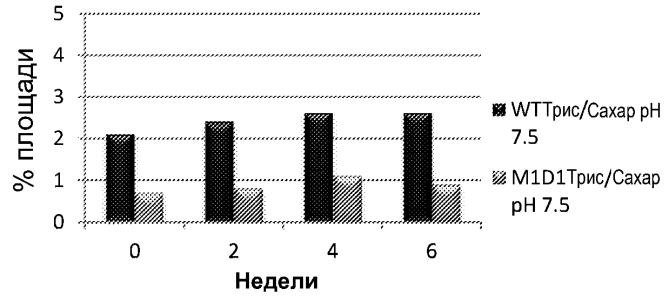
Фиг. 32С

**LFA3-Fc 25C Стабильность-
LMMS SE-HPLC**



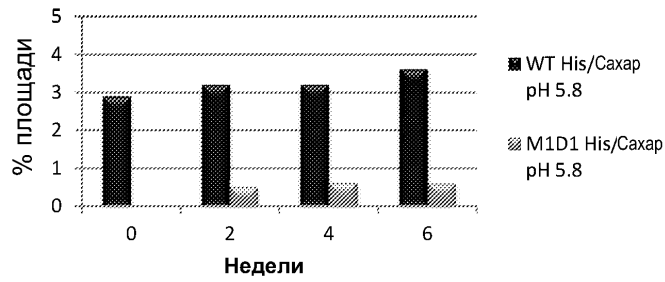
Фиг. 32D

**LFA3-Fc 5C Стабильность-
HMMS SE-HPLC**



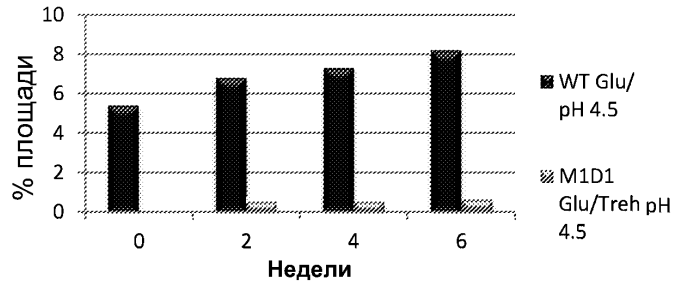
Фиг. 33А

**LFA3-Fc 5C Стабильность-
HMMS SE-HPLC**



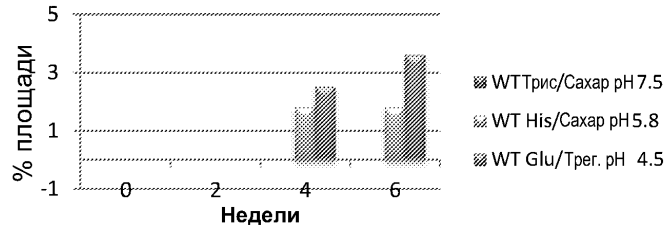
Фиг. 33В

**LFA3-Fc 5C Стабильность-
HMMS SE-HPLC**

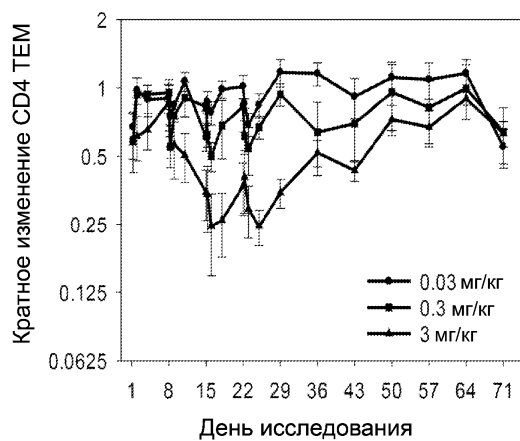


Фиг. 33С

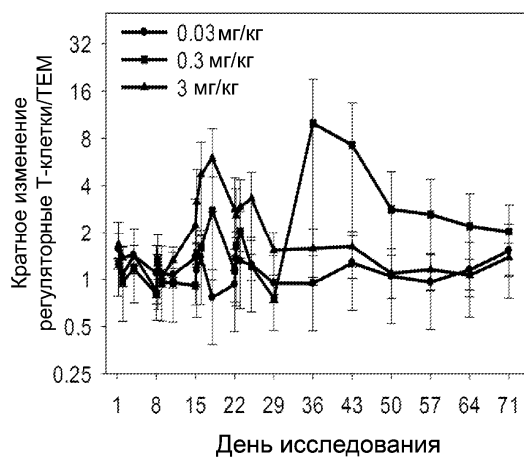
**LFA3-Fc 5C Стабильность-
LMMS SE-HPLC**



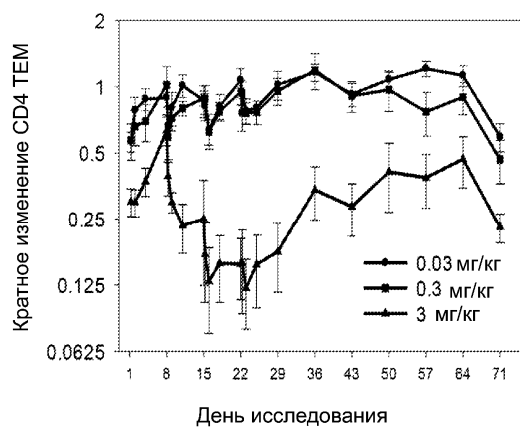
Фиг. 33D



Фиг. 34А



Фиг. 34В



Фиг. 35А

