



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **120088** (13) **C2**
(51) МПК

C07K 16/12 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/50 (2017.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2015 11604**
(22) Дата подання заявки: **30.05.2014**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.10.2019**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/829,461, 61/829,466, 14/284,609, PCT/US2014/039113**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **31.05.2013, 31.05.2013, 22.05.2014, 22.05.2014**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US, US, US, US**
(41) Публікація відомостей про заявку: **25.02.2016, Бюл.№ 4**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.10.2019, Бюл.№ 19**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/US2014/040324, 30.05.2014**

(72) Винахідник(и):
**Браун Ерік (US),
Дарвіш Мартін (US),
Флігейр Джон (US),
Хазенбос Вутер (US),
Лі Буйонг-Чул (US),
Лехар Софі М. (US),
Маріатхасан Санджев (US),
Морісакі Джон Хіроши (US),
Піллоу Томас Х. (US),
Стабен Ліанна (US),
Вандлен Річард (US),
Коефоед Клаус (DK),
Странд Магнус (DK),
Андерсен Пітер С. (DK)**
(73) Власник(и):
**ДЖЕНЕНТЕК, ІНК.,
1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080,
United States of America (US)**
(74) Представник:
**Кістерський Кирило Арсенійович,
реєстр. №207**
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
**WO 2004050846 A2, 17.06.2004
WO 2011008092 A2, 20.01.2011
WO 2005081711 A2, 09.09.2005
US 6322788 B1, 27.11.2001
KING H.D. et al. Monoclonal antibody conjugates of doxorubicin prepared with branched linkers: a novel method for increasing the potency of doxorubicin immunoconjugates. Bioconjugate chemistry, ACS, Washington, DC, US, 1999, Vol. 10, no. 2, P. 279 – 288
DUBOWCHIK G.M. et al. Doxorubicin immunoconjugates containing bivalent, lysosomally-cleavable dipeptide linkages. Bioorganic & medicinal chemistry letters, Pergamon, Amsterdam, NL, 2002, Vol. 12, no. 11, P. 1529 - 1532**

UA 120088 C2

(54) АНТИТІЛО ПРОТИ ТЕЙХОЄВИХ КИСЛОТ КЛІТИННОЇ СТІНКИ ТА ЙОГО КОН'ЮГАТ

(57) Реферат:

Винахід стосується антитіла проти тейхоєвих кислот клітинної стінки та його кон'югата з антибіотиком, способу їх одержання, фармацевтичної композиції, що їх містить, та способу їх застосування.

ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА РОДИННІ ЗАЯВКИ

Дана заявка претендує на пріоритет за заявкою на патент США номер 14/284,609, яка подана 22 2014, що є не попередньою заявкою, яка подана відповідно до 37 CFR §1.53 (b), і відповідно до 35 USC §119(e) просить пріоритет за попередньою заявкою США номер 61/829,461 яка подана 31 травня 2013, які включені в даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті.

ПРЕДСТАВЛЕННЯ ПЕРЕЛІКУ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ У ВИГЛЯДІ ТЕКСТОВОГО ФАЙЛУ У ФОРМАТІ ASCII

Зміст представленого текстового файлу у форматі ASCII включений в даний документ за допомогою посилання у всій його повноті: машиночитана форма (CRF) переліку послідовностей (назва файлу: P4960R2WO_PCTSequenceListing.txt, дата створення: 30 травня 2014, розмір: 195,240 байт).

ОБЛАСТЬ ТЕХНІКИ

Даний винахід відноситься до антитіл проти тейхоевих кислот клітинної стінки ("анти-WTA"), кон'югованих із антибіотиками типу рифаміцину, і до застосування отриманих кон'югатів антитіло-антибіотик для лікування інфекційних захворювань.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Патогенні бактерії є істотною причиною захворювань і смерті, як у людей, так і у тварин. І головне місце серед них займає *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*; SA), що є провідною причиною бактеріальних інфекцій у людини в світі. *S. aureus* може викликати ряд захворювань, від незначних шкірних інфекцій до загрозливих життю захворювань, таких як пневмонія, менінгіт, остеомієліт, ендокардит, інфекційно-токсичний шок (ІТШ), бактеріємія і сепсис. Збудник може викликати інфекції шкіри, м'яких тканин, органів дихання, кісток, суглобів, ендovasкулярну та ранову інфекцію. *S. aureus* все ще є однією з п'яти найпоширеніших причин внутрішньолікарняних інфекцій та часто є причиною післяопераційних раневих інфекцій. Щороку приблизно 500000 пацієнтів в американських лікарнях заражаються стафілококовою інфекцією.

В останні кілька десятиліть інфекцію, викликану *S. aureus*, стає все важче і важче лікувати, в основному, через появу стійкого до метициліну *S. aureus* (MRSA), резистентного до всіх відомих бета-лактамних антибіотиків (Boucher, H.W. et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 48, 1-12 (2009)). Ситуація є настільки важкою, що до 2005, як повідомлялося, інфекція, викликана MRSA, стала провідною причиною смерті від єдиного інфекційного агента – понад 15000 смертей у Сполучених Штатах (DeLeo, F.R. & Chambers, H.F. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *The Journal of Clinical Investigation* 119:2464-2474 (2009)). Ванкоміцин, лінезолід і даптоміцин стали кращими антибіотиками для лікування інвазивних інфекцій, викликаних MRSA (Boucher, H., Miller, L.G. & Razonable, R.R. Serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 51 Suppl 2, S183-197 (2010)). Проте, також повідомлялось, що клінічні штами MRSA характеризуються зниженою сприйнятливістю до ванкоміцину й перехресною резистентністю до лінезоліду та даптоміцину (Nannini, E., Murray, B.E. & Arias, C.A. Resistance or decreased susceptibility to glycopeptides, daptomycin, and linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Current opinion in pharmacology* 10, 516-521 (2010)). Згодом, доза ванкоміцину, необхідна для подолання стійкості, підвищується до рівнів, пов'язаних із нефротоксичністю. Таким чином, смертність і захворюваність від інвазивних інфекцій MRSA залишається високою незважаючи на ці антибіотики.

Незважаючи на те, що SA зазвичай вважається позаклітинним патогеном, дослідження, проведені, щонайменше, 50 років тому, виявили його здатність інфікувати й виживати в різних типах клітин-хазяїнів, як у професійних фагоцитах, так і у нефагоцитуючих клітинах (Gresham, H.D. et al. Survival of *Staphylococcus aureus* inside neutrophils contributes to infection. *J Immunol* 164, 3713-3722 (2000); Anwar, S., Prince, L.R., Foster, S.J., Whyte, M.K. & Sabroe, I. The rise and rise of *Staphylococcus aureus*: laughing in the face of granulocytes. *Clinical and Experimental Immunology* 157, 216-224 (2009); Fraunholz, M. & Sinha, B. Intracellular *staphylococcus aureus*: Live-in and let die. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2, 43 (2012); Garzoni, C. & Kelley, W.L. Return of the Trojan horse: intracellular phenotype switching and immune evasion by *Staphylococcus aureus*. *EMBO molecular medicine* 3:115-117 (2011)). Таке факультативне внутрішньоклітинне персистування дозволяє вислизати від імунологічного нагляду хазяїна, тривалий час колонізувати хазяїна, підтримувати хронічно інфікований стан і, ймовірно, є причиною клінічних невдач і рецидивів після традиційної терапії антибіотиками. Більше того, вплив на внутрішньоклітинні бактерії неоптимальних концентрацій антибіотиків може призвести

до появи штамів, стійких до антибіотиків, що загострює цю клінічну проблему. Відповідно до цих спостережень, лікування пацієнтів із інвазивними інфекціями MRSA, такими як бактеріємія або ендокардит, ванкоміцином або даптоміцином було невдалим у більше ніж 50% випадків (Kullar, R., Davis, S.L., Levine, D.P. & Rybak, M.J. Impact of vancomycin exposure on outcomes in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: support for consensus guidelines suggested targets. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 52, 975-981 (2011); Fowler, V.G., Jr. et al. Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *The New England journal of medicine* 355, 653-665 (2006); Yoon, Y.K., Kim, J.Y., Park, D.W., Sohn, J.W. & Kim, M.J. Predictors of persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia in patients treated with vancomycin. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 65:1015-1018 (2010)). Таким чином, більш успішна антистафілококова терапія повинна включати елімінацію внутрішньоклітинних бактерій.

Більшість сучасних антибактеріальних агентів за своєю хімічною природою є напівсинтетичними модифікаціями різних природних сполук. Вони включають, наприклад, бета-лактамі антибактеріальні агенти, які включають пеніциліни (продуковані грибами з роду *Penicillium*), цефалоспорины та карбапенеми. Одні антимікробні сполуки, які як і раніше виділяють з живих організмів, включають аміноглікозиди, тоді як інші антибактеріальні агенти, наприклад, сульфаніламід, хінолони й оксазолідинони, одержують винятково шляхом хімічного синтезу. Відповідно до цього, множину антибактеріальних сполук класифікують на основі їх хімічного/біосинтетичного походження як природні, напівсинтетичні та синтетичні. Інша класифікаційна система заснована на біологічній активності; у цій класифікації антибактеріальні агенти діляться на дві більші групи відповідно до їхнього біологічного впливу на мікроорганізми: бактерицидні агенти вбивають бактерії, а бактериостатичні агенти сповільнюють або гальмують ріст бактерій.

Ансаміцини являють собою клас антибіотиків, що включає рифаміцин, рифампін, рифампіцин, рифабутин, рифапентин, рифалазил, ABI-1657 та їхні аналоги, які інгібують бактеріальну РНК-полімеразу та проявляють виняткову активність у відношенні грампозитивних і деяких грамнегативних бактерій (Rothstein, D.M., et al (2003) *Expert Opin. Invest. Drugs* 12(2):255-271; US 7342011; US 7271165).

Було описано застосування імунотерапії для запобігання та лікування інфекцій, викликаних *S. aureus* (у тому числі MRSA). US2011/0262477 присвячена застосуванням бактеріальних білків адгезії Eap, Emp і AdsA як вакцини для стимуляції імунної відповіді проти MRSA. У WO2000071585 описані виділені моноклональні антитіла, реактивні відносно певних штамів ізолятів *S. aureus*. В US20110059085A1 запропонована стратегія, заснована на використанні антитіл ізотипу IgM, специфічних до одного або декількох капсулярних антигенів SA, хоча конкретні антитіла описані не були.

Тейхоєві кислоти (TA) являють собою бактеріальні полісахариди, виявлені в клітинній стінці грампозитивних бактерій, у тому числі SA. Тейхоєві кислоти клітинної стінки (WTA) ковалентно зв'язані з пептидоглікановим (PDG) шаром клітинної стінки; тоді як ліпотейхоєві кислоти (LTA) ковалентно зв'язані з ліпідами цитоплазматичної мембрани. Xia et al. (2010) *Intl. J. Med. Microbiol.* 300:148-54. Ці глікополімери відіграють ключову роль у виживанні бактерій у несприятливих умовах і в інших базових клітинних процесах. Відомі структури WTA широко варіюють між видами бактерій. TA *S. aureus* складаються з повторюваних поліол фосфатних субодиниць, таких як рибіт фосфат або гліцерин фосфат. З огляду на їхню структурну розмаїтість і мінливість, WTA вважаються привабливими мішенями для антитіл і в якості вакцин, *див. там же*.

Кон'югати антитіло-лікарський засіб (ADC), також відомі як імунокон'югати, являють собою хіміотерапевтичні молекули спрямованої дії, які поєднують ідеальні властивості як антитіл, так і цитотоксичних лікарських засобів, направляючи потужні цитотоксичні лікарські засоби до пухлинних клітин, експресуючих антиген (Teicher, B.A. (2009) *Curr. Cancer Drug Targets* 9:982-1004), тим самим підвищуючи терапевтичний індекс за рахунок максимізації ефективності та мінімізації нецільової (побічної) токсичності (Carter, P.J. and Senter P.D. (2008) *The Cancer J.* 14(3):154-169; Chari, R.V. (2008) *Acc. Chem. Res.* 41:98-107). ADC включають антитіло спрямованої дії, ковалентно приєднане через лінкер до цитотоксичного фрагмента лікарського засобу. Імунокон'югати уможливають спрямовану доставку фрагмента лікарського засобу в пухлину та його внутрішньоклітинне накопичення, тоді як системне введення некон'югованих лікарських засобів може призводити до неприйнятних рівнів токсичності відносно нормальних клітин, а також елімінацію пухлинних клітин (Polakis P. (2005) *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:382-387). Розробка ефективного ADC для даного антигена-мішені (цільового антигена) залежить від оптимізації таких параметрів як рівні експресії антигенів-мішені, доступність пухлини (Kovtun,

Y.V. and Goldmacher V.S. (2007) *Cancer Lett.* 255:232-240), вибір антитіла (US 7964566), стабільність лінкера (Erickson et al (2006) *Cancer Res.* 66(8):4426-4433; Doronina et al (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124; Alley et al (2008) *Bioconjugate Chem.* 19:759-765), механізм дії й активність цитотоксичного лікарського засобу, навантаження лікарського засобу (Hamblett et al (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:7063-7070) і спосіб кон'югації фрагмента лінкер-лікарський засіб з антитілом (Lyon, R. et al (2012) *Methods in Enzym.* 502:123-138; Xie et al (2006) *Expert. Opin. Biol. Ther.* 6(3):281-291; Kovtun et al (2006) *Cancer Res.* 66(6):3214-3121; Law et al (2006) *Cancer Res.* 66(4):2328-2337; Wu et al (2005) *Nature Biotech.* 23(9):1137-1145; Lambert J. (2005) *Current Opin. in Pharmacol.* 5:543-549; Hamann P. (2005) *Expert Opin. Ther. Patents* 15(9):1087-1103; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Trail et al (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Res.* 19:605-614).

Концепція ADC у раковій терапії була поширена й на антибактеріальну терапію, у цьому випадку лікарська частина являє собою антибіотик, у результаті виходить кон'югат антитіло-антибіотик (AAC). В US5545721 і US6660267 описаний синтез кон'югату неспецифічний імуноглобулін-антибіотик, що зв'язується з поверхнею цільової бактерії через антибіотик, і його застосування для лікування сепсису. В US 7569677 і родинних патентах запропоновані антитіла, кон'юговані з антибіотиком, антигенсполучна частина яких специфічна відносно бактеріального антигена (такого як капсулярний полісахарид SA), але в яких відсутня константна область, що реагує з бактеріальним Fc-сполучним білком (наприклад, стафілококовий білок A).

СУТНІСТЬ ВИНАХОДУ

Даний винахід передбачає композиції, названі "кон'югати антитіло-антибіотик" або "AAC", що включають антитіло, кон'юговане шляхом ковалентного приєднання з одним або декількома фрагментами антибіотиків типу рифаміцину.

Один із аспектів даного винаходу являє собою виділене анти-WTA моноклональне антитіло, що включає легкий ланцюг і H ланцюг, де L ланцюг включає CDR L1, CDR L2 і CDR L3, і H ланцюг включає CDR H1, CDR H2 і CDR H3, де CDR L1, CDR L2 і CDR L3 і CDR H1, CDR H2 і CDR H3 включають амінокислотні послідовності CDR кожного з антитіл 4461 (SEQ ID NO: 1-6), 4624 (SEQ ID NO: 7-12), 4399 (SEQ ID NO: 13-18) і 6267 (SEQ ID NO: 19-24), відповідно, як показано в Таблицях 6A і 6B.

В одному з варіантів втілення, виділене анти-WTA моноклональне антитіло включає варіабельну область важкого ланцюга (VH), де VH має, щонайменше, 95% ідентичність послідовності за довжиною області VH, вибраної з послідовності VH з SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:28, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:32 антитіл 4461, 4624, 4399 і 6267, відповідно. В одному з варіантів втілення, це антитіло також включає варіабельну область L ланцюга (VL), де VL має, щонайменше, 95% ідентичність послідовності за довжиною VL, вибраної з послідовності VL з SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31 антитіл 4461, 4624, 4399 і 6267, відповідно. В іншому варіанті втілення, виділене анти-WTA моноклональне антитіло включає варіабельну область L ланцюга (VL), де VL має, щонайменше, 95% ідентичність послідовності за довжиною VL, вибраної з послідовності VL з SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:31 антитіл 4461, 4624, 4399 і 6267, відповідно. У будь-яких попередніх варіантах втілення ідентичність послідовності може становити 96%, 97%, 98%, 99% або 100%.

У більш конкретному варіанті втілення, антитіло включає:

- (i) VL з SEQ ID NO: 25 і VH з SEQ ID NO: 26;
- (ii) VL з SEQ ID NO: 27 і VH з SEQ ID NO: 28;
- (iii) VL з SEQ ID NO: 29 і VH з SEQ ID NO: 30; або
- (iv) VL з SEQ ID NO: 31 і VH з SEQ ID NO: 32.

У деяких варіантах втілення, виділене анти-WTA (тейхоеві кислоти клітинної стінки) моноклональне антитіло включає легкий (L) ланцюг і важкий (H) ланцюг, де:

(a) L ланцюг включає CDR L1, що включає послідовність KSSQSVLSRANNYYVA (SEQ ID NO:1), CDR L2, що включає послідовність WASTREF (SEQ ID NO:2), і CDR L3, що включає послідовність QQYYTSRRT (SEQ ID NO:3); і H ланцюг включає CDR H1, що включає послідовність DYYMH (SEQ ID NO:4), CDR H2, що включає послідовність WINPKSGGTNYAQRFGQ (SEQ ID NO:5), і CDR H3, що включає послідовність DCGSGGLRDF (SEQ ID NO:6);

(b) L ланцюг включає CDR L1, що включає послідовність RSNQNLLSSSNNNYLA (SEQ ID NO:7), CDR L2, що включає послідовність WASTRES (SEQ ID NO:8), і CDR L3, що включає послідовність QQYYANPRT (SEQ ID NO:9); і H ланцюг включає CDR H1, що включає послідовність DYYIH (SEQ ID NO:10), CDR H2, що включає послідовність WINPNTGGTYAQKFRD (SEQ ID NO:11), і CDR H3, що включає послідовність DCGRGGLRDI (SEQ ID NO:12);

(с) L ланцюг включає CDR L1, що включає послідовність KSNQNVLASSNDKNYLA (SEQ ID NO:13), CDR L2, що включає послідовність WASIRES (SEQ ID NO:14), і CDR L3, що включає послідовність QQYYTNPRT (SEQ ID NO:15); і H ланцюг включає CDR H1, що включає послідовність DYYIH (SEQ ID NO:16), CDR H2, що включає послідовність WINPNTGGTNYAQKFQG (SEQ ID NO:17), і CDR H3, що включає послідовність DCGNAGLRDI (SEQ ID NO:18); або

(d) L ланцюг включає CDR L1, що включає послідовність KSSQNVLYSSNNKNYLA (SEQ ID NO:19), CDR L2, що включає послідовність WASTRES (SEQ ID NO:20), і CDR L3, що включає послідовність QQYYTSPPYT (SEQ ID NO:21); і H ланцюг включає CDR H1, що включає послідовність SYWIG (SEQ ID NO:22), CDR H2, що включає послідовність IHPGDSKTRYSPSFQG (SEQ ID NO:23), і CDR H3, що включає послідовність LYCSGGSCYSDFRSSLGAGGYYYGGMGV (SEQ ID NO:24).

У будь-якому з попередніх варіантів втілення антитіло може являти собою антигенсполучний фрагмент без області Fc. У деяких варіантах втілення, антитіло являє собою F(ab) або F(ab')₂. У деяких варіантах втілення, антитіло також включає константну область важкого ланцюга й/або константну область легкого ланцюга, де константна область важкого ланцюга й/або константна область легкого ланцюга включає одну або декілька амінокислот, заміщених на залишки цистеїну. У деяких варіантах втілення, константна область важкого ланцюга включає амінокислотну заміну A118C і/або S400C, і/або константна область легкого ланцюга включає амінокислотну заміну V205C, де нумерація наведена відповідно до нумерації EU. У деяких варіантах втілення, константна область важкого ланцюга включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:149, і/або константна область легкого ланцюга включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:151. У деяких варіантах втілення, константна область важкого ланцюга включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:149, і константна область легкого ланцюга включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:150. У деяких варіантах втілення, константна область важкого ланцюга включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:148, і константна область легкого ланцюга включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:151.

В одному з аспектів, антитіло у будь-якому з попередніх варіантів втілення сполучається з WTA альфа.

В іншому аспекті, даний винахід передбачає виділене анти-WTA моноклональне антитіло, що включає легкий ланцюг і H ланцюг, де L ланцюг включає CDR L1, CDR L2, і CDR L3, і/або H ланцюг включає CDR H1, CDR H2 і CDR H3, де CDR L1, CDR L2, і CDR L3 і CDR H1, CDR H2 і CDR H3 включають амінокислотні послідовності відповідних CDR кожного з антитіл, наведених на Фіг. 14 (SEQ ID NO: 33-110). В іншому аспекті, даний винахід передбачає виділене анти-WTA моноклональне антитіло, що включає легкий ланцюг і H ланцюг, де L ланцюг включає CDR L1, CDR L2, і CDR L3, і/або H ланцюг включає CDR H1, CDR H2 і CDR H3, де CDR L1, CDR L2, і CDR L3 і CDR H1, CDR H2 і CDR H3 включають амінокислотні послідовності відповідних CDR кожного з антитіл, наведених на Фіг. 15A, 15B, 16A і 16B (антитіла 6078, 6078.v2HC-Cys, 6078.v2LC-Cys, 6078.v3HC-Cys, 6078.v3LC-Cys, 6078.v4HC-Cys, 6078.v4LC-Cys, 6078.v4HCLC-Cys, 4497, 4497.v8HC-Cys, 4497.v8LC-Cys і 4497.v8HCLC-Cys). У певному варіанті втілення ці антитіла зв'язуються з WTA бета.

В іншому аспекті, даний винахід передбачає виділене анти-WTA моноклональне антитіло, зокрема, анти-WTA бета моноклональне антитіло, яке включає варіабельну область L ланцюга (VL), де VL має, щонайменше, 95% ідентичність послідовності за довжиною VL, вибраної з послідовності VL, що відповідає кожному з антитіл 6078, 6263, 4450, 6297, 6239, 6232, 6259, 6292, 4462, 6265, 6253, 4497 і 4487 відповідно, як показано на Фіг. 17A-1 - 17A-2 для положень 1-107 за нумерацією Kabat. В інших варіантах втілення, антитіло також включає варіабельну область важкого ланцюга (VH), де VH має, щонайменше, 95% ідентичність послідовності за довжиною VH, вибраної з послідовностей VH, що відповідають кожному з антитіл 6078, 6263, 4450, 6297, 6239, 6232, 6259, 6292, 4462, 6265, 6253, 4497 і 4487 відповідно, як показано на Фіг. 17B-1 - 17B-2 для положень 1-113 за нумерацією Kabat. У будь-яких попередніх варіантах втілення ідентичність послідовності може становити 96%, 97%, 98%, 99% або 100%. У більш конкретному варіанті втілення, VH включає послідовність SEQ ID NO: 112, і VL включає SEQ ID NO: 111.

В іншому аспекті, даний винахід передбачає виділене анти-WTA моноклональне антитіло, зокрема, анти-WTA бета моноклональне антитіло, яке включає варіабельну область L ланцюга (VL), де VL має, щонайменше, 95% ідентичність послідовності за довжиною VL, вибраної з послідовності VL, що відповідають кожному з антитіл, як показано на Фіг. 15A або 16A (антитіла 6078, 6078.v2HC-Cys, 6078.v2LC-Cys, 6078.v3HC-Cys, 6078.v3LC-Cys, 6078.v4HC-Cys, 6078.v4LC-Cys, 6078.v4HCLC-Cys, 4497, 4497.v8HC-Cys, 4497.v8LC-Cys і 4497.v8HCLC-Cys) для

положень 1-107 за нумерацією Kabat. В інших варіантах втілення, антитіло також включає варіабельну область важкого ланцюга (VH), де VH має, щонайменше, 95% ідентичність послідовності за довжиною VH, вибраної з послідовностей VH, що відповідають кожному з антитіл, як показано на Фіг. 15B і 16B (антитіла 6078, 6078.v2HC-Cys, 6078.v2LC-Cys, 6078.v3HC-Cys, 6078.v3LC-Cys, 6078.v4HC-Cys, 6078.v4LC-Cys, 6078.v4HCLC-Cys, 4497, 4497.v8HC-Cys, 4497.v8LC-Cys і 4497.v8HCLC-Cys) для положень 1-113 за нумерацією Kabat. У будь-яких попередніх варіантах втілення ідентичність послідовності може становити 96%, 97%, 98%, 99% або 100%.

У конкретному варіанті втілення, виділене анти-WTA бета антитіло являє собою антитіло, легкий ланцюг якого включає послідовність SEQ ID NO: 115, і Н ланцюг включає цистеїн, введений методами генної інженерії, і включає послідовність SEQ ID NO: 116. В іншому варіанті втілення, антитіло являє собою антитіло, легкий ланцюг якого включає послідовність SEQ ID NO: 115, і Н ланцюг включає цистеїн, введений методами генної інженерії, і включає послідовність SEQ ID NO: 117, де Х являє собою М, І або V. В іншому варіанті втілення L ланцюг, що включає послідовність SEQ ID NO:113, спарений з Cys-гено-інженерним варіантом Н ланцюга SEQ ID NO: 117; де у варіанті Н ланцюга Х являє собою М, І або V.

Інше виділене анти-WTA бета антитіло, передбачене даним винаходом, включає важкий ланцюг і легкий ланцюг, де важкий ланцюг включає VH, що має, щонайменше, 95% ідентичність послідовності з SEQ ID NO: 120. У додатковому варіанті втілення, це антитіло також включає VL, що має, щонайменше, 95% ідентичність послідовності з SEQ ID NO: 119. У певному варіанті втілення, анти-WTA бета антитіло включає легкий ланцюг і важкий ланцюг, де L ланцюг включає послідовність VL з SEQ ID NO: 119 і Н ланцюг включає послідовність VH з SEQ ID NO: 120. У більш конкретному варіанті втілення, виділене антитіло, що сполучається з WTA бета, включає L ланцюг SEQ ID NO: 121 і Н ланцюг SEQ ID NO: 122.

Анти-WTA бета Cys-генно-інженерні варіанти Н і L ланцюгів можуть бути спарені у будь-якій з наступних комбінацій з утворенням повнорозмірних антитіл для кон'югування з інтермедіатами лінкер-антибіотик для одержання анти-WTA AAC згідно з даним винаходом. В одному з варіантів втілення, L ланцюг включає послідовність SEQ ID NO:121, і Н ланцюг включає послідовність SEQ ID NO: 124. В іншому варіанті втілення, виділене антитіло включає L ланцюг SEQ ID NO: 123, і Н ланцюг включає послідовність SEQ ID NO:124 або SEQ ID NO:157. У конкретному варіанті втілення, анти-WTA бета антитіло, а також анти-WTA бета AAC даного винаходу включає L ланцюг SEQ ID NO: 123.

Ще один варіант втілення являє собою антитіло, що сполучається з тим же самим епітопом, що й кожне з анти-WTA альфа антитіл, наведених на Фіг.13A і Фіг.13B. Також передбачене антитіло, що сполучається з тим же самим епітопом, що й кожне з анти-WTA бета антитіл, наведених на Фіг. 14, Фіг. 15A і 15B, Фіг. 16A і 16B і Фіг. 17A і 17B.

У наступному варіанті втілення, анти-WTA бета й анти-WTA альфа антитіла даного винаходу являють собою антигенсполучні фрагменти без області Fc, переважно, F(ab')₂ або F(ab). Таким чином, даний винахід передбачає кон'югати антитіло-антибіотик, де антитіло проти WTA являє собою F(ab')₂ або F(ab).

В іншому аспекті даний винахід передбачає анти-WTA моноклональне антитіло, що сполучається з WTA бета.

У деяких варіантах втілення, виділене анти-WTA (тейхоеві кислоти клітинної стінки) моноклональне антитіло включає легкий (L) ланцюг і важкий (H) ланцюг, де:

(а) L ланцюг включає CDR L1, що включає послідовність RASQTISGWLA (SEQ ID NO:33), CDR L2, що включає послідовність KASTLES (SEQ ID NO:34), і CDR L3, що включає послідовність QQYKSYSFN (SEQ ID NO:35); і Н ланцюг включає CDR H1, що включає послідовність SYDIN (SEQ ID NO:36), CDR H2, що включає послідовність WMNANSNGNTGYAQKFQG (SEQ ID NO:37), і CDR H3, що включає послідовність SSILVRGALGRYFDL (SEQ ID NO:38);

(b) L ланцюг включає CDR L1, що включає послідовність RASQTISGWLA (SEQ ID NO:39), CDR L2, що включає послідовність KASTLES (SEQ ID NO:40), і CDR L3, що включає послідовність QQYKSYSFN (SEQ ID NO:41); і Н ланцюг включає CDR H1, що включає послідовність SYDIN (SEQ ID NO:42), CDR H2, що включає послідовність WMNANSNGNTGYAQKFQG (SEQ ID NO:43), і CDR H3, що включає послідовність SSILVRGALGRYFDL (SEQ ID NO:44);

(c) L ланцюг включає CDR L1, що включає послідовність RASQFVSRTSLA (SEQ ID NO:45), CDR L2, що включає послідовність ETSSRAT (SEQ ID NO:46), і CDR L3, що включає послідовність HKYGGSPRT (SEQ ID NO:47); і Н ланцюг включає CDR H1, що включає послідовність NYDFI (SEQ ID NO:48), CDR H2, що включає послідовність

WMNPNSYNTGYGQKFQG (SEQ ID NO:49), і CDR H3, що включає послідовність AVRQQLSEY (SEQ ID NO:50);

(d) L ланцюг включає CDR L1, що включає послідовність RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO:51), CDR L2, що включає послідовність DASSRAT (SEQ ID NO:52), і CDR L3, що включає послідовність QKYGSTPRP (SEQ ID NO:53); і H ланцюг включає CDR H1, що включає послідовність SYDIN (SEQ ID NO:54), CDR H2, що включає послідовність WMNPNSGNTNYAQRFGG (SEQ ID NO:55), і CDR H3, що включає послідовність ERWSKDTGHHYYGMDV (SEQ ID NO:56);

(e) L ланцюг включає CDR L1, що включає послідовність RASLDITNHLA (SEQ ID NO:57), CDR L2, що включає послідовність EASILQS (SEQ ID NO:58), і CDR L3, що включає послідовність EKCNSTPRT (SEQ ID NO:59); і H ланцюг включає CDR H1, що включає послідовність NYDIN (SEQ ID NO:60), CDR H2, що включає послідовність WMNPSSGRTGYAPKFRG (SEQ ID NO:61), і CDR H3, що включає послідовність GGGYYDSSGNYHISGLDV (SEQ ID NO:62);

(f) L ланцюг включає CDR L1, що включає послідовність RASQSVGAIYLA (SEQ ID NO:63), CDR L2, що включає послідовність GVSNRAT (SEQ ID NO:64), і CDR L3, що включає послідовність QLYTSSRALT (SEQ ID NO:65); і H ланцюг включає CDR H1, що включає послідовність AYAMN (SEQ ID NO:66), CDR H2, що включає послідовність SITKNSDSLYYADSVKG (SEQ ID NO:67), і CDR H3, що включає послідовність LAARIMATDY (SEQ ID NO:68);

(g) L ланцюг включає CDR L1, що включає послідовність RASQGIRNGLG (SEQ ID NO:69), CDR L2, що включає послідовність PASTLES (SEQ ID NO:70), і CDR L3, що включає послідовність LQDHNYPPT (SEQ ID NO:71); і H ланцюг включає CDR H1, що включає послідовність YYSMI (SEQ ID NO:72), CDR H2, що включає послідовність SIDSSSRYYADSVKG (SEQ ID NO:73), і CDR H3, що включає послідовність DGDDILSVYRGSGRPFYD (SEQ ID NO:74);

(h) L ланцюг включає CDR L1, що включає послідовність RASQGIRNGLG (SEQ ID NO:75), CDR L2, що включає послідовність PASTLES (SEQ ID NO:76), і CDR L3, що включає послідовність LQDHNYPPT (SEQ ID NO:77); і H ланцюг включає CDR H1, що включає послідовність YYSMI (SEQ ID NO:78), CDR H2, що включає послідовність SIDSSSRYYRTDSVKG (SEQ ID NO:79), і CDR H3, що включає послідовність DGDDILSVYQSGSGRPFYD (SEQ ID NO:80);

(i) L ланцюг включає CDR L1, що включає послідовність RASQSVRTNVA (SEQ ID NO:81), CDR L2, що включає послідовність GASTRAS (SEQ ID NO:82), і CDR L3, що включає послідовність LQYNTWPRT (SEQ ID NO:83); і H ланцюг включає CDR H1, що включає послідовність TNDMS (SEQ ID NO:84), CDR H2, що включає послідовність TIIGIDDTTHYADSVRG (SEQ ID NO:85), і CDR H3, що включає послідовність NSGIYSF (SEQ ID NO:86);

(j) L ланцюг включає CDR L1, що включає послідовність RASQDIGSSLA (SEQ ID NO:87), CDR L2, що включає послідовність ATSTLQS (SEQ ID NO:88), і CDR L3, що включає послідовність QQLNNYVHS (SEQ ID NO:89); і H ланцюг включає CDR H1, що включає послідовність DYAMG (SEQ ID NO:90), CDR H2, що включає послідовність VVTGHSYRTHYADSVKG (SEQ ID NO:91), і CDR H3, що включає послідовність RIWSYGDDSFYD (SEQ ID NO:92);

(k) L ланцюг включає CDR L1, що включає послідовність RASQSIGDRLA (SEQ ID NO:93), CDR L2, що включає послідовність WASNLEG (SEQ ID NO:94), і CDR L3, що включає послідовність QQYKSQWS (SEQ ID NO:95); і H ланцюг включає CDR H1, що включає послідовність SYAMN (SEQ ID NO:96), CDR H2, що включає послідовність YISSIETIYYADSVKG (SEQ ID NO:97), і CDR H3, що включає послідовність DRLVDVPLSSPNS (SEQ ID NO:98);

(l) L ланцюг включає CDR L1, що включає послідовність KSSQSIFRTSRNKNLLN (SEQ ID NO:99), CDR L2, що включає послідовність WASTRKS (SEQ ID NO:100), і CDR L3, що включає послідовність QQYFSPPYT (SEQ ID NO:101); і H ланцюг включає CDR H1, що включає послідовність SFWMH (SEQ ID NO:102), CDR H2, що включає послідовність FTNNEGTTTAYADSVRG (SEQ ID NO:103), і CDR H3, що включає послідовність GDGGLDD (SEQ ID NO:104);

(m) L ланцюг включає CDR L1, що включає послідовність RASQFTNHLYN (SEQ ID NO:105), CDR L2, що включає послідовність VASNLSQ (SEQ ID NO:106), і CDR L3, що включає послідовність QQSYRTPYT (SEQ ID NO:107); і H ланцюг включає CDR H1, що включає послідовність SGYYN (SEQ ID NO:108), CDR H2, що включає послідовність YILSGAHTDIKASLGS (SEQ ID NO:109), і CDR H3, що включає послідовність SGVYSKYSLDV

(SEQ ID NO:110); або

(n) L ланцюг включає CDR L1, що включає послідовність KSSQSIFRTSRNKNLLN (SEQ ID NO:99), CDR L2, що включає послідовність WASTRKS (SEQ ID NO:100), і CDR L3, що включає послідовність QQYFSPPYT (SEQ ID NO:101); і H ланцюг включає CDR H1, що включає послідовність SFWMH (SEQ ID NO:102), CDR H2, що включає послідовність FTNNEGTTTAYADSVRG (SEQ ID NO:103), і CDR H3, що включає послідовність GEGGLDD (SEQ ID NO:118).

У деяких варіантах втілення, виділене анти-WTA моноклональне антитіло включає варіабельну область важкого ланцюга (VH), де VH включає амінокислотну послідовність, що має, щонайменше, 95% ідентичність послідовності за довжиною послідовності VH з SEQ ID NO:112, де амінокислота Хаа у положенні 1 в SEQ ID NO:112 являє собою Q або E, і амінокислота Хаа у положенні 2 в SEQ ID NO:112 являє собою M, I або V. У деяких варіантах втілення, антитіло також включає варіабельну область легкого ланцюга (VL), де VL включає амінокислотну послідовність, що має, щонайменше, 95% ідентичність послідовності за довжиною послідовності VL з SEQ ID NO:111. У деяких варіантах втілення, виділене анти-WTA моноклональне антитіло включає варіабельну область легкого ланцюга (VL), де VL включає амінокислотну послідовність, що має, щонайменше, 95% ідентичність послідовності за довжиною послідовності VL з SEQ ID NO:111. У будь-яких попередніх варіантах втілення ідентичність послідовності може становити 96%, 97%, 98%, 99% або 100%. У деяких варіантах втілення, VH антитіла включає послідовність SEQ ID NO: 112, і VL антитіла включає послідовність SEQ ID NO:111.

У деяких варіантах втілення, виділене анти-WTA моноклональне антитіло включає варіабельну область важкого ланцюга (VH), де VH включає амінокислотну послідовність, що має, щонайменше, 95% ідентичність послідовності за довжиною послідовності VH з SEQ ID NO:120 або SEQ ID NO:156. У деяких варіантах втілення, антитіло також включає варіабельну область легкого ланцюга (VL), де VL включає амінокислотну послідовність, що має, щонайменше, 95% ідентичність послідовності за довжиною послідовності VL з SEQ ID NO:119. У деяких варіантах втілення, виділене анти-WTA моноклональне антитіло включає варіабельну область легкого ланцюга (VL), де VL включає амінокислотну послідовність, що має, щонайменше, 95% ідентичність послідовності за довжиною послідовності VL з SEQ ID NO:119. У будь-яких попередніх варіантах втілення ідентичність послідовності може становити 96%, 97%, 98%, 99% або 100%. У деяких варіантах втілення, виділене анти-WTA моноклональне антитіло включає варіабельну область легкого ланцюга (VL) і варіабельну область важкого ланцюга (VH), де VL включає послідовність SEQ ID NO:119, і VH включає послідовність SEQ ID NO:120 або SEQ ID NO:156.

У деяких варіантах втілення, виділене анти-WTA моноклональне антитіло включає варіабельну область легкого ланцюга (VL), де VL включає послідовність, що має, щонайменше, 95% ідентичність послідовності за довжиною послідовності VL, вибраної з послідовності VL з SEQ ID NO:158, SEQ ID NO:159, SEQ ID NO:160, SEQ ID NO:161, SEQ ID NO:162, SEQ ID NO:163, SEQ ID NO:164, SEQ ID NO:165, SEQ ID NO:166, SEQ ID NO:167 й SEQ ID NO:168. У деяких варіантах втілення, виділене анти-WTA моноклональне антитіло включає варіабельну область важкого ланцюга (VH), яка включає амінокислотну послідовність, що має, щонайменше, 95% ідентичність послідовності за довжиною послідовності VH, вибраної з послідовності VH з SEQ ID NO:127, SEQ ID NO:133, SEQ ID NO:134, SEQ ID NO:169, SEQ ID NO:170, SEQ ID NO:171, SEQ ID NO:172, SEQ ID NO:173, SEQ ID NO:174, SEQ ID NO:175 і SEQ ID NO:176. У будь-яких попередніх варіантах втілення ідентичність послідовності може становити 96%, 97%, 98%, 99% або 100%. У деяких варіантах втілення, виділене анти-WTA моноклональне антитіло включає варіабельну область легкого ланцюга (VL) і варіабельну область важкого ланцюга (VH), де:

(a) VL антитіла включає амінокислотну послідовність, що має, щонайменше, 95% ідентичність послідовності за довжиною послідовності VL з SEQ ID NO:158, і VH антитіла включає амінокислотну послідовність, що має, щонайменше, 95% ідентичність послідовності за довжиною послідовності VH з SEQ ID NO:169;

(b) VL антитіла включає амінокислотну послідовність, що має, щонайменше, 95% ідентичність послідовності за довжиною послідовності VL з SEQ ID NO:159, і VH антитіла включає амінокислотну послідовність, що має, щонайменше, 95% ідентичність послідовності за довжиною послідовності VH з SEQ ID NO:170;

(c) VL антитіла включає амінокислотну послідовність, що має, щонайменше, 95% ідентичність послідовності за довжиною послідовності VL з SEQ ID NO:160, і VH антитіла включає амінокислотну послідовність, що має, щонайменше, 95% ідентичність послідовності за

SEQ ID NO:138.

У деяких варіантах втілення антитіл, описаних вище, антитіло являє собою антигенсполучний фрагмент без області Fc. У деяких варіантах втілення, антитіло являє собою F(ab) або F(ab')₂. У деяких варіантах втілення, антитіло також включає константну область важкого ланцюга і/або константну область легкого ланцюга, де константна область важкого ланцюга і/або константна область легкого ланцюга включають одну або декілька амінокислот, заміщених на залишки цистеїну. У деяких варіантах втілення, константна область важкого ланцюга включає амінокислотну заміну A118C або S400C, і/або константна область легкого ланцюга включає амінокислотну заміну V205C, де нумерація наведена відповідно до нумерації EU. У деяких варіантах втілення, константна область важкого ланцюга включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:149, і/або константна область легкого ланцюга включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:151. У деяких варіантах втілення, константна область важкого ланцюга включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:149, і константна область легкого ланцюга включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:150. У деяких варіантах втілення, константна область важкого ланцюга включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:148, і константна область легкого ланцюга включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO:151.

У деяких варіантах втілення, виділене анти-WTA моноклональне антитіло включає легкий ланцюг і важкий ланцюг, де важкий ланцюг антитіла включає послідовність SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:116 або SEQ ID NO:117, і легкий ланцюг антитіла включає послідовність SEQ ID NO:113; де амінокислота Хаа у положенні 2 в SEQ ID NO:116 або SEQ ID NO:117 являє собою M, I або V. У деяких варіантах втілення, виділене анти-WTA моноклональне антитіло включає легкий ланцюг і важкий ланцюг, де важкий ланцюг антитіла включає послідовність SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:116 або SEQ ID NO:117, і легкий ланцюг антитіла включає послідовність SEQ ID NO:115; де амінокислота Хаа у положенні 2 в SEQ ID NO:116 або SEQ ID NO:117 являє собою M, I або V. У деяких варіантах втілення, виділене анти-WTA моноклональне антитіло включає легкий ланцюг і важкий ланцюг, де важкий ланцюг антитіла включає послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:140, SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:143 й SEQ ID NO:144; і легкий ланцюг антитіла включає послідовність SEQ ID NO:113. У деяких варіантах втілення, виділене анти-WTA моноклональне антитіло включає легкий ланцюг і важкий ланцюг, де важкий ланцюг антитіла включає послідовність, вибрану з групи, що складається з SEQ ID NO:139, SEQ ID NO:140, SEQ ID NO:141, SEQ ID NO:142, SEQ ID NO:143 і SEQ ID NO:144; і легкий ланцюг антитіла включає послідовність SEQ ID NO:115.

У деяких варіантах втілення, виділене анти-WTA моноклональне антитіло включає легкий ланцюг і важкий ланцюг, де важкий ланцюг антитіла включає послідовність SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:147, SEQ ID NO:157 або SEQ ID NO:124, і легкий ланцюг антитіла включає послідовність SEQ ID NO:121. У деяких варіантах втілення, виділене анти-WTA моноклональне антитіло включає важкий ланцюг і легкий ланцюг, де важкий ланцюг включає послідовність SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:147, SEQ ID NO:157 або SEQ ID NO:124, і легкий ланцюг включає послідовність SEQ ID NO:123. У деяких варіантах втілення, виділене анти-WTA моноклональне антитіло включає важкий ланцюг і легкий ланцюг, де важкий ланцюг включає послідовність SEQ ID NO:146, SEQ ID NO:147, SEQ ID NO:157 або SEQ ID NO:124, і легкий ланцюг включає послідовність SEQ ID NO:145.

У деяких варіантах втілення будь-якого з антитіл, описаних вище, антитіло не відноситься до IgM ізотипу. У деяких варіантах втілення будь-якого з антитіл, описаних вище, антитіло відноситься до ізотипу IgG (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgE, IgD або IgA (наприклад, IgA1 або IgA2). У деяких варіантах втілення будь-якого з антитіл, описаних вище, антитіло продукується клітиною-хазяїном у культурі клітин. У деяких варіантах втілення, клітиною-хазяїном є не людська клітина. У деяких варіантах втілення, клітина-хазяїн є прокаріотичною або еукаріотичною. У деяких варіантах втілення, клітина-хазяїн є клітиною ссавців (наприклад, людською або не людською клітиною ссавців). У деяких варіантах втілення, клітина-хазяїн являє собою клітину CHO.

В іншому аспекті, даний винахід передбачає фармацевтичну композицію, що включає будь-які антитіла, розкриті в даному документі, і фармацевтично прийнятний носій.

У ще одному аспекті, даний винахід також передбачає виділену нуклеїнову кислоту, що кодує будь-які антитіла, розкриті в даному документі. У ще одному аспекті, даний винахід передбачає вектор, що включає нуклеїнову кислоту, що кодує будь-які антитіла, розкриті в даному документі. В іншому аспекті вектор являє собою експресуючий вектор.

Даний винахід також передбачає клітину-хазяїна, яка включає нуклеїнову кислоту, що кодує будь-які антитіла, розкриті в даному документі. В іншому варіанті втілення клітина-хазяїн є прокаріотичною або еукаріотичною. У деяких варіантах втілення, клітина-хазяїн є клітиною

ссавців (наприклад, людською або не людською клітиною ссавців). У деяких варіантах втілення, клітина-хазяїн являє собою клітину CHO.

Даний винахід також передбачає спосіб одержання антитіла, який включає культивування клітини-хазяїна, що включає нуклеїнову кислоту, яка кодує будь-які антитіла, розкриті в даному документі, в умовах, що підходять для експресії нуклеїнової кислоти; і виділення антитіла, що продукується цією клітиною. У деяких варіантах втілення, спосіб також включає очищення антитіла.

Інший аспект даного винаходу являє собою сполуку кон'югат антитіло-антибіотик (AAC), що включає антитіло проти тейхоєвих кислот клітинної стінки (WTA) згідно з даним винаходом, ковалентно приєднану за допомогою пептидного лінкера до антибіотика типу рифаміцину. У деяких варіантах втілення кон'югатів антитіло-антибіотик, розкритих у даному винаході, антитіло проти тейхоєвих кислот клітинної стінки (WTA) сполучається з *Staphylococcus aureus*. У деяких варіантах втілення, антитіло проти тейхоєвих кислот клітинної стінки сполучається з метицилін-резистентним *Staphylococcus aureus* (MRSA).

У деяких варіантах втілення кон'югатів антитіло-антибіотик, розкритих у даному документі, антитіло включає: i) CDR L ланцюга і Н ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO 99-104, або CDR L ланцюга і Н ланцюга, що мають послідовності SEQ ID NO: 33-38; або ii) VL, що має послідовність SEQ ID NO:119 або SEQ ID NO: 123, спарену з VH, що має послідовність SEQ ID NO:120 або SEQ ID NO: 156; або iii) VL, що має послідовність SEQ ID NO:111, спарену з VH, що має послідовність SEQ ID NO:112.

У деяких варіантах втілення, антибіотик типу рифаміцину являє собою антибіотик типу рифалазилу. У деяких варіантах втілення, антибіотик типу рифаміцину включає четвертинний амін, приєднаний до пептидного лінкера. У деяких варіантах втілення, антибіотик приєднаний до антитіла через пептидний лінкер, що приєднаний до цистеїну, введеному методами генної інженерії в анти-WTA антитіло. Цистеїн може бути введений методами генної інженерії в L або Н ланцюги модифікованого антитіла. У деяких варіантах втілення, залишок цистеїну перебуває в L ланцюгу. У деяких варіантах втілення, залишок цистеїну перебуває в Н ланцюгу.

Сполуки кон'югати антитіло-антибіотик даного винаходу можуть включати пептидний лінкер, що являє собою лінкер, який розщеплюється цистеїновою протеазою *S. aureus*; такі лінкери включають лінкер, який розщеплюється стафопайном В або стафопайном А. В одному з варіантів втілення, протеаза *S. aureus* являє собою ендопептидазу. В іншому варіанті втілення, лінкер являє собою лінкер, який розщеплюється протеазою хазяїна, переважно, лінкер, який розщеплюється людською протеазою катепсином В (наприклад, дипептидний лінкер val-cit).

Сполука кон'югату антитіло-антибіотик, наведена як приклад, має формулу:

Ab-(L-abx)_p,

де:

Ab являє собою антитіло проти тейхоєвих кислот клітинної стінки;

L являє собою пептидний лінкер, що має формулу:

-Str-Pep-Y-,

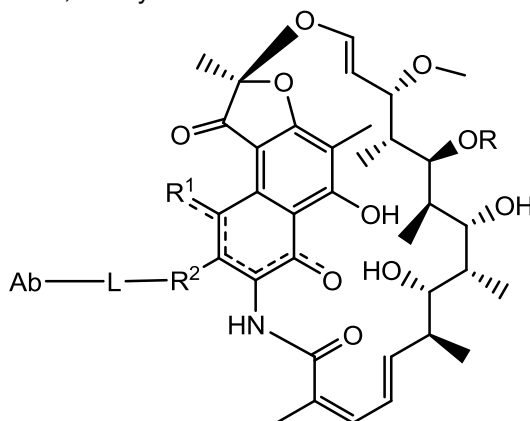
де Str являє собою сполучну частину; Pep являє собою пептид, що складається з двох-дванадцяти амінокислотних залишків, і Y являє собою спейсер;

abx являє собою антибіотик типу рифаміцину; і

p являє собою ціле число від 1 до 8.

В одному з варіантів втілення, будь-які із зазначених вище сполук кон'югатів антитіло-антибіотик мають співвідношення антибіотик/антитіло (AAR), рівне 2 або 4.

У деяких варіантах втілення, сполука кон'югат антитіло-антибіотик має формулу I:



де:

пунктирні лінії означають необов'язковий зв'язок;

R являє собою H, C₁-C₁₂ алкіл або C(O)CH₃;

R¹ являє собою OH;

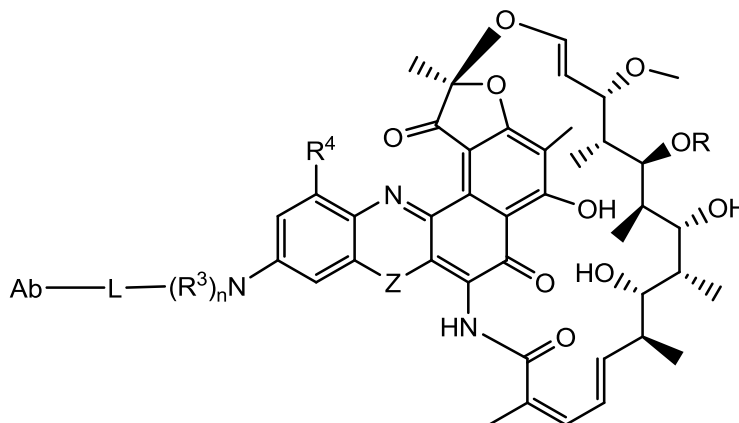
5 R² являє собою CH=N-(гетероцикл), де гетероцикл необов'язково заміщений однією або декількома групами, незалежно вибраними з C(O)CH₃, C₁-C₁₂ алкілу, C₁-C₁₂ гетероарилу, C₂-C₂₀ гетероциклілу, C₆-C₂₀ арилу та C₃-C₁₂ карбоциклілу;

або R¹ і R² утворюють п'яти- або шестичленний конденсований гетероарил або гетероцикл, і необов'язково утворюють спірозчленоване або конденсоване шестичленне гетероарильне, гетероциклільне, арильне або карбоциклільне кільце, де спірозчленоване або
10 конденсоване шестичленне гетероарильне, гетероциклільне, арильне або карбоциклільне кільце необов'язково заміщене H, F, Cl, Br, I, C₁-C₁₂ алкілом або OH;

L являє собою пептидний лінкер, приєднаний до R² або до конденсованого гетероарилу або гетероциклілу, утвореному R¹ і R²; і

Ab являє собою антитіло проти тейхоєвих кислот клітинної стінки (WTA).

15 У деяких із цих варіантів втілення, сполука кон'югат антитіло-антибіотик, що має формулу I, відповідає формулі:



де

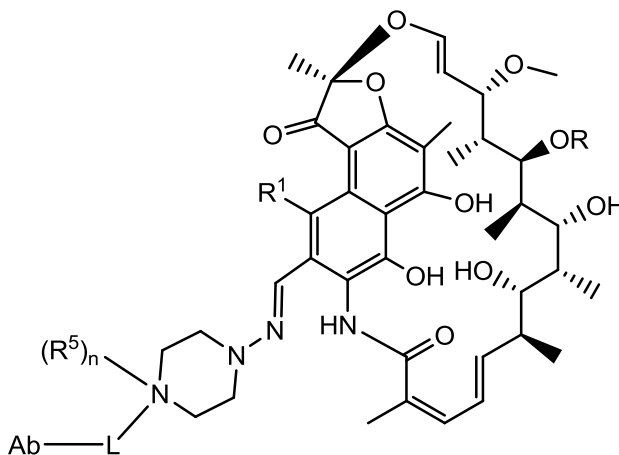
R³ незалежно вибраний з H і C₁-C₁₂ алкілу;

20 n являє собою 1 або 2;

R⁴ вибраний з H, F, Cl, Br, I, C₁-C₁₂ алкілу та OH; і

Z вибраний з NH, N(C₁-C₁₂ алкілу), O і S.

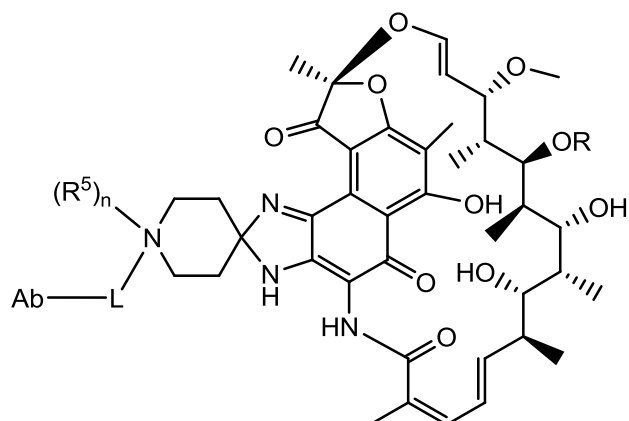
У деяких із цих варіантів втілення, сполука кон'югат антитіло-антибіотик, що має формулу I, відповідає формулі:



25

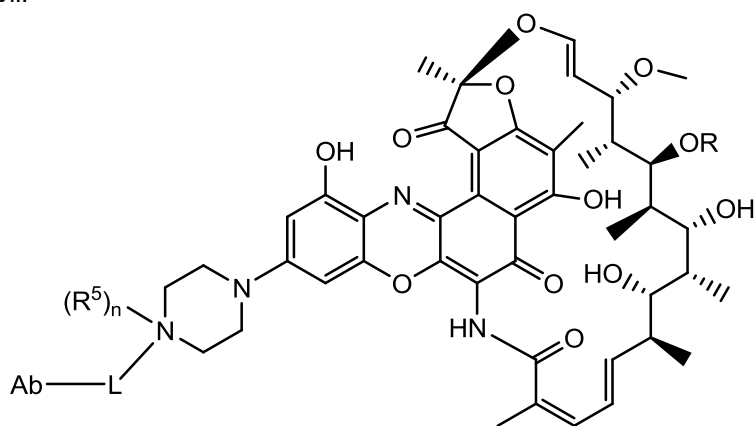
де R⁵ вибраний з H і C₁-C₁₂ алкілу; і n являє собою 0 або 1.

У деяких із цих варіантів втілення, сполука кон'югат антитіло-антибіотик, що має формулу I, відповідає формулі:



де R^5 вибраний з H і C_1 - C_{12} алкілу; i n являє собою 0 або 1.

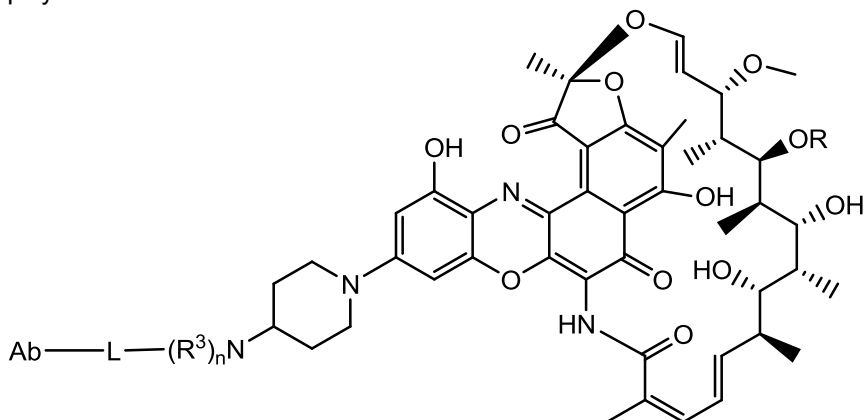
У деяких із цих варіантів втілення, сполука кон'югат антитіло-антибіотик, що має формулу I, відповідає формулі:



5

де R^5 незалежно вибраний з H і C_1 - C_{12} алкілу; i n являє собою 0 або 1.

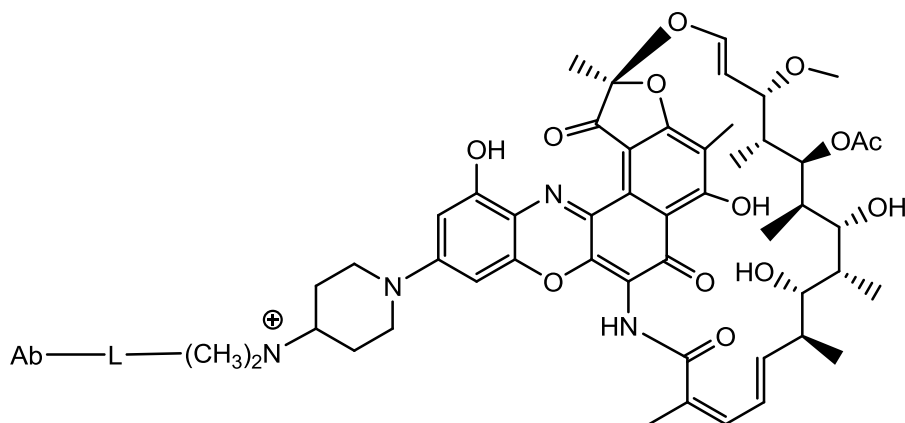
У деяких із цих варіантів втілення, сполука кон'югат антитіло-антибіотик, що має формулу I, відповідає формулі:



10

де R^3 незалежно вибраний з H і C_1 - C_{12} алкілу; i n являє собою 1 або 2.

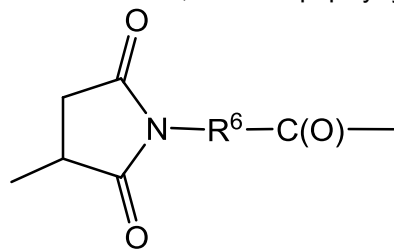
У деяких із цих варіантів втілення, сполука кон'югат антитіло-антибіотик, що має формулу I, відповідає формулі:



У деяких варіантах втілення, передбачена сполука кон'югат антитіло-антибіотик (AAC), що включає антитіло проти тейхоєвих кислот клітинної стінки (WTA) даного винаходу, ковалентно приєднане за допомогою пептидного лінкера до антибіотика типу рифаміцину, де пептидний лінкер має формулу:

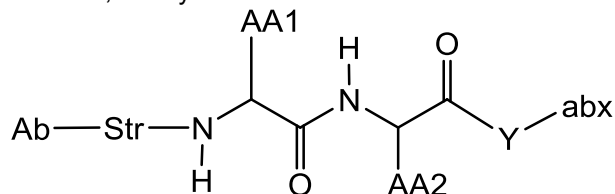
-Str-Pep-Y-,

де Str являє собою сполучну частину, ковалентно приєднану до антитіла проти тейхоєвих кислот клітинної стінки (WTA); Pep являє собою пептид, що складається з двох-дванадцяти амінокислотних залишків, і Y являє собою спейсер, ковалентно приєднаний до антибіотика типу рифаміцину. У деяких із цих варіантів втілення, Str має формулу:

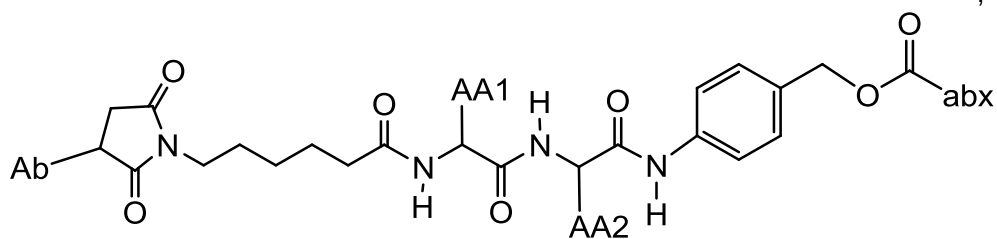
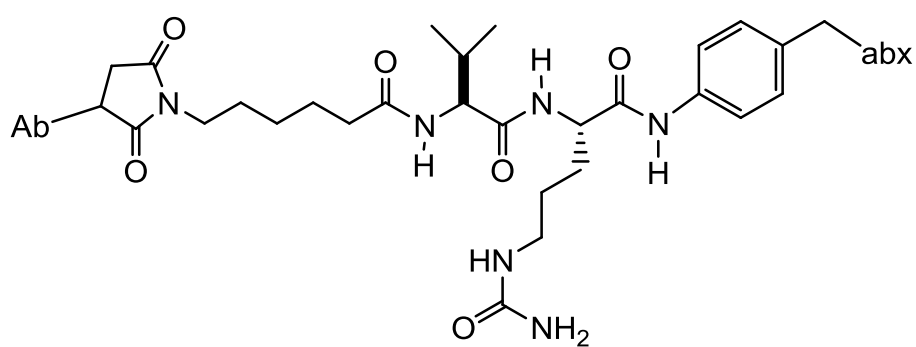
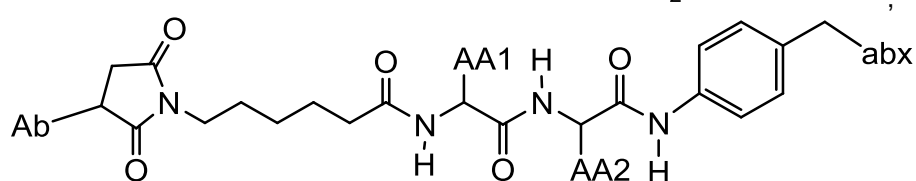
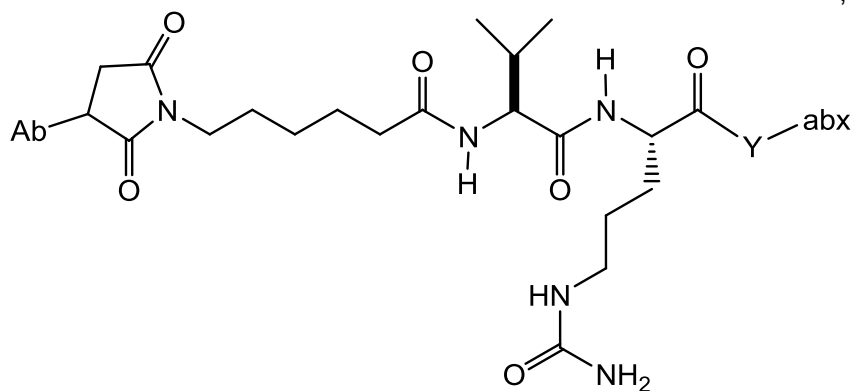
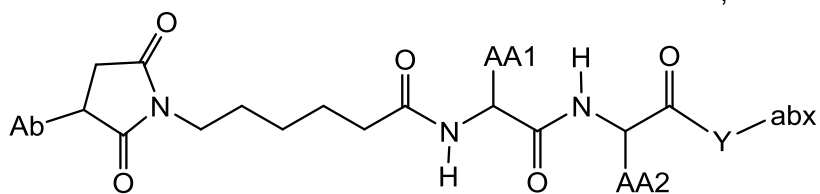
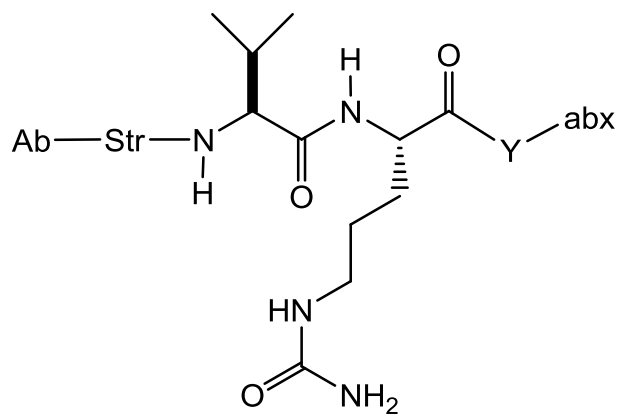


де R⁶ вибраний з групи, що складається з C₁-C₁₀ алкілену-, -C₃-C₈ карбоцикло-, -O-(C₁-C₈ алкілу)-, -арилу-, -C₁-C₁₀ алкілен-арилу-, -арилу-C₁-C₁₀ алкілену-, -C₁-C₁₀ алкілен-(C₃-C₈ карбоцикло)-, -(C₃-C₈ карбоцикло)-C₁-C₁₀ алкілену-, -C₃-C₈ гетероцикло-, -C₁-C₁₀ алкілен-(C₃-C₈ гетероцикло)-, -(C₃-C₈ гетероцикло)-C₁-C₁₀ алкілену-, -(CH₂CH₂O)_r- і -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-; і r являє собою ціле число в діапазоні від 1 до 10. В одному з варіантів, R⁶ являє собою -(CH₂)₅-. У деяких із цих варіантів втілення, Pep включає від двох до дванадцяти амінокислотних залишків, незалежно вибраних із гліцину, аланіну, фенілаланіну, лізину, аргініну, валіну і цитруліну. В одному з варіантів, Pep вибраний з валін-цитруліну (val-cit, vc); фенілаланін-лізину (fk); GGAFAAGGG (SEQ ID NO: 126); tpm-cit; GPImeLFF (SEQ ID NO: 129); валін-цитрулін-фенілаланіну (val-cit-phe); GGAFA (SEQ ID NO: 131) і LAFG (SEQ ID NO: 128). У деяких із цих варіантів втілення, Y включає пара-амінобензил або пара-амінобензилоксикарбоніл.

У деяких варіантах втілення, сполука кон'югат антитіло-антибіотик має формулу:

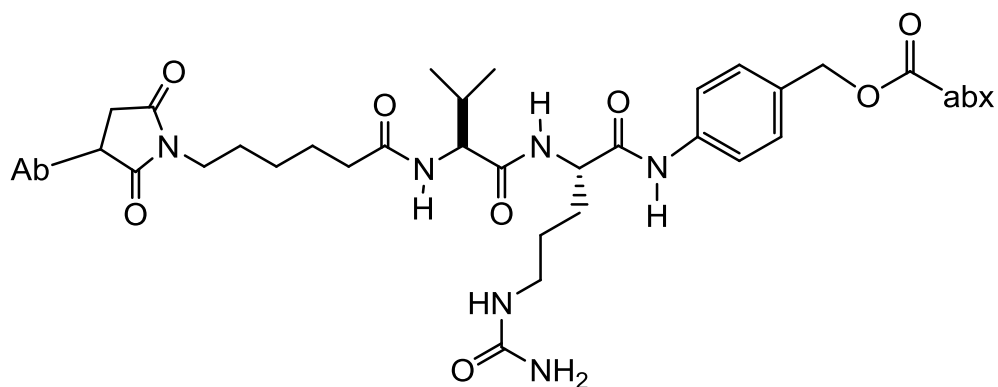


де Ab, Str, Y і abx такі, як визначено в даному документі, та AA1 і AA2 незалежно вибрані з бічних ланцюгів амінокислот. У деяких таких варіантах втілення, бічний ланцюг амінокислоти незалежно вибраний з H, -CH₃, -CH₂(C₆H₅), -CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂, -CHCH(CH₃)CH₃ і -CH₂CH₂CH₂NHC(O)NH₂. У деяких таких варіантах втілення, сполука кон'югат антитіло-антибіотик має формулу:

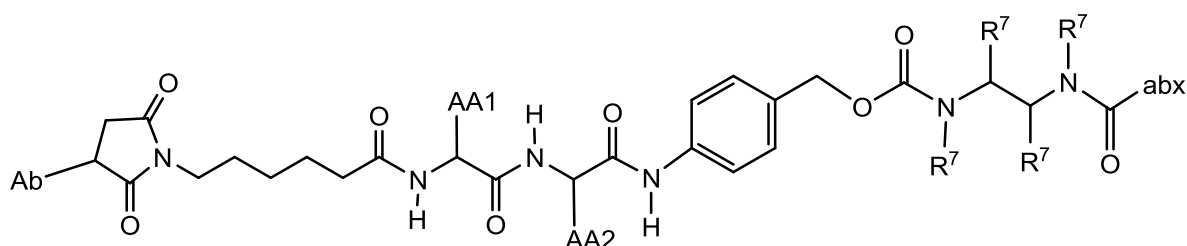


5

a6o

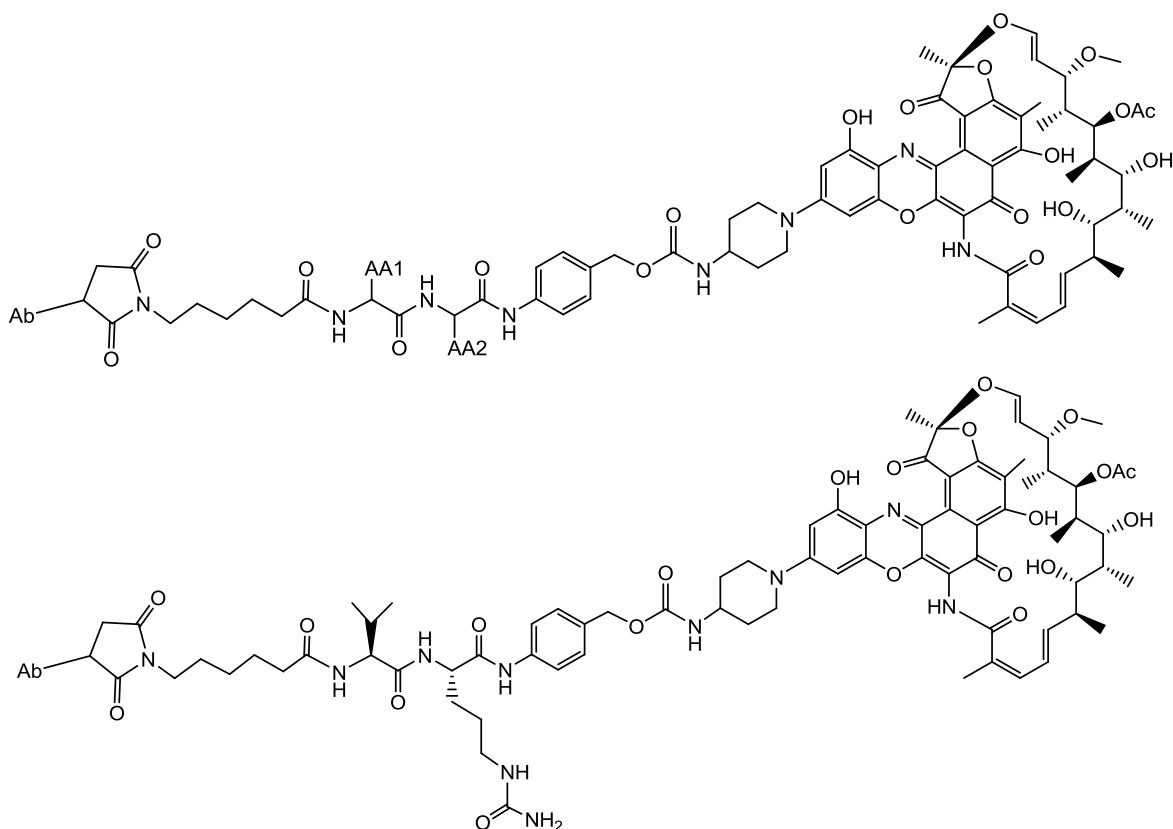


У деяких таких варіантах втілення, сполука кон'югат антитіло-антибіотик має формулу:

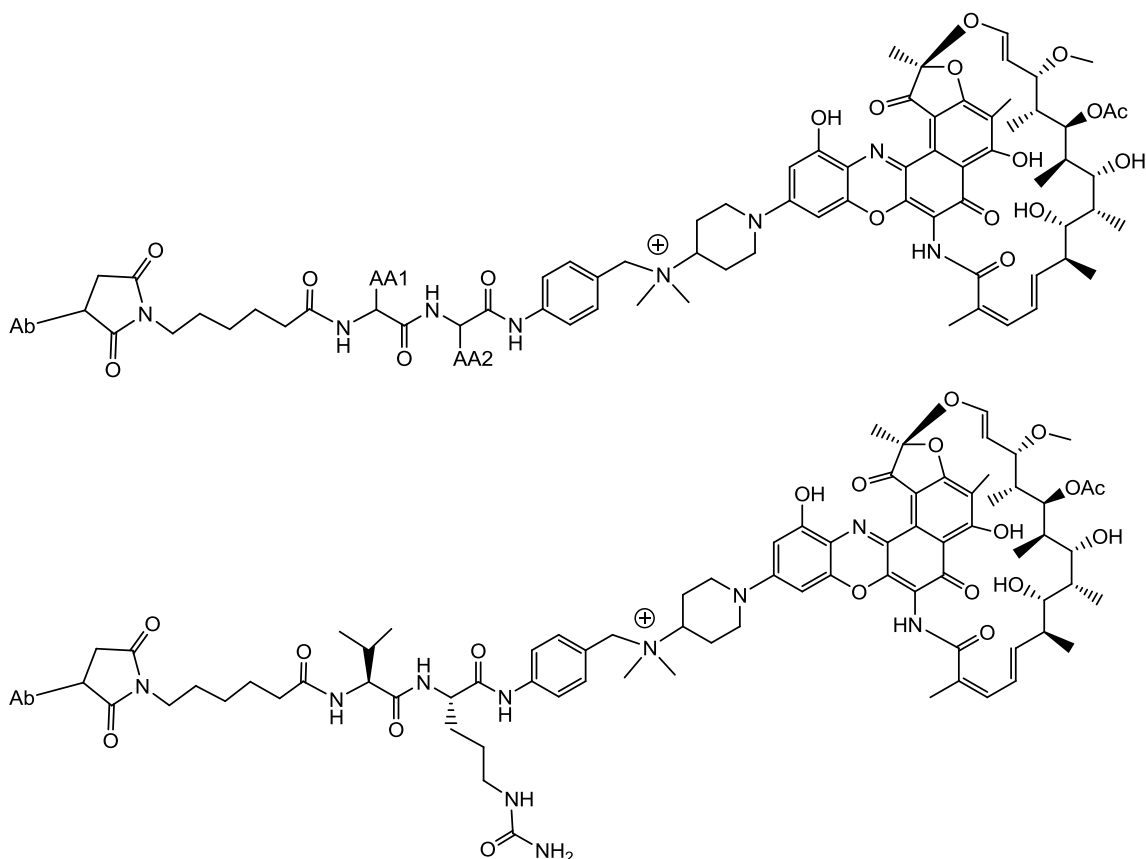


5

де R^7 незалежно вибраний з H і C_1 - C_{12} алкілу. У деяких таких варіантах втілення, сполука кон'югат антитіло-антибіотик має формулу:



10



Інший аспект даного винаходу являє собою фармацевтичну композицію, що включає

сполуку кон'югат антитіло-антибіотик даного винаходу.

Інший аспект даного винаходу являє собою спосіб лікування бактеріальної інфекції шляхом введення пацієнту терапевтично ефективної кількості сполуки кон'югату антитіло-антибіотик відповідно до будь-якого з наведених вище варіантів втілення. В одному з варіантів втілення, пацієнтом є людина. В одному з варіантів втілення, бактеріальна інфекція являє собою

інфекцію *Staphylococcus aureus*. У деяких варіантах втілення, у пацієнта діагностують інфекцію *S. aureus*. У деяких варіантах втілення, лікування бактеріальної інфекції включає зниження бактеріального навантаження.

Даний винахід також передбачає спосіб знищення внутрішньоклітинного *S. aureus* у клітинах-хазяїнах пацієнта, інфікованого *S. aureus*, без знищення клітин-хазяїнів, шляхом введення сполуки кон'югату анти-WTA-антибіотик відповідно до будь-якого з наведених вище

варіантів втілення. Також передбачений спосіб знищення персистуючих бактеріальних клітин (наприклад, *Staph A*) *in vivo* шляхом приведення персистуючої бактерії в контакт із AAC відповідно до будь-яких попередніх варіантів втілення.

В іншому варіанті втілення, спосіб лікування також включає введення другого терапевтичного агента. В іншому варіанті втілення другий терапевтичний агент являє собою антибіотик, у тому числі антибіотик проти *S. aureus* загалом, або MRSA, зокрема.

В одному з варіантів втілення, другий антибіотик, що вводять у комбінації з сполукою кон'югатом антитіло-антибіотик даного винаходу, вибраний з антибіотиків наступних структурних класів: (i) аміноглікозиди; (ii) бета-лактами; (iii) макроліди/циклічні пептиди; (iv) тетрацикліни; (v) фторхіноліни/ фторхінолони; (vi) оксазолідинони.

В одному з варіантів втілення, другий антибіотик, що вводять у комбінації з сполукою кон'югатом антитіло-антибіотик даного винаходу, вибраний з кліндаміцину, новобіоцину, ретапамуліну, даптоміцину, GSK-2140944, CG-400549, ситафлоксацину, тейкопланіну, триклозану, нафтиридону, радезоліду, доксорубіцину, ампіциліну, ванкомицину, іміпенему, дорипенему, гемцитабіну, далбаванцину й азитроміцину.

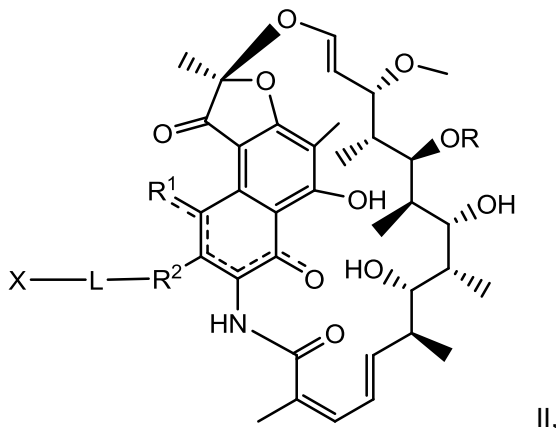
У деяких варіантах втілення, у даному документі бактеріальне навантаження в суб'єкта було знижене до рівня, що не виявляється, після лікування. В одному з варіантів втілення, посів крові пацієнта є негативним після лікування у порівнянні з позитивним посівом крові до лікування. У деяких варіантах втілення, у даному документі стійкість до бактерій у суб'єкта є невиявленою

або низькою. У деяких варіантах втілення, у даному документі суб'єкт не відповідає на лікування метициліном або ванкомицином.

Інший аспект даного винаходу являє собою спосіб одержання антитіла або сполуки кон'югату антитіло-антибіотик даного винаходу, який включає кон'югування антибіотика типу рифаміцину з антитілом проти тейхоєвих кислот клітинної стінки (WTA).

Інший аспект даного винаходу являє собою набір для лікування бактеріальної інфекції, який включає фармацевтичну композицію даного винаходу та інструкції із застосування.

Інший аспект даного винаходу являє собою інтермедіат лінкер-антибіотик, що має формулу II:



де:

пунктирні лінії означають необов'язковий зв'язок;

R являє собою H, C₁-C₁₂ алкіл або C(O)CH₃;

R¹ являє собою OH;

R² являє собою CH=N-(гетероцикл), де гетероцикл необов'язково заміщений однією або декількома групами, незалежно вибраними з C(O)CH₃, C₁-C₁₂ алкілу, C₁-C₁₂ гетероарилу, C₂-C₂₀ гетероциклілу, C₆-C₂₀ арилу і C₃-C₁₂ карбоциклілу;

або R¹ і R² утворюють п'яти- або шестичленний конденсований гетероарил або гетероциклілу, і необов'язково утворюють спірозчленоване або конденсоване шестичленне гетероарильне, гетероциклільне, арильне або карбоциклільне кільце, де спірозчленоване або конденсоване шестичленне гетероарильне, гетероциклільне, арильне або карбоциклільне кільце необов'язково заміщене H, F, Cl, Br, I, C₁-C₁₂ алкілом або OH;

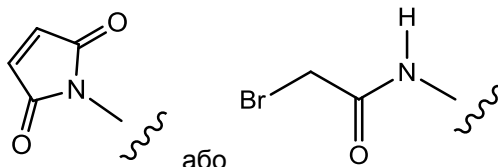
L являє собою пептидний лінкер, приєднаний до R² або конденсованого гетероарилу або гетероциклілу, утвореному R¹ і R²; та має формулу:

-Str-Pep-Y-,

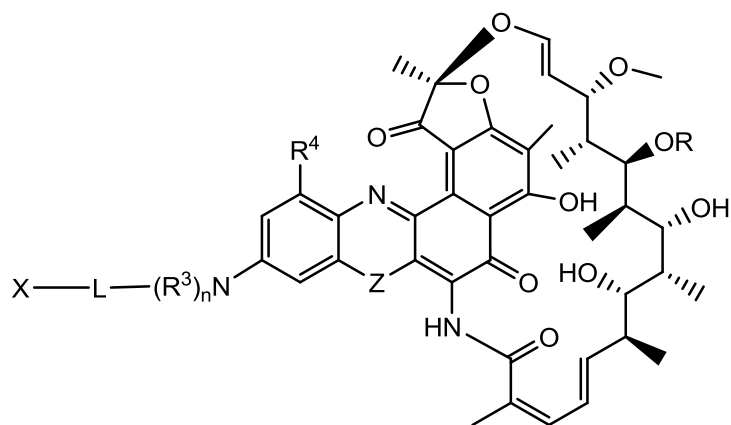
де Str являє собою сполучну частину; Pep являє собою пептид, що складається з двох-дванадцяти амінокислотних залишків, і Y являє собою спейсер; і

X являє собою реакційноздатну функціональну групу, вибрану з малеїміду, тіолу, аміно, броміду, бромацетамідо, йодацетамідо, п- толуолсульфонату, йодиду, гідроксилу, карбоксилу, піридил дисульфіді і N- гідроксисукциніміду.

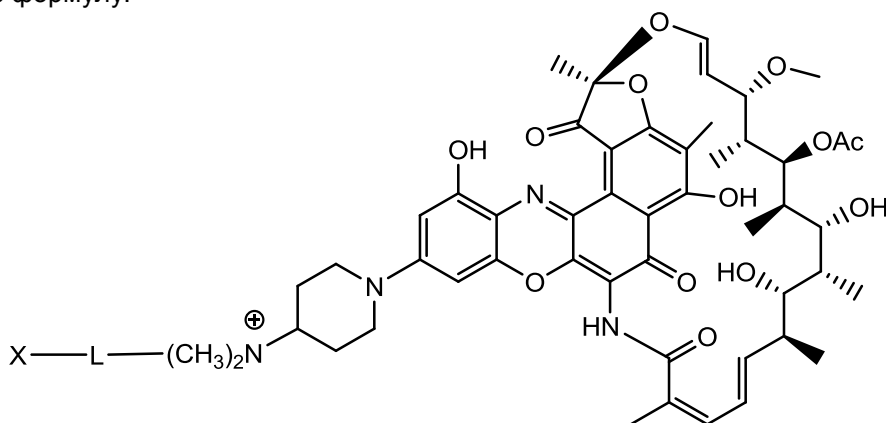
У деяких варіантах втілення інтермедіату лінкер-антибіотик, що має формулу II, X являє собою



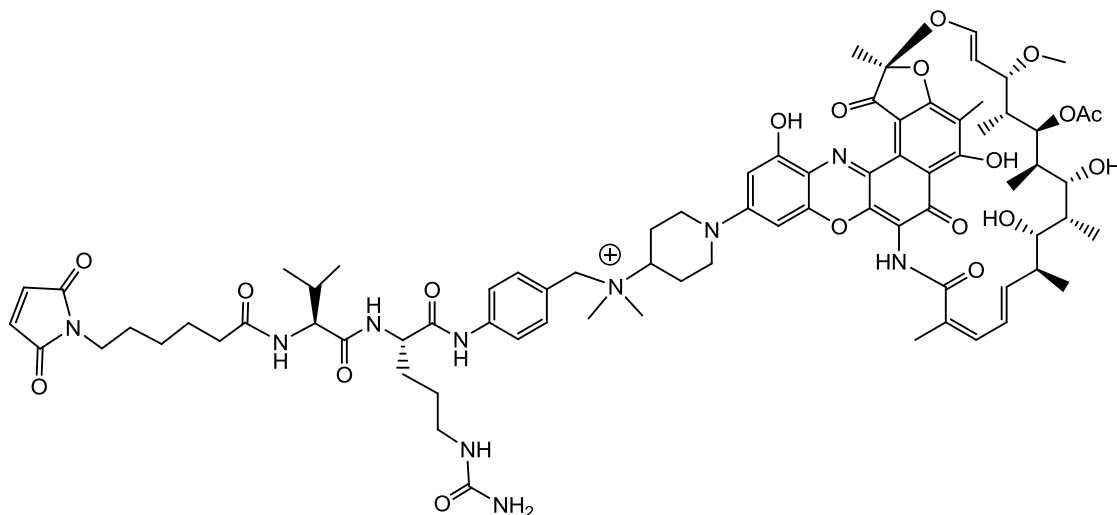
У деяких варіантах втілення, інтермедіат лінкер-антибіотик, що відповідає формулі II, має формулу:



- де
 R^3 незалежно вибраний з H і C_1 - C_{12} алкілу;
 n являє собою 1 або 2;
 R^4 вибраний з H, F, Cl, Br, I, C_1 - C_{12} алкілу та OH; і
 Z вибраний з NH, N(C_1 - C_{12} алкілу), O і S.
 У деяких із цих варіантів втілення, інтермедіат лінкер-антибіотик, що відповідає формулі II, має формулу:



або



Також передбачений спосіб знищення внутрішньоклітинного *S. aureus* у клітинах-хазяїнах пацієнта, інфікованого *S. aureus*, без знищення клітин-хазяїнів, що включає введення кон'югату анти-WTA-антибіотик, докладно описаного в даному документі.

Варто розуміти, що одна, декілька або всі особливості різних варіантів втілення, описаних у даному документі, можуть бути об'єднані, щоб сформувати інші варіанти втілення даного винаходу. Ці та інші аспекти даного винаходу будуть очевидні фахівцям у даній області техніки.

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

На Фіг. 1 показано, що вплив ванкоміцину або рифампіцину вбиває MRSA залежно від концентрації. Ванкоміцин тестували в концентрації 2 мкг/мл (білі квадрати) і 20 мкг/мл (чорні квадрати). Рифампіцин тестували в концентрації 0,02 мкг/мл (білі трикутники) і 0,2 мкг/мл (чорні трикутники).

5 На Фіг. 2 показано, що інфекція від інфікованих перитонеальних клітин могла передаватись остеобластам у присутності ванкоміцину.

На Фіг. 3 показана клітинна стінка грампозитивних бактерій, таких як *S. aureus*, і схематичне зображення шарів тейхоєвих кислот клітинної стінки (WTA), ліпотейхоєвих кислот (LTA) і пептидогліканів (PGN), які стабілізують клітинну мембрану та забезпечують сайти прикріплення.

10 На Фіг. 4 наведена хімічна структура та глікозильні модифікації тейхоєвих кислот клітинної стінки (WTA), докладно описані у Визначеннях.

На Фіг. 5 показані можливі механізми активації лікарського засобу для кон'югатів антитіло-антибіотик (AAC). Активний антибіотик (Abx) вивільняється після інтерналізації AAC у клітини ссавців.

15 На Фіг. 6A і 6B підсумовані характеристики Ab, які при первинному скринінгу бібліотеки mAb демонструють сполучення (за даними ELISA) з препаратами клітинних стінок штамів *S. aureus* USA300 або Wood46, як описано у Прикладі 21. Серед Ab, які сполучаються з WTA, 4 специфічні до WTA альфа, і 13 специфічно сполучаються з WTA бета.

20 На Фіг. 7A показаний аналіз із макрофагами *in vitro*, що демонструє, що AAC знищує внутрішньоклітинні MRSA.

На Фіг. 7B показано, що в макрофагах, остеобластах (MG63), клітинах дихального епітелію (A549) і людських ендотеліальних клітинах пупкової вени (HUVEC) відбувається внутрішньоклітинне знищення MRSA (штам USA300) під дією тіо-S4497-HC-A118C-pirBOR 102 у концентрації 50 мкг/мл у порівнянні з голим, некон'югованим анти-WTA антитілом S4497. Пунктирна лінія означає межу виявлення для цього аналізу.

25 На Фіг. 7C наведене порівняння AAC, отриманих із використанням інтермедіатів лінкер-антибіотик LA-51 і LA-54 (Таблиця 2). Проводили опсонізацію MRSA антитілом S4497 як таким або AAC (AAC-102 або AAC-105 (Таблиця 3)) у різних концентраціях у діапазоні від 10 мкг/мл до 0,003 мкг/мл.

30 На Фіг. 7D показано, що AAC знищує внутрішньоклітинні бактерії без ушкодження макрофагів.

На Фіг. 7E показане виділення живих USA300 з лізату клітин макрофагів. З макрофагів, інфікованих опсонізованими S-4497-AAC бактеріями було виділено менше (в 10000 разів менше) живих *S. aureus* у порівнянні з обробкою голим антитілом у контролі.

35 На Фіг. 8A показана ефективність тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-pirBOR 102 AAC *in vivo* у моделі внутрішньочеревинної інфекції на мишах A/J. Мишей інфікували MRSA шляхом внутрішньочеревинної ін'єкції й обробляли 50 мг/кг антитіла S4497 як такого або 50 мг/кг 102 AAC (HC-A114C за Kabat = HC-A118C EU), що вводять шляхом внутрішньочеревинної ін'єкції. Мишей умертвляли на 2 день після інфекції та вимірювали загальне бактеріальне навантаження у перитонеальному супернатанті (позаклітинні бактерії), перитонеальних клітинах (внутрішньоклітинні бактерії) або в нирках.

40 На Фіг. 8B показані результати для внутрішньовенної моделі інфекції *in vivo* на мишах A/J. Мишей інфікували MRSA шляхом внутрішньовенної ін'єкції й обробляли 50 мг/кг антитіла S4497 як такого, 50 мг/кг тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-pirBOR 102 AAC або простою сумішшю 50 мг/кг антитіла S4497 + 0,5 мг/кг вільного рифаміцину. Сірою пунктирною лінією позначена межа виявлення для кожного органу.

45 На Фіг. 9A показана ефективність тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-pirBOR 102 AAC у моделі внутрішньовенної інфекції за допомогою титрування S4497-pirBOR AAC.

50 На Фіг. 9B показано, що тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-диметилpirBOR 105 AAC більш ефективне, ніж тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-pirBOR 102 AAC, що продемонстровано на моделі внутрішньовенної інфекції за допомогою титрування. Лікування антитілом S4497, 102 AAC або тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-диметил-pirBOR 112 AAC проводили шляхом їхнього введення в зазначених дозах через 30 хвилин після інфекції. Мишей умертвляли на 4 день після інфекції та, роблячи посіви, визначали загальну кількість бактерій, що вижили, на мишу (поєднували матеріал 2 нирок).

55 На Фіг. 9C показано, що тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-диметилpirBOR 105 AAC більш ефективне, ніж антитіло S4497 або антибіотик диметилpirBOR 7 як такі, що продемонстровано в моделі внутрішньовенної інфекції. Мишей CB17.SCID інфікували 2×10^7 КУО MRSA шляхом внутрішньовенної інфекції. Через один день після інфекції мишей обробляли 50 мг/кг антитіла S4497, 50 мг/кг AAC 105 або 0,5 мг/кг диметил-pirBOR 7, еквівалентною дозою антибіотика, що

міститься в 50 мг/кг AAC. Мишей умертвляли на 4 день після інфекції та, роблячи посіви, визначали загальну кількість бактерій, що вижили, на мишу (поєднували матеріал 2 нирок).

На Фіг. 10A показаний рівень анти-*S. aureus* антитіл у сироватці крові людини. Пацієнти, інфіковані *S. aureus*, або здорові донори містять у сироватці крові високі кількості специфічних до WTA антитіл з тією самою специфічністю, що й анти-WTA S4497. Зв'язування різних зразків сироватки дикого типу (WT) з MRSA, експресуючим антиген S4497, досліджували у порівнянні з сполученням з мутантним штамом MRSA TarM/TarS DKO (подвійний нокаут), у якого відсутні модифікації цукру, розпізнавані антитілом S4497.

На Фіг. 10B показано, що AAC ефективно у присутності фізіологічних рівнів людських IgG (10 мг/мл), що продемонстровано в аналізі макрофагів *in vitro* із штамом MRSA USA300. Тіо-S4497-НС-A118C-MC-vc-PAB-диметилріпBOR 105 ефективний у присутності 10 мг/мл людських IgG. Штам MRSA USA300 опсонізували AAC як таким або AAC, розведеним в 10 мг/мл людських IgG. Загальну кількість внутрішньоклітинних бактерій, що вижили, оцінювали через 2 дні після інфекції.

На Фіг. 10C показана модель інфекції *in vivo*, що демонструє, що AAC ефективно у присутності фізіологічних рівнів людських IgG. Дані об'єднані з 3 незалежних експериментів із використанням двох окремих препаратів AAC тіо-S4497-НС-A118C-MC-vc-PAB-диметилріпBOR 105 або 112. У мишей, оброблених AAC, спостерігалось зниження бактеріального навантаження більше ніж на 4 порядки (t-критерій Стюдента $p=0,0005$).

На Фіг. 11A показана модель інфекції *in vivo*, що демонструє, що AAC більш ефективно, ніж сучасний стандарт лікування (SOC) антибіотик ванкомицин, у мишей, в яких створений нормальний рівень людських IgG. Мишей обробляли антитілом S4497 (50 мг/кг), ванкомицином (100 мг/кг), тіо-S4497-НС-A118C-MC-vc-PAB-диметилріпBOR 105 AAC (50 мг/кг) або AAC, що містить контрольне антитіло з тим же самим ізотипом, що не розпізнає MRSA, тіо-hu-анти gD 5B5-НС-A118C-MC-vc-PAB-диметилріпBOR 110 AAC (50 мг/кг).

На Фіг. 11B показане відносне зв'язування анти-*S. aureus* антитіл із штамом USA300, виділеним із нирок у моделі інфекції *in vivo*, вимірюване за допомогою FACS. Антитіло S4497 розпізнає модифікацію N-ацетилглюкозаміном, сполученим із тейхоєвою кислотою клітинної стінки (WTA) через бета-аномерний зв'язок на клітинній стінці *S. aureus*. Антитіло S7578 сполучається з аналогічною модифікацією N-ацетилглюкозаміном, приєднаним до WTA через альфа-аномерний зв'язок. Антитіло gF1 є позитивним контролем для анти-MRSA антитіл, що розпізнають модифікації цукру, виявлені в сімействі білків, заякорених у клітинній стінці та, що містить SDR-повтор. Антитіло gD є негативним контролем та являє собою людський IgG₁, що не розпізнає *S. aureus*.

На Фіг. 11C показана модель інфекції *in vivo*, що демонструє, що у мишей, в яких створений нормальний рівень людських IgG, AAC тіо-S6078-НС A114C-LCWT-MC-vc-PAB-диметилріпBOR 129 більш ефективний, ніж голе анти-WTA антитіло S4497, що вводять відповідно до того самого режиму дозування, що й на Фіг. 11A. Мишей обробляли антитілом S4497 (50 мг/кг) або тіо-S6078-НС A114C-LCWT-MC-vc-PAB-диметилріпBOR 129 AAC (50 мг/кг).

На Фіг. 12 наведений аналіз інгібування росту, що демонструє, що AAC не є токсичним для *S. aureus*, поки лінкер не буде розщеплений катепсином В. Ліворуч схематично показаний аналіз вивільнення з катепсином (Приклад 20). AAC обробляли катепсином В для вивільнення вільного антибіотика. Загальний рівень активності антибіотика у випадку інтактного AAC у порівнянні з AAC, обробленим катепсином В, визначали, роблячи серійні розведення отриманих реакційних сумішей і визначаючи мінімальну дозу AAC, при якій відбувалося інгібування росту *S. aureus*. Верхній правий графік ілюструє аналіз вивільнення з катепсином для тіо-S4497-НС-A118C-MC-vc-PAB-ріпBOR 102, а нижній правий графік ілюструє аналіз вивільнення з катепсином для тіо-S4497-НС-A118C-MC-vc-PAB-диметилріпBOR 105.

На Фіг. 13A наведене вирівнювання амінокислотної послідовності варіабельних областей легких ланцюгів (VL) чотирьох людських анти-WTA альфа антитіл (SEQ ID NOS 25, 27, 29 і 31, відповідно, по порядку). Підкреслено послідовності CDR L1, L2 і L3 відповідно до нумерації Kabat.

На Фіг. 13B наведене вирівнювання амінокислотної послідовності варіабельних областей важких ланцюгів (VH) чотирьох людських анти-WTA альфа антитіл, наведених на Фіг. 13A. Підкреслено послідовності CDR H1, H2 і H3 відповідно до нумерації Kabat (SEQ ID NOS 26, 28, 30 і 32, відповідно, по порядку).

На Фіг. 14 наведені послідовності CDR L і H ланцюгів 13 людських анти-WTA бета антитіл (SEQ ID NOS 33-110).

На Фіг. 15A-1 і 15A-2 наведене вирівнювання повнорозмірного L ланцюга (легкий ланцюг) анти-WTA бета Ab 6078 (немодифіковане антитіло) та його варіантів, v2, v3, v4 (SEQ ID NOS

113, 113, 115, 113, 115, 113, 115 і 115, відповідно, по порядку). Підкреслено послідовності CDR L1, L2 і L3 відповідно до нумерації Kabat. У прямокутниках показані залишки області контакту та залишки CDR відповідно до Kabat і Chothia. Варіанти L ланцюга, що містять Cys, введений методами генної інженерії, відзначені символом С у чорному квадраті на кінці константної області (у цьому випадку залишок має номер 205 за EU). Позначення варіанта, наприклад, v2LC-Cys означає, що варіант 2 містить Cys, введений методами генної інженерії, в L ланцюзі. HCLC-Cys означає, що кожен з ланцюгів, Н і L, містить Cys, введений методами генної інженерії. Варіанти 2, 3 і 4 містять зміни на початку Н ланцюга, як показано на Фіг. 15B.

На Фіг. 15B-1, 15B-2, 15B-3, 15B-4 наведене вирівнювання повнорозмірного Н ланцюга (важкого ланцюга) анти-WTA бета антитіла 6078 (немодифіковане антитіло) та його варіантів, v2, v3, v4 (SEQ ID NOS 114, 139-144 і 143, відповідно, по порядку), у яких присутні зміни на початку Н ланцюга. Варіанти Н ланцюга, які містять Cys, введений методами генної інженерії, відзначені символом С у чорному квадраті на кінці константної області (у цьому випадку залишок має номер 118 за EU).

На Фіг. 16A-1 і 16A-2 наведене вирівнювання повнорозмірного L ланцюга анти-WTA бета антитіла 4497 (немодифіковане антитіло) і Cys-генно-інженерного L ланцюга (SEQ ID NOS 121, 123, 145 і 145, відповідно, по порядку). Підкреслено послідовності CDR L1, L2 і L3 відповідно до нумерації Kabat. У прямокутниках показані залишки області контакту та залишки CDR відповідно до Kabat і Chothia. Варіанти L ланцюга, що містять Cys, введений методами генної інженерії, відзначені символом С у пунктирному квадраті на кінці константної області (у цьому випадку залишок має номер 205 за EU).

На Фіг. 16B-1, 16B-2, 16B-3 наведене вирівнювання повнорозмірного Н ланцюга анти-WTA бета антитіла 4497 (немодифіковане) та його варіанта v8 із заміною D на E у положенні 96 в CDR H3, що містить або не містить Cys, введений методами генної інженерії (SEQ ID NOS 146-147, 157 і 147, відповідно, один по порядку). Варіанти Н ланцюга, які містять Cys, введений методами генної інженерії, відзначені символом С у чорному квадраті на кінці константної області (у цьому випадку залишок має номер 118 за EU).

На Фіг. 17A-1, 17A-2, 17A-3 наведене вирівнювання амінокислотних послідовностей повнорозмірних легких ланцюгів тринадцяти людських анти-WTA бета антитіл (SEQ ID NOS 113, 158-167, 121 і 168, відповідно, по порядку). Варіабельна область (VL) відповідає амінокислотним положенням 1-107 відповідно до Kabat. Підкреслено послідовності CDR L1, L2 і L3 відповідно до нумерації Kabat.

На Фіг. з 17B-1 до 17B-6 наведене вирівнювання амінокислотної послідовності повнорозмірних важких ланцюгів тринадцяти людських анти-WTA бета антитіл, наведених на Фіг. 17A-1, 17A-2, 17A-3 (SEQ ID NOS 114, 169-176, 133-134, 138 і 127, відповідно, по порядку). Варіабельна область (VH) відповідає амінокислотним положенням 1-113 відповідно до Kabat. Підкреслені послідовності CDR H1, H2 і H3 відповідно до нумерації Kabat. Амінокислота у положенні 118 за нумерацією Eu в Н ланцюзі, позначеному зірочкою, може бути замінена на Cys з метою кон'югації лікарського засобу. Залишки, виділені чорним, можуть бути замінені на інші залишки, які не впливають на зв'язування антигена, з метою уникнути деамінування, ізомеризації аспарагінової кислоти, окислювання або N-глікозилювання.

На Фіг. 18A показане зв'язування мутантів Ab 4497 із клітинною стінкою *S. aureus* за даними ELISA.

На Фіг. 18B наведене порівняння Ab 4497 і його мутантів (SEQ ID NOS 177, 177, 177-178, 178-179, 179-180, 180 і 180, відповідно, по порядку) у виділених амінокислотних положеннях та їхній відносній силі зв'язування з антигеном за даними ELISA.

На Фіг. 19 наведені результати FACS аналізу зв'язування Ab 6078 WT і мутантів із штамом USA300 (USA300-SPA), дефіцитним за білком А, як описано у Прикладі 23. Для мутантів показано таке саме зв'язування з *S. aureus*.

На Фіг. 20 показано, що попередня обробка 50 мг/кг вільних антитіл не ефективна в моделі внутрішньовенної інфекції. Мишам Balb/c шляхом внутрішньовенної ін'єкції вводили однократну дозу носія як контроль (PBS) або 50 мг/кг антитіл за 30 хвилин до інфекції 2×10^7 КУО USA300. Експериментальні групи включали антитіло для ізотопічного контролю, що не зв'язується з *S. aureus* (gD), антитіло, спрямоване проти бета-модифікації тейхоєвих кислот клітинної стінки (4497), або антитіло, спрямоване проти альфа тейхоєвих кислот клітинної стінки (7578). Контрольним мишам шляхом внутрішньочеревинної ін'єкції два рази на день вводили 110 мг/кг ванкоміцину (Vanco).

На Фіг. 21 і Фіг. 22 показано, що AAC, спрямовані або проти бета модифікації тейхоєвих кислот клітинної стінки, або проти альфа модифікації тейхоєвих кислот клітинної стінки, є ефективними в моделі внутрішньовенної інфекції на мишах, у яких створений нормальний

рівень людських IgG. У мишей CB17.SCID створювали нормальний рівень людських IgG, використовуючи режим дозування, оптимізований для досягнення постійного рівня, що становить, щонайменше, 10 мг/мл людських IgG у сироватці крові, після чого інфікували 2×10^7 KYO USA300 шляхом внутрішньовенної ін'єкції. Обробку починали через 1 день після інфекції тільки буфером як контроль (PBS), 60 мг/кг бета-WTA AAC (136 AAC) або 60 мг/кг альфа-WTA AAC (155 AAC).

На Фіг. 23A і Фіг. 23B показаний синтез інтермедиату лінкер-антибіотик 51 з 2-нітробензолу-1,3-діолу 1.

На Фіг. 24 показаний синтез інтермедиату лінкер-антибіотик, MC-vc-PAB-диметил pipBOR 54 з TBS-захищеного бензоксазинорифаміцину 4.

На Фіг. 25A і Фіг. 25B показаний синтез диметилpipBOR 7 з (5-фтор-2-нітро-1,3-фенілен)біс(окси)біс(метилен)добензолу 9.

На Фіг. 26 наведена структура FRET пептидного субстрату для підтвердження розщеплення, mal-K(TAMRA)GGAFAGGGK(флуоресцеїн) (SEQ ID NO: 125), що містить залишки, які найбільш часто зустрічаються у P1, P2 і P3, отримані в результаті скринінгу протеазної активності REPLi. Фланкуючі залишки Gly у структурі пептиду REPLi FRET були консервативними. Тіол-функціональна група на N-кінці забезпечувала кон'югацію з антитілами з реакційноздатними залишками цистеїну. При розщепленні пептиду FRET ефект гасіння пропадає та спостерігається підвищення флуоресценції.

На Фіг. 27 наведена структура thioFAB S4497-MC-GGAFAGGG-(pipBOR) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 126), спеціальної сполуки, яку використовують для ідентифікації активних фракцій, що містять протеази, які цікавлять. Mal-GGAFAGGG-DNA31 («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 126) кон'югували з THIOFAB 4497. THIOFAB містить один реакційноздатний цистеїн. Протеаза *S. aureus* розщеплювала лінкер з C-кінця від Ala, вивільняючи Gly-Gly-Gly-(pipBOR).

На Фіг. 28 і Фіг. 29 показано, що Mal-K(tamra)GGAFAGGGK(флуоресцеїн) (SEQ ID NO: 125) AAC розщеплюється як у Wood46 (Фіг. 28), так й у USA300 (Фіг.29), коли він кон'югований з антитілом, що сполучається з *S. aureus* (тіо-S4497), і не розщеплюється, коли кон'югований з антитілом, що не сполучається з *S. aureus* (тіо-трастузумаб). Інтенсивність флуоресценції вимірюють протягом періоду часу, коли ThioMab 4497 mal-K(tamra)GGAFAGGGK(флуоресцеїн) (SEQ ID NO: 125) інкубують з культурами Wood46 і USA300 MRSA, що перебувають у фазі логарифмічного росту. Кон'югати ThioMab 4497 FRET пептид, отримані з mal-K(TAMRA)GGAFAGGGK(флуоресцеїн) (SEQ ID NO: 125), наведеного на Фіг. 26, демонструють збільшення флуоресценції в обох штаммах, що свідчить про те, що експериментальний лінкер розщеплюється протеазою *S. aureus* і про те, що протеаза є присутньою у клінічно значимому штамі MRSA, USA300 (Фіг. 29). Щільність клітин впливає на швидкість розщеплення, у культурах з більш високою щільністю клітин (10^8 клітин/мл) розщеплення відбувається раніше. У випадку кон'югату, що містить контрольне антитіло з тим же самим ізотипом (тіо-трастузумаб), не відбувається збільшення флуоресценції у будь-яких умовах.

На Фіг. 30 наведені два оптимізованих лінкера для розщеплення AAC стафопаїном B. Лінкери оптимізували для розщеплення стафопаїном B, включаючи переваги за залишками для P4 і P1'. Лінкери були сконструйовані з використанням даних із скринінгу REPLi. QSY7 був доданий до C-кінця кожного лінкера як сурогатна заміна антибіотика.

На Фіг. 31 показані результати аналізу з макрофагами, що демонструють, що розщеплюваний стафопаїном AAC може знищувати внутрішньоклітинні бактерії. Для забезпечення зв'язування AAC з бактеріями штам *S. aureus* USA300 інкубували з різними дозами (100 мкг/мл, 10 мкг/мл, 1 мкг/мл або 0,1 мкг/мл) антитіла S4497 як такого, тіо-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MC-vc-PAB-(диметилpipBOR) AAC-192 або тіо-S4497 HC v1-MP-LAFG-PABC-(піперазиноBOR) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 128) AAC-193 (Фіг. 31). Після інкубації протягом 1 години опсонізовані бактерії додавали до мишачих макрофагів та інкубували при 37 °C протягом 2 годин, щоб відбувся фагоцитоз. Після завершення фагоцитозу суміш для інфікування заміняли нормальним середовищем для росту з додаванням 50 мкг/мл гентаміцину, щоб вбити будь-які позаклітинні бактерії, які залишились, і через 2 дні визначали загальну кількість бактерій, що вижили, роблячи посіви серійних розведень лізатів макрофагів на чашках із триптичним соєвим агаром. AAC, розщеплюваний стафопаїном, міг знищувати внутрішньоклітинні USA300 з аналогічною активністю, як й AAC, розщеплюваний катепсином B. Сірою пунктирною лінією позначена межа виявлення для цього аналізу (10 КУО/ямку).

На Фіг. 32 показані результати аналізу з макрофагами, демонструючи, що AAC, який розщеплюють стафопаїном, можуть знищувати внутрішньоклітинні бактерії. AAC направляє дію антибіотика проти *S. aureus* за рахунок антиген-специфічного сполучення з антитілом. Штам *S.*

aureus Wood46 був вибраний для цього експерименту, оскільки не експресує білок A, молекулу, що сполучається з Fc областю антитіл IgG. Для сполучення AAC з бактеріями штам *S. aureus* Wood46 протягом 1 години інкубували з 10 мкг/мл або 0,5 мкг/мл антитіла S4497; AAC, що містить контрольне антитіло з тим же самим ізотипом, що містить розщеплюваний катепсином B лінкер, тіо-трастузумаб HC A118C-MC-vc-PAB-(диметил-ріпBOR) AAC-101; тіо-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MC-vc-PAB-(диметилріпBOR) AAC-192; AAC, що містить контрольне антитіло з тим же самим ізотипом, що містить розщеплюваний стафопаїном лінкер, тіо-трастузумаб HC A118C-MP-LAFG-PABC-(піперазиноBOR) («коровий пептид» розкритий в SEQ ID NO: 128); або тіо-S4497 HC v1-MP-LAFG-PABC-(піперазиноBOR) («коровий пептид» розкритий в SEQ ID NO: 128) AAC-193. Для обмеження неспецифічного сполучення AAC опсонізовані бактерії центрифугували, промивали один раз і ресуспендували у буфері до додавання до мишачих макрофагів. Після завершення фагоцитозу суміш для інфікування заміняли на нормальне середовище для росту з додаванням 50 мкг/мл гентаміцину для знищення позаклітинних бактерій, що залишились, і через 2 дні визначали загальну кількість бактерій, що вижили, роблячи посіви серійних розведень лізатів макрофагів на чашках із триптичним соєвим агаром. 4497-AAC, що містить розщеплюваний стафопаїном лінкер, був здатний знищувати всі внутрішньоклітинні бактерії, що виявляють, тоді як AAC, що містить контрольне антитіло з тим же самим ізотипом, показав відсутність активності.

На Фіг. 33 і 34 показано, що розщеплюваний стафопаїном AAC активний у моделі внутрішньовенної інфекції на мишах *in vivo*. У мишей CB17.SCID створювали нормальний рівень людських IgG, використовуючи режим дозування, оптимізований таким чином, щоб був досягнутий постійний рівень людських IgG у сироватці крові, що становить, щонайменше, 10 мг/мл. Мишей обробляли антитілом 4497 (50 мг/кг), AAC-215 з лінкером, розщеплюваним стафопаїном (50 мг/кг), або контрольним AAC з антитілом того самого ізотипу анти-gD, що містить лінкер, розщеплюваний стафопаїном (50 мг/кг). Мишам давали однократну дозу AAC-215 в 1 день після інфекції шляхом внутрішньовенної ін'єкції. Загальна кількість бактерій, що вижили, в 2 нирках (Фіг. 33) або в серці (Фіг. 34) визначали, роблячи посіви.

На Фіг. 35 і 36 наведені результати аналізу з макрофагами *in vitro* для тіо-S6078 AAC. На Фіг. 35 показано, що AAC тіо-S6078.v4.HC-WT, LC-Cys-MC-vc-PAB-(диметилріпBOR) був ефективний для знищення внутрішньоклітинних бактерій у дозах 0,5 мкг/мл або вище при навантаженні антибіотика диметилріпBOR (LA-54), що становить 2,0 (AAC-173) або 3,9 (AAC-171) на антитіло тіо-S6078. На Фіг. 36 показано, що тіо-S6078.v4.HC-WT, LC-Cys-MC-vc-PAB-(піперазBOR) ефективний для знищення внутрішньоклітинних бактерій у дозах 0,5 мкг/мл або вище при навантаженні антибіотика піперазBOR (LA-65), що становить 1,8 (AAC-174) або 3,9 (AAC-172) на антитіло тіо-S6078.

На Фіг. 37 і 38 наведені результати аналізу ефективності тіо-S6078 AAC *in vivo* у мишачій моделі внутрішньовенної інфекції. У мишей CB17.SCID створювали нормальний рівень людських IgG, використовуючи режим дозування, оптимізований таким чином, щоб був досягнутий постійний рівень людських IgG у сироватці крові, що становить, щонайменше, 10 мг/мл. Мишей інфікували USA300 й обробляли носієм як контроль (PBS), тіо-S6078.v4.HC-WT, LC-Cys-MC-vc-PAB-(диметилріпBOR) AAC з навантаженням антибіотика диметилріпBOR (LA-54), що становить 2,0 (AAC-173) або 3,9 (AAC-171) на тіо-S6078 антитіло (Фіг. 37), і тіо-S6078.v4.HC-WT, LC-Cys-MC-vc-PAB-(піперазBOR) з навантаженням піперазBOR антибіотика (LA-65), що становить 1,8 (AAC-174) або 3,9 (AAC-172) на тіо-S6078 антитіло (Фіг. 38). Мишам давали однократну дозу AAC-215 в 1 день після інфекції шляхом внутрішньовенної ін'єкції й умиротворяли на 4 день після інфекції. Загальну кількість бактерій, що вижили, в 2 нирках визначали, роблячи посіви. Обробка AAC з меншим навантаженням антибіотика призводила до зниження кількості бактерій приблизно в 1000 разів, а обробка AAC з високим навантаженням антибіотика призводила до зниження кількості бактерій більш ніж в 10000 разів.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

Нижче буде дане докладне посилання на деякі варіанти втілення даного винаходу, приклади яких проілюстровані прикладеними структурами й формулами. Тоді як даний винахід буде описаний з використанням кінцевого числа варіантів втілення, включаючи способи, матеріали та приклади, такий опис не є обмежувачим, і даний винахід охоплює всі альтернативи, модифікації й еквіваленти, які є загальновідомими, або включені в даний опис. У випадку якщо один або декілька з включених літературних джерел, патентів й аналогічних матеріалів відрізняється від змісту цієї заявки або суперечить цій заявці, включаючи, але не обмежуючись певними термінами, використанням термінів, описаними методами або тому подібним, перевагу варто віддавати цій заявці. Якщо не визначено інше, всі технічні та наукові терміни, які використовуються в даному документі, мають ті самі значення, що зазвичай розуміються

фахівцем із звичайною кваліфікацією в області, до якої належить цей винахід. Фахівцю в даній області техніки будуть очевидні численні способи й матеріали, подібні або еквівалентні описаним у даному документі, які можуть бути використані для практичного здійснення даного винаходу. Даний винахід ніяк не обмежений описаними способами й матеріалами.

5 Всі опубліковані патенти, патентні заявки, патенти й інші посилання, згадані в даному документі, включені в даний документ за допомогою посилання у всій своїй повноті.

I. ЗАГАЛЬНІ МЕТОДИ

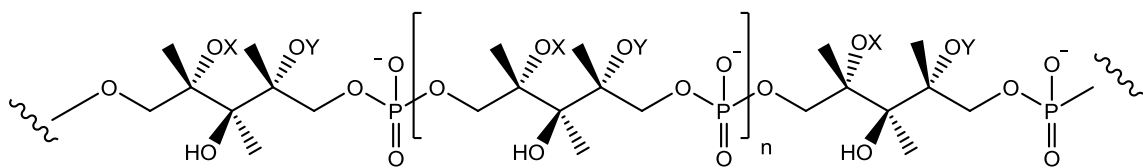
Методи й методики, описані або наведені у вигляді посилання в даному документі, як правило, добре відомі й зазвичай застосовуються з використанням традиційних підходів фахівцями в даній області техніки, наприклад, широко використовувані методики описані в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3d 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); i *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993).

Номенклатура, яку використовують в цій заявці, заснована на систематичній номенклатурі IUPAC, якщо не зазначено інше. Якщо не зазначено інше, технічні й наукові терміни, використані в даному документі, мають ті самі значення, які зазвичай розуміються фахівцем із звичайною кваліфікацією в області, до якої належить цей винахід, і відповідають: Singleton et al (1994) *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*, 2nd Ed., J. Wiley & Sons, New York, NY; i Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immunobiology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York.

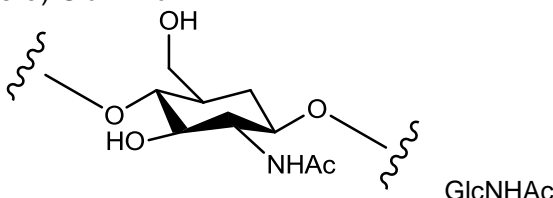
II. ВИЗНАЧЕННЯ

При вказівці кількості замісників термін "один або декілька" відноситься до діапазону від одного замісника до максимально можливого числа замісників, тобто до заміни одного водню й так далі до заміни всіх воднів на замісники. Термін "замісник" означає атом або групу атомів, що заміщають атом водню у вихідній молекулі. Термін "заміщений" означає, що зазначена група має один або декілька замісників. Якщо яка-небудь група може мати декілька замісників, і передбачені різноманітні можливі замісники, то замісники вибрані незалежно й не обов'язково повинні бути однаковими. Термін "незаміщений" означає, що зазначена група не має замісників. Термін "необов'язково заміщений" означає, що зазначена група не заміщена або заміщена одним або декількома замісниками, незалежно вибраними з групи можливих замісників. Коли зазначена кількість замісників, термін "один або декілька" означає від одного замісника до максимально можливого числа замісників, тобто заміну одного водню й так далі до заміни всіх воднів на замісники.

Термін "тейхоєві кислоти клітинної стінки" (WTA) означає аніонні глікополімери, ковалентно приєднані до пептидоглікану через фосфодієфірний зв'язок з C6 гідроксилом цукру N-ацетилмурамової кислоти. Тоді як точна хімічна структура може варіювати між організмами, в одному з варіантів втілення, WTA являють собою рибіт тейхоєву кислоту з повторюваними одиницями з'єднаного 1,5-фосфодієфірними зв'язками D-рибіту з D-аланіновим ефіром у положенні 2 і глікозильними замісниками у положенні 4. Глікозильні групи можуть являти собою N-ацетилглюкозамініл α (альфа) або β (бета), як у випадку *S. aureus*. Гідроксили на повторюваних одиницях алдитол/цукровий спирт фосфату заміщені катіонними ефірами D-аланіну та моносахаридами, такими як N-ацетилглюкозамін. В одному з аспектів, замісники гідроксилу включають D-аланіл й альфа (α) або бета (β) GlcNHAc. В одному певному аспекті, WTA включає сполуку, що відповідає формулі:



де хвилясті лінії означають зв'язки з повторюваними одиницями або сайт приєднання поліалдитолу-р або пептидоглікану, де X являє собою D-аланіл або -H; і Y являє собою α (альфа)-GlcNHAc або β (бета)-GlcNHAc.



5

У *S. aureus* WTA ковалентно зв'язані з 6-OH N-ацетил мурамової кислоти (MurNAc) через дисахарид, що складається з N-ацетилглюкозаміну (GlcNAc)-1-P і N-ацетилманозаміну (ManNAc), за яким ідуть дві або три гліцерол-фосфатні одиниці. Фактичний полімер WTA далі складається з 11-40 повторюваних одиниць рибіт-фосфат (Rbo-P). Послідовний синтез WTA спочатку ініціюється ферментом, називаним TagO, і штами *S. aureus* без гена TagO (у результаті штучного видалення гена) не утворюють WTA. Повторювані одиниці можуть бути далі модифіковані D-аланіном (D-Ala) у положенні C2-OH і/або N-ацетилглюкозаміном (GlcNAc) у положенні C4-OH через α - (альфа) або β - (бета) глікозидні зв'язки. Залежно від штаму *S. aureus* або фази росту бактерії глікозидний зв'язок може бути α -, β - або являти собою суміш двох аномерів.

Термін "антибіотик" (abx або Abx) включає будь-яку молекулу, що специфічно інгібує ріст або знищує мікроорганізми, такі як бактерії, але не є летальною для хазяїна у введеній концентрації й інтервалі дозування. У певному аспекті антибіотик є нетоксичним для хазяїна у введеній концентрації й інтервалах дозування. Антибіотики, ефективні відносно бактерій, можуть бути класифіковані як бактерицидні (тобто прямо вбиваючі бактерії) або бактериостатичні (тобто, що запобігають діленню бактерій). Бактерицидні антибіотики можуть бути далі класифіковані як антибіотики вузького або широкого спектра дії. Антибіотик широкого спектра дії являє собою антибіотик, ефективний відносно широкого діапазону бактерій, у тому числі грамположитивних і грамнегативних бактерій, на відміну від антибіотика вузького спектра дії, ефективного проти невеликого діапазону бактрій або певних сімейств бактерій. Приклади антибіотиків включають: (i) аміноглікозиди, наприклад, амікацин, гентаміцин, канаміцин, неоміцин, нетилміцин, стрептоміцин, тобраміцин, пароміцин, (ii) ансаміцини, наприклад, геліданаміцин, гербіміцин, (iii) карбацефеми, наприклад, лоракарбеф, (iv), карбапенеми, наприклад, ертапенем, доріпенем, іміпенем/ циластатин, меропенем, (v) цефалоспори́ни (першого покоління), наприклад, цефадроксил, цефазолін, цефалотин, цефалексин, (vi) цефалоспори́ни (другого покоління), наприклад, цефлакlor, цефамандол, цефокситин, цефпрозил, цефутоксим, (vi) цефалоспори́ни (третього покоління), наприклад, цефіксим, цефдинір, цефдиторен, цефоперазон, цефотаксим, цефподоксим, цефтазидим, цефтибутен, цефтизоксим, цефтриаксон, (vii) ефалоспори́ни (четвертого покоління), наприклад, цефепім, (viii) цефалоспори́ни (п'ятого покоління), наприклад, цефтобіпрол, (ix) глікопептиди, наприклад, тейкопланін, ванкомицин, (x) макроліди, наприклад, азитроміцин, кларитроміцин, диритроміцин, еритроміцин, рокситроміцин, тролеандоміцин, телітроміцин, спектиноміцин, (xi) монобактами, наприклад, азтреонам, (xii) пеніциліни, наприклад, амоксицилін, ампіцилін, азлоцилін, карбеніцилін, флоксацилін, диклоксацилін, флуоклоксацилін, мезлоцилін, метицилін, нафцилін, оксацилін, пеніцилін, піперацилін, тикарцилін, (xiii) антибіотики поліпептиди, наприклад, бацитрацин, колістин поліміксин В, (xiv) хінолони, наприклад, цiproфлоксацин, еноксацин, гатифлоксацин, левофлоксацин, лемефлоксацин, моксифлоксацин, норфлоксацин, офлоксацин, тровафлоксацин, (xv) сульфаніламід, наприклад, мафенід, пронтозил, сульфацетамід, сульфаметизол, сульфаніламід, сульфасалазин, сульфізоксазол, триметоприм, триметоприм-сульфаметоксазол (ТМП-СМК), (xvi) тетрацикліни, наприклад, демеклоциклін, доксициклін, міноциклін, окситетрациклін, тетрациклін та (xvii) інші, такі як арсфенамін, хлорамфенікол, кліндаміцин, лінкоміцин, етамбутол, фосфоміцин, фузидієва кислота, фуразолідон, ізоніазид, лінезолід, метронідазол, мупіроцин, нітрофурантоїн, латенсіміцин, піразинамід, хінупристин/ дальфопристин, рифампіцин/ рифампіцин або тинідазол.

Використовуваний у даному документі термін “WTA антитіло” відноситься до антитіла, що сполучається з WTA, або WTA альфа, або WTA бета. Терміни “антитіло проти тейхоевих кислот клітинної стінки альфа”, або “анти-WTA альфа антитіло”, або “анти- α WTA”, або “анти- α GlcNac WTA антитіло” є взаємозамінними й означають антитіла, що специфічно сполучаються з тейхоевою кислотою клітинної стінки (WTA) альфа. Аналогічно, терміни “антитіло проти тейхоевих кислот клітинної стінки бета”, або “анти-WTA бета антитіло”, або “анти- β WTA”, або “анти- β GlcNac WTA антитіло” є взаємозамінними для позначення антитіла, що специфічно сполучається з тейхоевою кислотою клітинної стінки (WTA) бета. Терміни “анти-Staph антитіло” й “антитіло, що сполучається з Staph” відносяться до антитіла, що здатно сполучати антиген на *Staphylococcus aureus* (“Staph” або “*S. aureus*”) з афінністю, достатньою для того, щоб антитіло використовувалося в якості діагностичного та/або терапевтичного агента для спрямованої дії на *Staph*. В одному з варіантів втілення, ступінь сполучення анти-Staph антитіла з неспорідненим не-Staph білком становить менше ніж приблизно 10% від сполучення антитіла з MRSA, де вимірювання проводять, наприклад, за допомогою, радіоімунологічного аналізу (RIA). У деяких варіантах втілення, антитіло, що сполучається з Staph, має константу дисоціації (Kd), яка становить ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 5 нМ, ≤ 4 нМ, ≤ 3 нМ, ≤ 2 нМ ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ або $\leq 0,001$ нМ (наприклад, 10^{-8} М або менше, наприклад, від 10^{-8} М до 10^{-13} М, наприклад, від 10^{-9} М до 10^{-13} М). У деяких варіантах втілення, анти-Staph антитіло сполучається з епітопом Staph, що є консервативним для різних видів Staph.

Термін “*Staphylococcus aureus*, стійкий до метициліну” (MRSA), альтернативно, *Staphylococcus aureus* з множинною лікарською стійкістю або *Staphylococcus aureus*, стійкий до оксациліну (ORSA), відноситься до будь-якого штаму *Staphylococcus aureus*, що є стійким до бета-лактамних антибіотиків, які включають пеніциліни (наприклад, метицилін, диклоксацилін, нафцилін, оксацилін і тому подібні) і цефалоспорины. “*Staphylococcus aureus*, чутливий до метициліну” (MSSA) відноситься до будь-якого штаму *Staphylococcus aureus*, що є чутливим до бета-лактамних антибіотиків.

Термін “мінімальна інгібуюча концентрація” (“MIC”) відноситься до найменшої концентрації антимікробного агента, що буде інгібувати видимий ріст мікроорганізму після інкубації протягом ночі. Аналізи для визначення MIC відомі. Один із способів описаний у Прикладі 18 нижче.

Термін “антитіло” у даному документі використовується в широкому змісті й, зокрема, охоплює моноклональні антитіла, поліклональні антитіла, димери, мультимери, мультиспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла) й антигенсполучні фрагменти антитіл (Miller et al (2003) J. of Immunology 170:4854-4861). Антитіла можуть являти собою мишачі, людські, гуманізовані, химерні антитіла, або можуть бути отримані з інших видів. Антитіло являє собою білок, утворений імунною системою, здатний розпізнавати та зв'язувати певний антиген (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) Immuno Biology, 5th Ed., Garland Publishing, New York). Цільовий антиген (антиген-мішень), як правило, має множинну сайтів сполучення, названих епітопами, розпізнаваних CDR різноманітних антитіл. Кожне антитіло специфічно сполучається з різними епітопами, що мають різну структуру. Таким чином, один антиген може розпізнаватись та сполучатись більш ніж одним відповідним антитілом. Антитіло включає повнорозмірну молекулу імуноглобуліну або імунологічно активну частину повнорозмірної молекули імуноглобуліну, тобто молекулу, що містить антигенсполучний сайт, що імуноспецифічно сполучається з цікавлячим антигеном-мішенню або його частиною, такі мішені включають, але не обмежуються ними, ракові клітини або клітини, які продукують аутоімунні антитіла, сполучені з аутоімунним захворюванням, інфіковану клітину або мікроорганізм, такий як бактерія. Імуноглобулін (Ig), розкритий у даному документі, може бути будь-якого ізотипу, за винятком IgM (наприклад, IgG, IgE, IgD і IgA), і підкласу (наприклад, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 і IgA2). Імуноглобуліни можуть бути отримані з будь-яких видів. В одному з аспектів, Ig являє собою Ig людини, миші або кролика. У певному варіанті втілення Ig має людське походження.

“Клас” антитіла відноситься до типу константного домену або константної області важкого ланцюга. Існує п'ять основних класів антитіл: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, деякі з яких можуть бути далі підрозділені на підкласи (ізотипи), наприклад, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ і IgA₂. Константні домени важкого ланцюга, що відповідають різним класам імуноглобулінів, називаються α , δ , ϵ , γ і μ , відповідно.

“Нативні антитіла” відносяться до молекул імуноглобулінів, що мають різноманітні структури й зустрічаються у природі. Наприклад, нативні антитіла IgG являють собою гетеротетрамерні глікопротеїни масою приблизно 150000 Дальтон, що складаються з двох ідентичних легких ланцюгів і двох ідентичних важких ланцюгів, сполучених дисульфідними зв'язками. У кожному важкому ланцюзі в напрямку від N-кінця до C-кінця перебуває варіабельна область (VH), яку

також називають важким варіабельним доменом або варіабельним доменом важкого ланцюга, далі слідує три константних домени (CH1, CH2 і CH3). Аналогічно, у напрямку від N-кінця до C-кінця в кожному легкому ланцюзі перебуває варіабельна область (VL), яку також називають легким варіабельним доменом або варіабельним доменом легкого ланцюга, далі слідує константний домен легкого ланцюга (CL). Легкий ланцюг антитіла на основі амінокислотної послідовності константного домену може належати до одного з двох типів, які називають каппа (κ) і лямбда (λ).

Терміни “повнорозмірне антитіло”, “інтактне антитіло” та “ціле антитіло” використовуються в даному документі взаємозамінно для позначення антитіла, що має структуру, по суті аналогічну структурі нативного антитіла, або має важкі ланцюги, що містять область Fc, як визначено в даному документі.

“Антигенсполучний фрагмент” антитіла відноситься до молекули, відмінної від інтактного антитіла, що включає частину інтактного антитіла, що сполучається з антигеном, з яким сполучається інтактне антитіло. Приклади фрагментів антитіла включають, але не обмежуються ними, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; діатіла; лінійні антитіла; молекули одноланцюгових антитіл (наприклад, scFv); і мультиспецифічні антитіла, утворені фрагментами антитіл.

Використовуваний у даному документі термін “моноклональне антитіло” відноситься до антитіла, отриманого з популяції по суті гомогенних антитіл, тобто, індивідуальні антитіла, що становлять популяцію, є ідентичними та/або сполучаються з тим самим епітопом, за винятком можливих варіантів антитіл, наприклад, що містять мутації, що зустрічаються у природі, або утворюються у процесі одержання препаратів моноклональних антитіл (наприклад, природні розходження в глікозилуванні), такі варіанти, як правило, присутні в невеликих кількостях. Один із таких можливих варіантів для антитіл IgG1 утворюється в результаті відщеплення C-кінцевого лізину (K) константної області важкого ланцюга. На відміну від препарату поліклональних антитіл, що зазвичай включає різні антитіла, спрямовані проти різних детермінант (епітопів), кожне моноклональне антитіло препарату моноклональних антитіл спрямоване проти єдиної детермінанти на антигені. Таким чином, модифікатор “моноклональне” вказує на характер антитіла як отриманого з по суті гомогенної популяції антитіл, і не повинен бути витлумачений як потребує одержання антитіла яким-небудь конкретним способом. Наприклад, моноклональні антитіла для застосування відповідно до даного винаходу можуть бути отримані різноманітними методами, включаючи, але не обмежуючись цим, гібридомний спосіб, способи рекомбінантних ДНК, фаговий дисплей і способи з використанням трансгенних тварин, що містять весь людський імуноглобуліновий локус або його частину, такі способи й інші приклади способів одержання моноклональних антитіл описані в даному документі. Крім їхньої специфічності, перевага моноклональних антитіл полягає в тому, що вони можуть бути синтезовані без домішок інших антитіл.

Термін “химерне антитіло” відноситься до антитіла, в якому частина важкого та/або легкого ланцюга отримана з одного джерела або виду, тоді як частина, що залишилася, важкого та/або легкого ланцюга отримана з іншого джерела або виду.

“Людське антитіло” являє собою антитіло, яке має амінокислотну послідовність, що відповідає такій в антитілі, яке продукується людиною або людською клітиною або отримане з не людського джерела з використанням послідовностей, що кодують репертуар людських антитіл, або інших послідовностей, що кодують людські антитіла. Це визначення людського антитіла спеціально виключає гуманізоване антитіло, що включає не людські антигенсполучні залишки.

“Гуманізоване антитіло” відноситься до химерного антитіла, що включає амінокислотні залишки з не людських HVR та амінокислотні залишки з людських FR. У деяких варіантах втілення, гуманізоване антитіло буде включати по суті все з, щонайменше, одного й, як правило, двох варіабельних доменів, у яких всі або по суті всі HVR (наприклад, CDR) відповідають таким у не людському антитілі, і всі або по суті всі FR відповідають таким у людському антитілі. Гуманізоване антитіло необов'язково може включати, щонайменше, частину константної області антитіла, отриманої з людського антитіла. “Гуманізована форма” антитіла, наприклад, не людського антитіла, відноситься до антитіла, що було піддане гуманізації.

Термін “варіабельна область” або “варіабельний домен” відноситься до домену важкого або легкого ланцюга антитіла, що бере участь у сполученні антитіла з антигеном. Варіабельні домени важкого ланцюга та легкого ланцюга (VH і VL, відповідно) нативного антитіла, як правило, мають аналогічні структури, де кожен домен включає чотири консервативні каркасні області (FR) і три гіперваріабельні області (HVR). (Дивіться, наприклад, Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007).) Одного VH або VL домену може бути

досить для додавання атигенсполучної специфічності. Більш того, антитіла, які сполучають конкретний антиген, можуть бути виділені з використанням VH або VL домену з антитіла, що сполучає антиген, для скринінгу бібліотеки комплементарних VL або VH доменів, відповідно. Дивіться, наприклад, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

Термін "гіперваріабельна область", "HVR" або "HV", який використовується у даному документі, відноситься до областей варіабельного домену антитіла, що є гіперваріабельними за послідовністю ("визначальні комплементарність області" або "CDR"), і/або утворюючим структурно обумовлені петлі, і/або містить залишки, які контактують з антигеном ("області контакту з антигеном"). Зазвичай, антитіла включають шість HV; три у VH (H1, H2, H3) і три у VL (L1, L2, L3). У нативних антитілах H3 і L3 демонструють найбільшу розмаїтість серед шести HVR, і H3, зокрема, як вважається, відіграє унікальну роль у забезпеченні високої специфічності антитіл. Дивіться, наприклад, Xu et al., *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson and Wu, in *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). Дійсно верблужі антитіла, що зустрічаються у природі, які складаються тільки з важкого ланцюга, є функціональними й стабільними у відсутності легкого ланцюга (Hamers-Casterman et al., (1993) *Nature* 363:446-448; Sheriff et al., (1996) *Nature Struct. Biol.* 3:733-736).

Використовується ряд способів розмежування HVR, і вони включені в даний документ. Номенклатура Kabat для визначальних комплементарних областей (CDR) заснована на варіабельності послідовності й є найбільш часто використовуваною (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia відноситься до розташування структурних петель (Chothia and Lesk, (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917). Для розмежування HVR на підставі контакту з антигеном див. MacCallum et al. *J. Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996). Номенклатура AbM для HVR являє собою компроміс між Kabat для HVR і Chothia для структурних петель і використовується програмним забезпеченням для моделювання антитіл Oxford Molecular's AbM. Виділення HVR за системою «contact» засновано на аналізі наявних кристалічних структур комплексу. Залишки для кожного з цих HVR наведені нижче.

Петля	Kabat	Ab	Chothia	Contact
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (нумерація Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (нумерація Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

HVR може включати наступні "подовжені HVR": 24-36 або 24-34 (L1), 46-56 або 50-56 (L2) і 89-97 або 89-96 (L3) в VL і 26-35 (H1), 50-65 або 49-65 (H2) і 93-102, 94-102 або 95-102 (H3) у VH. Якщо не зазначено інше, залишки HVR, залишки CDR та інші залишки у варіабельному домені (наприклад, залишки FR) нумеруються в даному документі відповідно до Kabat et al., вище.

Вираз "нумерація залишків варіабельного домену за Kabat" або "нумерація амінокислотних положень за Kabat" і його варіації відносяться до системи нумерації, яка використовується для варіабельних доменів важкого ланцюга або варіабельних доменів легкого ланцюга антитіл в Kabat et al., вище. Якщо використовувати цю систему нумерації, дійсна лінійна амінокислотна послідовність може містити менше амінокислот або може містити додаткові амінокислоти, що відповідають укороченням або вставкам у FR або HVR варіабельного домену. Наприклад, варіабельний домен важкого ланцюга може включати одиничну амінокислотну вставку (залишок 52a відповідно до Kabat) після залишку 52 в H2 і вставлені залишки (наприклад, залишки 82a, 82b і 82c, тощо, відповідно до Kabat) після залишку 82 у FR важкого ланцюга. Нумерація залишків Kabat може бути визначена для даного антитіла шляхом вирівнювання областей гомології послідовності антитіла з "стандартною" пронумерованою за Kabat послідовністю.

"Каркасна область" або "FR" відноситься до залишків варіабельного домену, відмінних від

залишків гіперваріабельної області (HVR). FR варіабельного домену зазвичай складається з чотирьох FR доменів: FR1, FR2, FR3 і FR4. Відповідно, послідовності HVR і FR зазвичай перебувають у наступній послідовності у VH (або VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

“Акцепторна людська каркасна область” для цілей даного документа являє собою каркасну область, що включає амінокислотну послідовність каркасної області варіабельного домену легкого ланцюга (VL) або каркасної області варіабельного домену важкого ланцюга (VH), отриману з каркасної області людського імуноглобуліну або людської консенсусної каркасної області, як визначено нижче. Акцепторна людська каркасна область, “отримана з” каркасної області людського імуноглобуліну або людської консенсусної каркасної області, може включати таку саму амінокислотну послідовність або може включати зміни в амінокислотній послідовності. У деяких варіантах втілення, кількість амінокислотних змін становить 10 або менше, 9 або менше, 8 або менше, 7 або менше, 6 або менше, 5 або менше, 4 або менше, 3 або менше або 2 або менше. У деяких варіантах втілення, акцепторна людська каркасна область VL має послідовність, ідентичну послідовності VL каркасної області людського імуноглобуліну або послідовності людської консенсусної каркасної області.

“Людська консенсусна каркасна область” являє собою каркасну область, яка містить амінокислотні залишки, що найбільш часто зустрічаються, у вибірці послідовностей каркасних областей VL або VH людського імуноглобуліну. Зазвичай, вибір послідовностей VL або VH людського імуноглобуліну здійснюють з підгрупи послідовностей варіабельного домену. Зазвичай, підгрупа послідовностей являє собою підгрупу, як в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. В одному з варіантів втілення, для VL підгрупа являє собою підгрупу каппа I, як в Kabat et al., вище. В одному з варіантів втілення, для VH підгрупа являє собою підгрупу III, як в Kabat et al., вище.

“Афінність” зазвичай відноситься до сили всіх нековалентних взаємодій між одним сайтом сполучення молекули (наприклад, антитіла) і його партнером за сполученням (наприклад, антигеном). Якщо не зазначено інше, використовуваний у даному документі термін “афінність сполучення” відноситься до істинної афінності сполучення, яка відображає взаємодію 1:1 між членами пари, що сполучається (наприклад, антитілом та антигеном). Афінність молекули X відносно свого партнера Y, як правило, може бути представлена у вигляді константи дисоціації (Kd). Афінність може бути виміряна звичайними способами, відомими в даній області техніки, у тому числі, тими способами, які описані в даному документі.

Антитіло з “дозрілою афінністю” відноситься до антитіла з одним або декількома змінами в одній або декількох гіперваріабельних областях (HVR) у порівнянні з вихідним антитілом, що не містить таких змін, де такі зміни призводять до поліпшення афінності антитіла до антигена.

Термін “епітоп” відноситься до конкретного сайту на молекулі антигена, з яким сполучається антитіло.

“Антитіло, що сполучається з тим же самим епітопом”, що й антитіло порівняння, відноситься до антитіла, що блокує сполучення антитіла порівняння з його антигеном у конкурентному аналізі на 50% або більше, і, навпаки, антитіло порівняння блокує сполучення антитіла з його антигеном у конкурентному аналізі на 50% або більше. Приклади конкурентних аналізів передбачені в даному документі.

“Голе антитіло” відноситься до антитіла, що не кон'юговане з гетерологічним фрагментом (наприклад, цитотоксичним фрагментом) або радіоактивною міткою. Голе антитіло може бути представлене в складі фармацевтичної композиції.

“Ефекторні функції” відносяться до тих біологічних активностей, які сполучені з областю Fc антитіла, що варіює залежно від ізотипу антитіла. Приклади ефекторних функцій антитіла включають: сполучення C1q і комплемент-залежну цитотоксичність (CDC); сполучення рецептора Fc; антитілозалежну клітинноопосередковану цитотоксичність (ADCC); фагоцитоз; понижуючу регуляцію рецепторів клітинної поверхні (наприклад, B клітинного рецептору); і активацію B клітин.

“Антитілозалежна клітинноопосередкована цитотоксичність” або ADCC відноситься до форми цитотоксичності, при якій секретовані Ig, що сполучаються з рецепторами Fc (FcR), присутніми на деяких цитотоксичних клітинах (наприклад, природні кілери (NK), нейтрофіли та макрофаги), роблять можливим специфічне сполучення цих цитотоксичних ефекторних клітин із клітиною-мішенню, що несе антиген, і наступне знищення клітини-мішені цитотоксинами. Антитіла “направляють” цитотоксичні клітини та необхідні для знищення цільової клітини за цим механізмом. Первинні клітини, опосередковуючі ADCC, NK клітини, експресують тільки Fc γ (гамма)RIII, тоді як моноцити експресують Fc γ (гамма)RI, Fc γ (гамма)RII і Fc γ (гамма)RIII. Експресія рецепторів Fc на гемопоетичних клітинах підсумована в Таблиці 3 на сторінці 464 в

Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991). Для оцінки активності ADCC молекули, що цікавить, може бути проведений аналіз ADCC *in vitro*, такий як аналіз, описаний в US 5,500, 362 або US 5,821,337. Ефекторні клітини, які використовуються для таких аналізів, включають моноклеарні клітини периферичної крові (PBMC) і природні кілери (NK). Альтернативно або

додатково, активність ADCC молекули, що цікавить, можна оцінити *in vivo*, наприклад, в моделях на тваринах, таких як моделі, розкриті в Clynes et al., PNAS USA 95:652-656 (1998).
 “Фагоцитоз” відноситься до процесу, за допомогою якого патоген поглинається або інтерналізується клітиною-хазяїном (наприклад, макрофагом або нейтрофілом). Фагоцити опосередковують фагоцитоз трьома способами: (i) прямо через рецептори клітинної поверхні (наприклад, лектини, інтегрини та скевенджер-рецептори) (ii) за участю комплементу – рецептори комплементу (у тому числі через CRI, рецептор для C3b, CR3 і CR4) опосередковують сполучення та поглинання патогенів, опсонізованих комплементом, і (iii) за участю антитіл – рецептори Fc (у тому числі FcγγмаR1, FcγγмаR1IA і FcγγмаR1IIA) сприяють сполученню з частинками, опсонізованими антитілами, які далі будуть інтерналізовані та злиті з лізосомами з утворенням фаголізосом. У даному винаході, автори думають, що такий спосіб (iii) відіграє значну роль у доставці терапевтичного агента анти-MRSA AAC в інфіковані лейкоцити, наприклад, нейтрофіли та макрофаги (Phagocytosis of Microbes: complexity in Action by D. Underhill and A. Ozinsky. (2002) Annual Review of Immunology, Vol 20:825).

“Комплемент-залежна цитотоксичність” або “CDC” відноситься до лізису клітини-мішені у присутності комплементу. Активація комплементу за класичним шляхом ініціюється сполученням першого компонента системи комплементу (C1q) з антитілами (відповідного підкласу), які сполучені з їхнім розпізнаним антигеном. Для оцінки активації комплементу може бути проведений аналіз CDC, наприклад, як описано в Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996).

Термін “область Fc” використовується в даному документі для позначення C-кінцевої області важкого ланцюга імуноглобуліну. Термін включає нативну послідовність області Fc і варіанти області Fc. Незважаючи на те, що границі області Fc важкого ланцюга імуноглобуліну можуть варіювати, область Fc важкого ланцюга людського IgG зазвичай визначають від амінокислотного залишку в положенні Cys226 або від Pro230 до карбоксильного кінця IgG. C-кінцевий лізин (залишок 447 відповідно до системи нумерацією EU, також називаної EU індекс, як описано в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991) області Fc може бути вилучений, наприклад, у процесі одержання або очищення антитіла, або при використанні рекомбінантної нуклеїнової кислоти, що кодує важкий ланцюг антитіла. Відповідно, склад інтактного антитіла може включати популяцію антитіл, у якій вилучені всі залишки K447, популяцію антитіл, у якій не вилучені залишки K447, і популяцію антитіл, що має суміш антитіл з вилученими й невилученими залишками K447. Термін “рецептор Fc” або “Fc” також включає неонатальний рецептор, FcRn, що відповідає за перенос материнських IgG до плоду. Guyer et al., J. Immunol. 117: 587 (1976) і Kim et al., J. Immunol. 24: 249 (1994). Способи вимірювання сполучення з FcRn відомі в рівні техніки (дивіться, наприклад, Ghetie and Ward, Immunol. Today 18: (12): 592-8 (1997); Ghetie et al., Nature Biotechnology 15 (7): 637-40 (1997); Hinton et al., J. Biol. Chem. 279(8): 6213-6 (2004); WO 2004/92219 (Hinton et al.). Сполучення з FcRn *in vivo* і період напівжиття в сироватці людських поліпептидів, що сполучаються з FcRn з високою афінністю, можна оцінити, наприклад, у трансгенних мишах або трансфікованих лініях людських клітин, експресуючих людський FcRn, або у приматах, яким вводять поліпептиди, що мають варіант області Fc. У WO 2004/42072 (Presta) описані варіанти антитіл з поліпшенням або зниженням сполученням з Fc. Дивіться також, наприклад, Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001).

Може бути змінений вуглевод, приєднаний до області Fc. Нативні антитіла, продуковані клітинами ссавців, як правило, включають розгалужені, двухантенні олігосахариди, які зазвичай прикріплюються через N-зв'язок до Asn297 домену CH2 області Fc. Дивіться, наприклад, Wright et al. (1997) TIBTECH 15:26-32. Олігосахариди можуть включати різні вуглеводи, наприклад, манозу, N-ацетилглюкозамін (GlcNAc), галактозу та сіалову кислоту, а також фруктозу, приєднану до GlcNAc в “стовбурі” двухантенної олігосахаридної структури. У деяких варіантах втілення, для створення IgG з деякими додатковими поліпшеними властивостями в IgG може бути модифікований олігосахарид. Наприклад, передбачені модифіковані антитіла, що мають вуглеводну структуру без фукози, приєднаної (прямо або не прямо) до області Fc. Такі модифікації можуть призводити до поліпшеної функції ADCC. Дивіться, наприклад, US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Приклади опублікованих патентів, пов'язаних із “дефукозилованими” або “дефіцитними за фукозою” модифікаціями антитіл включають: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US

2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al., J. Mol. Biol. 336: 1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Приклади ліній клітин, здатних продукувати дефукозилізовані антитіла, включають клітини Lee 13 CHO, дефіцитні за фукозилуванням білків (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); опублікована заявка на патент США номер 2003/0157108 Al, Presta, L; i WO 2004/056312 Al, Adams et al., особливо у Прикладі 11), і нокаутів ліній клітин, такі як клітини CHO з нокаутом у гені альфа-1,6-фукозилтрансферази, FUT8 (дивіться, наприклад, Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al, Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); i WO2003/085107).

“Виділене антитіло” являє собою антитіло, відділене від компонента його природного середовища. У деяких варіантах втілення, антитіло очищене до чистоти більше ніж 95% або 99%, де чистота визначена, наприклад, електрофоретично (наприклад, SDS-PAGE, ізоелектрофокусування (IEF), капілярний електрофорез) або хроматографічно (наприклад, іонообмінна або звернено-фазова ВЕРХ). Огляд способів оцінки чистоти антитіла дивіться, наприклад, у Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007).

“Виділена нуклеїнова кислота” відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, що була відділена від компонента її природного середовища. Виділена нуклеїнова кислота включає молекулу нуклеїнової кислоти, що міститься в клітинах, які зазвичай містять молекулу нуклеїнової кислоти, але молекула нуклеїнової кислоти присутня екстрахромосомно або розташована на хромосомі в іншому місці, що відрізняється від її природного розташування на хромосомі.

“Виділена нуклеїнова кислота, що кодує анти-WTA бета антитіло” відноситься до однієї або декількох молекул нуклеїнових кислот, що кодують важкий та легкий ланцюги антитіла, при цьому така молекула нуклеїнової кислоти (молекули нуклеїнових кислот) може бути присутньою в одному векторі або в окремих векторах, і така молекула нуклеїнової кислоти (молекули нуклеїнових кислот) може бути присутньою в одному або декількох місцях у клітині-хазяїні.

Використовуваний у даному документі термін “специфічно сполучається з” або “специфічний до” відноситься до вимірюваних і відтворених взаємодій, таких як сполучення між мішенню й антитілом, що є показником присутності мішені у присутності гетерогенної популяції молекул, включаючи біологічні молекули. Наприклад, антитіло, що специфічно сполучається з мішенню (яка може бути епітопом), являє собою антитіло, що сполучається з цією мішенню з більшою афінністю, авідністю, легше й/або триваліше, ніж з іншими мішенями. В одному з варіантів втілення, ступінь сполучення антитіла з молекулою, що не відноситься до WTA-бета, становить приблизно менше ніж 10% від сполучення антитіла з мішенню, де сполучення вимірюють, наприклад, за допомогою радіоімуннологічного аналізу (RIA). У деяких варіантах втілення, антитіло, що специфічно сполучається з WTA бета, має константу дисоціації (Kd), що становить ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ або $\leq 0,1$ нМ. У деяких варіантах втілення, антитіло специфічно зв’язується з епітопом, що є консервативним між різними видами. В іншому варіанті втілення, специфічне зв’язування необов’язково може включати виняткове зв’язування.

“Афінність сполучення” зазвичай відноситься до сили всіх нековалентних взаємодій між однією ділянкою сполучення молекули (наприклад, антитіла) і його партнером за сполученням (наприклад, антигеном). Якщо не зазначено інше, використовуваний у даному документі термін “афінність сполучення” відноситься до істинної афінності сполучення, яка відображає взаємодію 1:1 між членами пари, що сполучається (наприклад, антитілом й антигеном). Афінність молекули X до свого партнера Y зазвичай може бути представлена у вигляді константи дисоціації (Kd). Афінність можна виміряти звичайними способами, відомими в даній області техніки, у тому числі, тими способами, які описані в даному документі. Низькоафінні антитіла зазвичай сполучаються з антигеном повільно й, як правило, легко дисоціюють, у той час як високоафінні антитіла зазвичай сполучаються з антигеном швидше й, як правило, залишаються сполученими довше. У даній області техніки відомі різні способи вимірювання афінності сполучення, кожний з яких може бути використаний для цілей даного винаходу. Певні наведені як приклад варіанти втілення для вимірювання афінності сполучення описані нижче.

В одному з варіантів втілення “Kd” або “значення Kd” відповідно до цього винаходу вимірюють за допомогою аналізу сполучення радіоактивно міченого антигена (RIA), що проводять з використанням Fab варіанта антитіла, що цікавить, і його антигена, як описано в нижченаведеному аналізі. Афінність сполучення Fab з антигеном у розчині вимірюють, приводячи Fab у рівновагу з мінімальною концентрацією (125 I)-міченого антигена у присутності титраційних серій неміченого антигена, далі захоплюючи зв’язаний антиген на планшеті, покритим анти-Fab антитілом (дивіться, наприклад, Chen et al., (1999) J. Mol. Biol. 293:865-881).

Щоб підібрати умови для аналізу, мікротитраційні планшети (DYNEX Technologies, Inc.) покривають протягом ночі 5 мкг/мл сполучного анти-Fab антитіла (Cappel Labs) в 50 мМ карбонату натрію (рН 9,6), і далі блокують 2% (вага/об'єм) бичачого сироваткового альбуміну в PBS протягом двох-п'яти годин при кімнатній температурі (приблизно 23 °C). У неабсорбуючому планшеті (Nunc #269620), 100 пМ або 26 пМ [¹²⁵I]-антигена змішують з серійними розведеннями досліджуваного Fab (наприклад, відповідно до оцінки для анти-VEGF антитіла, Fab-12, у Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)). Досліджуваний Fab далі інкубують протягом ночі; але інкубацію можна здійснювати протягом більш тривалого періоду часу (наприклад, приблизно 65 годин), щоб гарантувати, що рівновага досягнута. Після цього суміші переносять у планшет для сполучення й інкубують при кімнатній температурі (наприклад, протягом однієї години). Розчин потім видаляють, і планшет промивають вісім разів 0,1% розчином сурфактанту TWEEN-20TM у PBS. Після висихання планшетів додають 150 мкл/ямку сцинтилятора (MICROSCINT-20TM, Packard) і планшети аналізують за допомогою лічильника гамма-випромінювання TOPCOUNTTM (Packard) протягом 10 хвилин. Концентрації кожного Fab, які дають 20% або менше від максимального сполучення, вибирають для використання в конкурентних аналізах сполучення.

Відповідно до іншого варіанта втілення, K_d вимірюють за допомогою аналізу поверхневого плазмонного резонансу, використовуючи прилад BIACORE[®]-2000 або BIACORE[®]-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) при 25 °C з антигеном, іммобілізованим на чипах CM5 при ~10 одиницях відповіді (RU). Коротко, карбоксиметиловані декстранові чипи для біосенсору (CM5, BIAcore Inc.) активують N-етил-N-(3-диметиламінопропіл)-карбодіїмід гідрохлоридом (EDC) і N-гідроксисукцинімідом (NHS) відповідно до інструкцій виробника. Антиген розбавляють в 10 мМ ацетаті натрію, рН 4,8, до концентрації 5 мкг/мл (~0,2 мМ) і далі здійснюють введення розчину при швидкості потоку 5 мкл/хвилину для досягнення приблизно 10 одиниць відповіді (RU) сполученого білка. Після введення розчину антигена пропускають 1 М розчин етаноламіну для блокування непрореагованих груп. Для вимірювання кінетики пропускають серійні дворазові розведення Fab (від 0,78 нМ до 500 нМ) у PBS з 0,05% сурфактанту TWEEN 20TM (PBST) при 25 °C і швидкості потоку приблизно 25 мкл/хв. Швидкості асоціації (k_{on}) і швидкості дисоціації (k_{off}) розраховують, використовуючи просту модель сполучення Ленгмюра «один-до-одного» (BIAcore[®] Evaluation Software version 3.2), одночасно проводячи апроксимацію сенсограми асоціації та дисоціації. Рівноважну константу дисоціації (K_d) розраховують як співвідношення k_{off}/k_{on}. Дивіться, наприклад, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Якщо за даними аналізу поверхневого плазмонного резонансу, описаного вище, швидкість асоціації перевищує 10⁶ М⁻¹ сек⁻¹, то швидкість асоціації можна визначити, використовуючи метод гасіння флуоресценції, в якому вимірюють збільшення або зменшення інтенсивності випущення (емісії) флуоресценції (екстинкція = 295 нм; емісія = 340 нм, смуга пропускання 16 нм) при 25 °C для 20 нМ розчину антитіла проти антигена (Fab форма) у PBS з рН 7,2 у присутності зростаючих концентрацій антигена, де вимірювання проводять у спектрофотометрі, такому як спектрофотометр із зупинкою потоку (Aviv Instruments) або спектрофотометр серії 8000 SLM-AMINCOTM (ThermoSpectronic) з кюветою з перемішуванням.

“Швидкість асоціації” або “k_{on}” відповідно до цього винаходу також може бути визначена, як описано вище, з використанням систем BIACORE[®]-2000 або BIACORE[®]-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

Терміни “клітина-хазяїн”, “лінія клітин-хазяїнів” і “культура клітин-хазяїнів” використовуються взаємозамінно та відносяться до клітин, у які була введена екзогенна нуклеїнова кислота, включаючи нащадків таких клітин. Клітини-хазяїни включають “трансформантів” і “трансформовані клітини”, які включають первинну трансформовану клітину та її нащадків, незалежно від числа пасажів. Послідовність нуклеїнової кислоти нащадків може бути не повністю ідентичною нуклеїновій кислоті вихідної клітини, а може містити мутації. Мутантні нащадки, що мають ті самі функції або біологічну активність, на які вироблявся скринінг або за якими були вибрані вихідні трансформовані клітини, включені в це визначення.

Використовуваний у даному документі термін “вектор” відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, здатної відтворювати іншу нуклеїнову кислоту, з якою вона сполучена. Термін включає вектор як самореплікуючу структуру нуклеїнової кислоти, а також вектор, вбудований у геном клітини-хазяїна, в яку він був введений. Деякі вектори здатні регулювати експресію нуклеїнових кислот, з якими вони функціонально сполучені. Такі вектори називаються в даному документі “експресуючими векторами”.

“Відсоток (%) ідентичності амінокислотних послідовностей” щодо послідовності поліпептиду порівняння визначають як відсоток амінокислотних залишків у послідовності, що цікавить, ідентичних амінокислотним залишкам у послідовності поліпептиду порівняння, після вирівнювання послідовностей і введення розривів, якщо це необхідно, щоб досягти

максимального відсотка ідентичності послідовностей, і без урахування будь-яких консервативних заміन як частини ідентичності послідовностей. Вирівнювання з метою визначення відсотка ідентичності послідовностей можна здійснити різними способами, що перебуває в межах компетентності фахівця в даній області техніки, наприклад, використовуючи загальнодоступне програмне забезпечення, таке як BLAST, BLAST-2, ALIGN або Megalign (DNASTAR). Фахівці в даній області техніки можуть визначити параметри для вирівнювання послідовностей, включаючи будь-які алгоритми, необхідні для досягнення максимального вирівнювання за всією довжиною порівнюваних послідовностей. Для цілей даного документа, проте, значення % ідентичності амінокислотних послідовностей одержують, використовуючи комп'ютерну програму для порівняння послідовностей ALIGN-2. Комп'ютерна програма для порівняння послідовностей ALIGN-2 розроблена Genentech, Inc., і її програмний код був поданий з документацією користувача у Бюро реєстрації авторських прав США, Washington D.C., 20559, де був зареєстрований під реєстраційним номером TXU510087. Програма ALIGN-2 є загальнодоступною від Genentech, Inc., South San Francisco, California, або може бути скопійована з програмного коду. Програма ALIGN-2 повинна бути встановлена для користування на операційну систему UNIX, у тому числі, цифрову UNIX V4.0D. Всі параметри порівняння послідовностей встановлюються програмою ALIGN-2 і не змінюються.

У випадках, коли ALIGN-2 використовується для порівняння амінокислотних послідовностей, % ідентичності амінокислотних послідовностей даної амінокислотної послідовності А щодо амінокислотної послідовності В, у порівнянні з амінокислотною послідовністю В або проти даної амінокислотної послідовності В (альтернативно можна сформулювати так: дана амінокислотна послідовність А, що має або володіє деяким % ідентичності амінокислотної послідовності щодо амінокислотної послідовності В, у порівнянні з амінокислотною послідовністю В або проти даної амінокислотної послідовності В) розраховується в такий спосіб: 100 помножити на відношення Х/У, де Х являє собою кількість амінокислотних залишків, визначених програмою для вирівнювання ALIGN-2 як ідентичні збіги при вирівнюванні А і В, і де У являє собою загальну кількість амінокислотних залишків у В. Варто враховувати, що якщо довжина амінокислотної послідовності А не збігається з довжиною амінокислотної послідовності В, то % ідентичності амінокислотних послідовностей А і В не буде збігатися з % ідентичності амінокислотних послідовностей В і А. Якщо спеціально не зазначено інше, всі значення % ідентичності амінокислотних послідовностей, наведені в даному документі, отримані, як описано вище.

Термін "антибіотик типу рифаміцину" означає клас або групу антибіотиків, що мають структуру, аналогічну структурі рифаміцину.

Термін "антибіотик типу рифалазилу" означає клас або групу антибіотиків, що мають структуру, аналогічну структурі рифалазилу.

Коли зазначена кількість замісників, термін "один або декілька" відноситься до діапазону від одного замісника до максимально можливого числа замісників, тобто до заміни одного водню й так далі до заміни всіх воднів на замісники. Термін "замісник" означає атом або групу атомів, що заміщають атом водню у вихідній молекулі. Термін "заміщений" означає, що зазначена група має один або декілька замісників. Якщо яка-небудь група може мати декілька замісників, і передбачені різноманітні можливі замісники, то замісники вибрані незалежно й необов'язково повинні бути однаковими. Термін "незаміщений" означає, що зазначена група не має замісників. Термін "необов'язково заміщений" означає, що зазначена група не замінена або замінена одним або декількома замісниками, незалежно вибраними з групи можливих замісників. Коли зазначена кількість замісників, термін "один або декілька" означає від одного замісника до максимально можливого числа замісників, тобто заміну одного водню й так далі до заміни всіх воднів на замісники.

Використовуваний у даному документі термін "алкіл" відноситься до насиченого моновалентного вуглеводневого радикалу з лінійним або розгалуженим ланцюгом, що включає від одного до дванадцяти атомів вуглецю (C_1 - C_{12}), де алкільний радикал може бути необов'язково незалежно замінений одним або декількома замісниками, описаними нижче. В іншому варіанті втілення, алкільний радикал включає від одного до восьми атомів вуглецю (C_1 - C_8) або від одного до шести атомів вуглецю (C_1 - C_6). Приклади алкільних груп включають, але не обмежуються ними, метил (Me , $-CH_3$), етил (Et , $-CH_2CH_3$), 1-пропіл (n -Pr, n -пропіл, $-CH_2CH_2CH_3$), 2-пропіл (i -Pr, $ізопропіл$, $-CH(CH_3)_2$), 1-бутил (n -Bu, n -бутил, $-CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-метил-1-пропіл (i -Bu, $ізобутил$, $-CH_2CH(CH_3)_2$), 2-бутил (s -Bu, $втор$ -бутил, $-CH(CH_3)CH_2CH_3$), 2-метил-2-бутил (t -Bu, $трет$ -бутил, $-C(CH_3)_3$), 1-пентил (n -пентил, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-пентил ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$), 3-пентил ($-CH(CH_2CH_3)_2$), 2-метил-2-бутил ($-C(CH_3)_2CH_2CH_3$), 3-метил-2-бутил ($-CH(CH_3)CH(CH_3)_2$), 3-метил-1-бутил ($-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$), 2-метил-1-бутил ($-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$), 1-гексил ($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-гексил ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$), 3-

гексил ($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3)$), 2-метил-2-пентил ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3-метил-2-пентил ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$), 4-метил-2-пентил ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3-метил-3-пентил ($-\text{C}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$), 2-метил-3-пентил ($-\text{CH}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2,3-диметил-2-бутил ($-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3,3-диметил-2-бутил ($-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1-гептил, 1-октил і тому подібне.

Використовуваний у даному документі термін “алкілен” відноситься до насиченого бівалентного вуглеводневого радикалу з лінійним або розгалуженим ланцюгом, що включає від одного до дванадцяти атомів вуглецю ($\text{C}_1\text{-C}_{12}$), де алкіленовий радикал може бути необов'язково незалежно заміщений одним або декількома замісниками, описаними нижче. В іншому варіанті втілення, алкіленовий радикал включає від одного до восьми атомів вуглецю ($\text{C}_1\text{-C}_8$) або від одного до шести атомів вуглецю ($\text{C}_1\text{-C}_6$). Приклади алкіленових груп включають, але не обмежуються ними, метилен ($-\text{CH}_2-$), етилен ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), пропілен ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$) і тому подібне.

Термін “алкеніл” відноситься до моновалентного вуглеводневого радикалу з лінійним або розгалуженим ланцюгом, що включає від двох до восьми атомів вуглецю ($\text{C}_2\text{-C}_8$) і, щонайменше, один ненасичений сайт, тобто sp^2 подвійний зв'язок вуглець-вуглець, де алкеніловий радикал може бути необов'язково незалежно заміщений одним або декількома замісниками, описаними нижче, і включає радикали, що мають “цис” і “транс” орієнтацію, або альтернативно, “E” і “Z” орієнтації. Приклади включають, але не обмежуються ними, етиленіл або вініл ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), аліл ($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$) і тому подібне.

Термін “алкенілен” відноситься до бівалентного вуглеводневого радикалу з лінійним або розгалуженим ланцюгом, що включає від двох до восьми атомів вуглецю ($\text{C}_2\text{-C}_8$) і, щонайменше, один ненасичений сайт, тобто sp^2 подвійний зв'язок вуглець-вуглець, де алкеніленовий радикал може бути необов'язково незалежно заміщений одним або декількома замісниками, описаними нижче, і включає радикали, що мають “цис” і “транс” орієнтацію, або альтернативно, “E” і “Z” орієнтації. Приклади включають, але не обмежуються ними, етиленілен або вінілен ($-\text{CH}=\text{CH}-$), алілен ($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-$), і тому подібне.

Термін “алкініл” відноситься до моновалентного вуглеводневого радикалу з лінійним або розгалуженим ланцюгом, що включає від двох до восьми атомів вуглецю ($\text{C}_2\text{-C}_8$) і, щонайменше, один ненасичений сайт, тобто sp потрійний зв'язок вуглець-вуглець, де алкініловий радикал може бути необов'язково незалежно заміщений одним або декількома замісниками, описаними нижче. Приклади включають, але не обмежуються ними, етиніл ($-\text{C}\equiv\text{CH}$), пропініл (пропаргіл, $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$), і тому подібне.

Термін “алкінілен” відноситься до моновалентного вуглеводневого радикалу з лінійним або розгалуженим ланцюгом, що включає від двох до восьми атомів вуглецю ($\text{C}_2\text{-C}_8$) і, щонайменше, один ненасичений сайт, тобто sp потрійний зв'язок вуглець-вуглець, де алкініленовий радикал може бути необов'язково незалежно заміщений одним або декількома замісниками, описаними нижче. Приклади включають, але не обмежуються ними, етинілен ($-\text{C}\equiv\text{C}-$), пропінілен (пропаргілен, $-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$), і тому подібне.

Терміни “карбоцикл”, “карбоцикліл”, “карбоциклічне кільце” та “циклоалкіл” відносяться до моновалентного, неароматичного, насиченого або частково ненасиченого кільця, що має від 3 до 12 атомів вуглецю ($\text{C}_3\text{-C}_{12}$) у випадку моноциклічного кільця або від 7 до 12 атомів вуглецю у випадку біциклічного кільця. Біциклічні карбоцикли, що мають від 7 до 12 атомів, можуть бути організовані, наприклад, у біциклічні [4.5], [5.5], [5.6] або [6.6] системи, і біциклічні карбоцикли, що мають 9 або 10 атомів, можуть бути організовані у біциклічні [5.6] або [6.6] системи, або системи з мостиковим зв'язком, такі як біцикло[2.2.1]гептан, біцикло[2.2.2]октан і біцикло[3.2.2]нонан. Спірозчленовані фрагменти також охоплюються цим визначенням. Приклади моноциклічних карбоциклів включають, але не обмежуються ними, циклопропіл, циклобутил, циклопентил, 1-циклопент-1-еніл, 1-циклопент-2-еніл, 1-циклопент-3-еніл, циклогексил, 1-циклогекс-1-еніл, 1-циклогекс-2-еніл, 1-циклогекс-3-еніл, циклогексادیєніл, циклогептил, циклооктил, циклононіл, циклодецил, циклоундецил, циклододецил і тому подібне. Карбоциклічні групи можуть бути необов'язково та незалежно заміщені одним або декількома замісниками, описаними в даному документі.

“Арил” означає моновалентний ароматичний вуглеводневий радикал, що включає 6-20 атомів вуглецю ($\text{C}_6\text{-C}_{20}$), отриманий за рахунок видалення одного атома водню від одного атома вуглецю вихідної ароматичної кільцевої системи. Деякі арильні групи позначені в структурах, наведених як приклад, як “Ar”. Арил включає біциклічні радикали, що включають ароматичне кільце, конденсоване з насиченим, частково ненасиченим кільцем або ароматичним карбоциклічним кільцем. Звичайні арильні групи включають, але не обмежуються ними, радикали, отримані з бензолу (феніл), заміщених бензолів, нафталіну, антрацену, біфенілу, інданілу, інданілу, 1,2-дигідронафталіну, 1,2,3,4-тетрагідронафтилу та тому подібного. Арильні

групи необов'язково та незалежно заміщені одним або декількома замісниками, описаними в даному документі.

“Арилен” означає бівалентний ароматичний вуглеводневий радикал, що включає 6-20 атомів вуглецю (C_6-C_{20}), отриманий за рахунок видалення двох атомів водню від двох атомів вуглецю вихідної ароматичної кільцевої системи. Деякі ариленові групи позначені в структурах, наведених як приклад, як “Ar”. Арилен включає біциклічні радикали, що включають ароматичне кільце, конденсоване з насиченим, частково ненасиченим кільцем або ароматичним карбоциклічним кільцем. Звичайні ариленові групи включають, але не обмежуються ними, радикали, отримані з бензолу (фенілен), заміщених бензолів, нафталіну, антрацену, біфенілену, інданілену, інданілену, 1,2-дигідронафталіну, 1,2,3,4-тетрагідронафтилу та тому подібного. Ариленові групи необов'язково та незалежно заміщені одним або декількома замісниками, описаними в даному документі.

Терміни “гетероцикл”, “гетероциклічний кільце” і “гетероциклічне кільце” використовуються в даному документі взаємозамінно та відносяться до насиченого або частково ненасиченого (тобто має одну або декілька подвійних і/або потрійних зв'язків у кільці) карбоциклічного радикалу, що включає від 3 до приблизно 20 атомів у кільці, де, щонайменше, один атом кільця являє собою гетероатом, вибраний з азоту, кисню, фосфору та сірки, а атоми кільця, що залишились, являють собою С, де один або декілька атомів кільця необов'язково та незалежно заміщені одним або декількома замісниками, описаними нижче. Гетероцикл може являти собою моноцикл, що має від 3 до 7 членів у кільці (від 2 до 6 атомів вуглецю та від 1 до 4 гетероатомів, вибраних із N, O, P і S) або біцикл, що має від 7 до 10 членів у кільці (від 4 до 9 атомів вуглецю та від 1 до 6 гетероатомів, вибраних із N, O, P і S), наприклад, гетероцикл може являти собою біциклічну [4.5], [5.5], [5.6] або [6.6] систему. Гетероцикли описані у Paquette, Leo A.; “Principles of Modern Heterocyclic Chemistry” (W.A. Benjamin, New York, 1968), зокрема, у главах 1, 3, 4, 6, 7 і 9; “The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs” (John Wiley & Sons, New York, 1950 дотепер), зокрема, у томах 13, 14, 16, 19 і 28; і J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566. “Гетероциклічний” також включає радикали, в яких гетероциклічні радикали конденсовані з насиченим, частково ненасиченим або ароматичним карбоциклічним або гетероциклічним кільцем. Приклади гетероциклічних кілець включають, але не обмежуються ними, морфолін-4-іл, піперидин-1-іл, піперазиніл, піперазин-4-іл-2-он, піперазин-4-іл-3-он, піролідин-1-іл, тіоморфолін-4-іл, S-діоксотіоморфолін-4-іл, азокан-1-іл, азетидин-1-іл, октагідропіrido[1,2-a]піразин-2-іл, [1,4]діазепан-1-іл, піролідиніл, тетрагідрофураніл, дигідрофураніл, тетрагідротієніл, тетрагідропіраніл, дигідропіраніл, тетрагідротіопіраніл, піперидино, морфоліно, тіоморфоліно, тіоксаніл, піперазиніл, гомопіперазиніл, азетидиніл, оксетаніл, тіетаніл, гомопіперидиніл, оксепаніл, тієпаніл, оксазепаніл, діазепаніл, тіазепаніл, 2-піролініл, 3-піролініл, індолініл, 2H-піраніл, 4H-піраніл, діоксаніл, 1,3-діоксоланіл, піразолініл, дитіаніл, дитіоланіл, дигідропіраніл, дигідротієніл, дигідрофураніл, піразолідинілімідазолініл, імідазолідиніл, 3-азабіцикло[3.1.0]гексаніл, 3-азабіцикло[4.1.0]гептаніл, азабіцикло[2.2.2]гексаніл, 3H-індоліл хінолізиніл і N-піридил сечовини. Спірозчленовані фрагменти також охоплюються цим визначенням. Прикладами гетероциклічної групи, де 2 атоми кільця заміщені оксо (=O) фрагментами, є піримідиноніл і 1,1-діоксо-тіоморфолініл. Гетероциклічні групи в даному документі необов'язково та незалежно заміщені одним або декількома замісниками, описаними в даному документі.

Термін “гетероарил” відноситься до моновалентного ароматичного радикалу, що включає 5-, 6- або 7-членні кільця, і включає системи конденсованих кілець (щонайменше, одне з яких є ароматичною), що складаються з 5-20 атомів, які містять один або декілька гетероатомів, незалежно вибраних із азоту, кисню та сірки. Прикладами гетероарильних груп є піридиніл (у тому числі, наприклад, 2-гідроксипіридиніл), імідазоліл, імідазопіридиніл, піримідиніл (у тому числі, наприклад, 4-гідроксипіримідиніл), піразоліл, триазоліл, піразиніл, тетразоліл, фурил, тієніл, ізоксазоліл, тіазоліл, оксадіазоліл, оксазоліл, ізотіазоліл, піроліл, хінолініл, ізохінолініл, тетрагідроізохінолініл, індоліл, бензімідазоліл, бензофураніл, цинолініл, індазоліл, індолізиніл, фталазиніл, піридазиніл, триазиніл, ізоіндоліл, птеридиніл, пуриніл, оксадіазоліл, триазоліл, тіадиазоліл, тіадиазоліл, фуразаніл, бензофуразаніл, бензотіофеніл, бензотіазоліл, бензоксазоліл, хіназолініл, хіноксалініл, нафтиридиніл і фуropyридиніл. Гетероарильні групи необов'язково та незалежно заміщені одним або декількома замісниками, описаними в даному документі.

Гетероциклічні або гетероарильні групи можуть бути зв'язані через вуглець (вуглець-зв'язані) або азот (азот-зв'язані), де це можливо. Винятково для прикладу й не для обмежень, гетероцикли або гетероарили зв'язані через вуглець у положенні 2, 3, 4, 5 або 6 піридину, у положенні 3, 4, 5 або 6 піридазину, у положенні 2, 4, 5 або 6 піримідину, у положенні 2, 3, 5 або

6 піразину, у положенні 2, 3, 4 або 5 фурану, тетрагідрофурану, тіофурану, тіофену, піролу або тетрагідропіролу, у положенні 2, 4 або 5 оксазолу, імідазолу або тіазолу, у положенні 3, 4 або 5 ізоксазолу, піразолу або ізотіазолу, у положенні 2 або 3 азиридину, у положенні 2, 3 або 4 азетидину, у положенні 2, 3, 4, 5, 6, 7 або 8 хіноліну або у положенні 1, 3, 4, 5, 6, 7 або 8 ізохіноліну.

Винятково для прикладу й не для обмежень, гетероцикли або гетероарили зв'язані через азот у положенні 1 азиридину, азетидину, піролу, піролідину, 2-піроліну, 3-піроліну, імідазолу, імідазолідину, 2-імідазоліну, 3-імідазоліну, піразолу, піразоліну, 2-піразоліну, 3-піразоліну, піперидину, піперазину, індолу, індоліну, 1Н-індазолу, у положенні 2 ізоіндолу або ізоіндоліну, у положенні 4 морфоліну, а також у положенні 9 карбазолу або β-карболіну.

“Метаболіт” являє собою продукт конкретної сполуки або її солі, утворений у процесі метаболізму в організмі. Метаболіти сполуки можуть бути ідентифіковані з використанням стандартних способів, відомих у даній області техніки, та їхня активність може бути визначена з використанням тестів, таких як тести, описані в даному документі. Такі продукти можуть бути результатом, наприклад, окислювання, відновлення, гідролізу, амідування, деамідування, етерифікації, деетерифікації, ферментативного розщеплення та подібного перетворення введеної сполуки. Відповідно, даний винахід включає метаболіти сполук згідно з даним винаходом, у тому числі, сполук, утворених у процесі контакту сполуки, що відповідає формулі I цього винаходу, з ссавцем протягом періоду часу, достатнього для утворення його метаболічного продукту.

Термін “фармацевтична лікарська форма” відноситься до препарату в такій формі, яка забезпечує ефективну біологічну активність активного інгредієнту, що міститься в ньому, і який не містить додаткових компонентів, що є неприйнятно токсичними для суб'єкта, якому вводять цю лікарську форму.

“Стерильна” лікарська форма є асептичною або вільною від всіх живих мікроорганізмів та їхніх спор.

“Стабільна” лікарська форма являє собою лікарську форму, в якій білок по суті зберігає свою фізичну й хімічну стабільність і цілісність при зберіганні. У даній області техніки доступні різні аналітичні методи для вимірювання стабільності білка, і їхній огляд наведений у Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York, Pubs. (1991) і Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). Стабільність може бути виміряна при вибраній температурі протягом вибраного періоду часу. Для швидкого скринінгу лікарську форму можна тримати при 40 °C протягом 2 тижнів - 1 місяця, після чого вимірюють стабільність. Якщо лікарська форма передбачає зберігання при 2-8 °C, зазвичай лікарська форма буде стабільною при 30 °C або 40 °C протягом, щонайменше, 1 місяця та/або буде стабільною при 2-8 °C протягом, щонайменше, 2 років. Якщо лікарська форма передбачає зберігання при 30 °C, зазвичай лікарська форма буде стабільною протягом, щонайменше, 2 років при 30 °C і/або буде стабільною при 40 °C протягом, щонайменше, 6 місяців. Наприклад, ступінь агрегації у процесі зберігання може бути використана як показник стабільності білка. Таким чином, “стабільна” лікарська форма може являти собою лікарську форму, в якій менше ніж приблизно 10% й, переважніше, менше ніж приблизно 5% білка присутня у вигляді агрегату. В інших варіантах втілення може бути визначене будь-яке збільшення агрегації у процесі зберігання лікарської форми.

“Ізотонічна” лікарська форма являє собою таку лікарську форму, що по суті має такий самий осмотичний тиск, як людська кров. Ізотонічна лікарська форма буде зазвичай мати осмотичний тиск, що становить від приблизно 250 до 350 мОсм. Термін “гіпотонічний” описує лікарську форму з осмотичним тиском нижче, ніж у людській крові. Відповідно, термін “гіпертонічний” використовується для опису лікарської форми з осмотичним тиском вище, ніж у людській крові. Ізотонічність може бути виміряна з використанням, наприклад, осмометра парового тиску або кріоскопічного осмометра. Лікарські форми даного винаходу є гіпертонічними в результаті додавання солі й/або буфера.

Використовувані в даному документі “носії” включають фармацевтично прийнятні носії, ексципієнти або стабілізатори, які є нетоксичними для клітини або ссавця, що піддають їхньому впливу, у використовуваних дозах і концентраціях. Часто фізіологічно прийнятний носій являє собою водний рН-буферний розчин. Приклади фізіологічно прийнятних носіїв включають буфери, такі як фосфатний буфер, цитратний буфер і буфери на основі інших органічних кислот; антиоксиданти, у тому числі аскорбінову кислоту; низькомолекулярні (приблизно менше 10 залишків) поліпептиди; білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глутамін, аспарагін, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди та інші вуглеводи, у тому числі глюкозу, манозу,

або декстрини; хелатуючі агенти, такі як ЕДТА; цукрові спирти, такі як маніт або сорбіт; солеутворюючі протиіони, такі як натрій; і/або неіонні сурфактанти, такі як TWEEN®, поліетиленгліколь (PEG) і PLURONICS™.

“Фармацевтично прийнятний носій” відноситься до інгредієнта у фармацевтичній композиції, відмінного від активного інгредієнта, що є нетоксичним для суб'єкта. Фармацевтично прийнятний носій включає, але не обмежується ними, буфер, ексципієнт, стабілізатор або консервант. “Фармацевтично прийнятна кислота” включає неорганічні й органічні кислоти, що є нетоксичними у використуванні у лікарській формі концентрації та формі. Наприклад, підходящі неорганічні кислоти включають соляну кислоту, хлорну кислоту, бромистоводневу кислоту, йодистоводневу кислоту, азотну кислоту, сірчану кислоту, сульфонову кислоту, сульфіннову кислоту, сульфанілову кислоту, фосфорну кислоту, вугільну кислоту та тому подібні кислоти. Підходящі органічні кислоти включають нерозгалужені та розгалужені алкільні, ароматичні, циклічні, циклоаліфатичні, арилаліфатичні, гетероциклічні, насичені, ненасичені, моно-, ди- і три-карбоциклічні кислоти, у тому числі, наприклад, мурашину, оцтову, 2-гліколеву, трифтороцтову, фенілоцтову, триметилоцтову, трет-бутилоцтову, антранілову, пропанову, 2-оксипропанову, 2-оксопропанову, пропандіову, циклопентанпропіонову, циклопентанпропіонову, 3-фенілпропіонову, бутанову, бутандіову, бензойну, 3-(4-гідроксибензоїл)бензойну, 2-ацетоксибензойну, аскорбінову, коричну, лаурилсірчану, стеаринову, муконову, мигдальну, бурштинову, ембонову, фумарову, яблучну, малеїнову, гідроксималеїнову, малонову, молочну, лимонну, винну, гліколеву, глюконову, піровиноградну, гліоксалеvu, щавлеву, метансульфонову, бурштинову, саліцилову, фталеву, пальмітинову, пальмітолеїнову, пальмову, пальмітинову, тіоціанову, метансульфонову, етансульфонову, 1,2-етандисульфонову, 2-гідроксіетансульфонову, бензолсульфонову, 4-хлорбензолсульфонову, нафталін-2-сульфонову, п-толуолсульфонову, камфорсульфонову, 4-метилбіцикло[2.2.2]-окт-2-ен-1-карбонову, глюкогептонову, 4,4'-метиленбіс-3-(гідроксі-2-ен-1-карбонову кислоту), гідроксинафталінову.

“Фармацевтично прийнятні основи” включають неорганічні й органічні основи, що є нетоксичними у використуванні у лікарській формі концентрації та формі. Наприклад, підходящі основи включають ті основи, які утворені з металів, що формують неорганічні основи, таких як літій, натрій, калій, магній, кальцій, амоній, залізо, цинк, мідь, марганець, алюміній, N-метилглюкаміну, морфоліну, піперидину й органічних нетоксичних основ, включаючи первинні, вторинні та третинні аміни, заміщені аміни, циклічні аміни й основні іонообмінні смоли [наприклад, $N(R')_4^+$, (де R' незалежно являє собою H або C_{1-4} алкіл, наприклад, амоній, Трис)], наприклад, ізопропіламін, триметиламін, діетиламін, триетиламін, трипропіламін, етаноламін, 2-діетиламіноетанол, триметамін, дициклогексиламін, лізин, аргінін, гістидин, кофеїн, прокаїн, гідрабамін, холін, бетаїн, етилендіамін, глюкозамін, метилглюкамін, теобромін, пурини, піперазин, піперидин, N-етилпіперидин, поліамінні смоли і тому подібне. Особливо переважними органічними нетоксичними основами є ізопропіламін, діетиламін, етаноламін, триметамін, дициклогексиламін, холін і кофеїн.

Додаткові фармацевтично прийнятні кислоти й основи, що використовують в даному винаході, включають кислоти й основи, які отримані з амінокислот, наприклад, гістидину, гліцину, фенілаланіну, аспарагінової кислоти, глутаміної кислоти, лізину й аспарагіну.

“Фармацевтично прийнятні” буфери та солі включають буфери та солі, які отримані як із солей приєднання кислоти, так і з солей приєднання основи зазначених вище кислот і основ. Конкретні буфери та/або солі включають солі гістидину, сукцинат й ацетат.

“Фармацевтично прийнятний цукор” являє собою молекулу, що у комбінації з білком, що цікавить, значно запобігає або знижує хімічну та/або фізичну нестабільність білка при зберіганні. Якщо передбачається, що лікарська форма буде ліофілізована та потім відновлена, “фармацевтично прийнятний цукор” може також називатися “ліопротектор”. Приклади ліопротекторів включають цукри та їх відповідні цукрові спирти, амінокислоти, такі як глутамат натрію або гістидин; метиламін, такий як бетаїн; ліотропну сіль, таку як сульфат магнію; поліол, такий як трьохатомні або високомолекулярні цукрові спирти, наприклад, гліцерин, декстран, еритрит, гліцерин, арабіт, ксиліт, сорбіт і маніт; пропіленгліколь; поліетиленгліколь; PLURONICS®; і їхні комбінації. Додаткові приклади ліопротекторів включають гліцерин і желатин, і цукри мелібіозу, мелецитозу, рафінозу, манотриозу та стахіозу. Приклади відновлюваних цукрів включають глюкозу, мальтозу, лактозу, мальтулозу, ізо-мальтулозу та лактулозу. Приклади невідновлюваних цукрів включають невідновлювані глікозиди полігідрокси сполук, вибраних із цукрових спиртів та інших поліспиртів з нерозгалуженим ланцюгом. Переважними цукровими спиртами є моноглікозиди, особливо ті сполуки, які отримані відновленням дисахаридів, таких як лактоза, маноза, лактулоза та мальтулоза. Глікозидні бічні групи можуть бути або глюкозидними, або галактозидними. Додатковими прикладами цукрових

спиртів є глюцит, мальтит, лактит та ізо-мальтит. Переважними фармацевтично прийнятними цукрами є невідновлювані цукри, трегалоза або сахароза. Фармацевтично прийнятні цукри додають до лікарської форми в “захисній кількості” (наприклад, до ліофілізації), що означає, що білок по суті зберігає свою фізичну й хімічну стабільність і цілісність у процесі зберігання (наприклад, після відновлення та зберігання).

Необхідний “розріджувач” у даному документі являє собою розріджувач, що є фармацевтично прийнятним (безпечним і нетоксичним для введення людині) і використовуваним для одержання рідкої лікарської форми, наприклад, лікарської форми, відновленої після ліофілізації. Приклади розріджувачів включають стерильну воду, бактеріостатичну воду для ін'єкцій (BWF1), рН-буферний розчин (наприклад, фосфатно-сольовий буферний розчин), стерильний сольовий розчин, розчин Рінгера або розчин декстрази. В альтернативному варіанті втілення розріджувачі можуть включати водні розчини солей та/або буфери.

“Консервант” являє собою сполуку, яка може бути додана до лікарських форм, передбачених у даному документі, для зниження бактеріальної активності. Додавання консерванту може, наприклад, забезпечити одержання багатодозової лікарської форми (для багаторазового використання). Приклади потенційних консервантів включають октадецилдиметилбензил амонію хлорид, гексаметонію хлорид, бензалконію хлорид (суміш алкілбензилдиметиламонію хлоридів, у яких алкільні групи являють собою довголанцюгові сполуки) і бензетонію хлорид. Інші типи консервантів включають ароматичні спирти, такі як фенол, бутиловий і бензиловий спирт, алкілпарабени, такі як метил- або пропілпарабен, катехол, резорцин, циклогексанол, 3-пентанол і м-крезол. Найбільш переважним консервантом у даному документі є бензиловий спирт.

“Індивідуум”, або “суб'єкт”, або “пацієнт” є ссавцем. Ссавці включають одомашнених тварин (наприклад, корів, овець, котів, собак і коней), приматів (наприклад, людина та примати, що не відносяться до людини, такі як мавпи), кроликів і гризунів (наприклад, миші та пацюки), але не обмежуються ними. У деяких варіантах втілення, індивідуумом або суб'єктом є людина.

Використовуваний у даному документі термін “лікування” відноситься до клінічного втручання, яке спрямовано на зміну природного ходу захворювання або стану тканини або клітини в індивідуума, що піддається лікуванню в ході клінічної патології. Бажані ефекти від лікування включають, але не обмежуються ними, зменшення швидкості прогресування захворювання, поліпшення або тимчасове полегшення хворобливого стану й ремісію або поліпшений прогноз, де ефекти вимірює фахівець у даній області техніки, такий як лікар. В одному з варіантів втілення, лікування може означати ослаблення симптомів, зменшення будь-яких прямих або непрямих патологічних наслідків захворювання, зменшення швидкості прогресування інфекційного захворювання, поліпшення або тимчасове полегшення хворобливого стану й ремісію або поліпшений прогноз. У деяких варіантах втілення, антитіла даного винаходу використовуються для вповільнення розвитку захворювання або для вповільнення прогресування інфекційного захворювання.

Використовуване в даному документі вираження “у сполученні з” відноситься до застосування одного виду лікування на додаток до іншого виду лікування. У такому випадку, “у сполученні з” відноситься до застосування одного виду лікування до, у процесі або після застосування іншого виду лікування до індивідуума.

Термін “фагосома” відноситься до інтерналізованого оточеного мембраною ендоцитозного пухирця фагоцитуючої клітини. Фагоцитоз може бути ініційований безпосередньо, за участю антитіла або за участю комплементу. Термін “фаголізосома” відноситься до інтерналізованого клітинного пухирця, злитого з однією або декількома лізосомами.

Бактерії традиційно розділяють на основі їхнього фарбування за Грамом на дві основні групи, грампозитивні (Gm+) і грамнегативні (Gm-) бактерії. Грампозитивні бактерії оточені одношаровою ліпідною мембраною, і вони зазвичай містять товстий шар (20-80 нм) пептидогліканів, що містить барвник Грама. Грампозитивні бактерії забарвлюються темно-синім або фіолетовим при фарбуванні за Грамом. На противагу цьому, грамнегативні бактерії не можуть містити кристалічний фіолетовий барвник, і замість цього містять контрастний барвник (сафранін або фуксин) і стають червоними або рожевими. У грампозитивних клітинних стінках зазвичай відсутня зовнішня мембрана, що виявляється у грамнегативних бактерій.

Термін “бактеріємія” відноситься до присутності бактерій у кровотоці, що найчастіше виявляється при посівах крові. Бактерії можуть проникати в кровоток при важкому ускладненні інфекцій (таких як пневмонія або менінгіт), при хірургічному втручанні (особливо, що зачіпає слизові оболонки, такі як шлунково-кишковий тракт) або через катетери й інші чужорідні об'єкти, які розміщені в артерії або вені. Бактеріємія може мати декілька наслідків. Імунна відповідь на

бактерії може викликати сепсис і септичний шок, смертність від яких відносно висока. Бактерії також можуть використовувати кров для поширення в інші частини організму, викликаючи інфекції в інших місцях, що відрізняються від первинного місця інфікування. Приклади включають ендокардит або остеомієліт.

“Терапевтично ефективна кількість” являє собою мінімальну концентрацію, необхідну для досягнення відчутного поліпшення конкретного розладу. Терапевтично ефективна кількість у даному документі може варіювати відповідно до факторів, такими як стадія захворювання, вік, стать та вага пацієнта, а також здатність антитіла викликати бажану відповідь в індивідуума. Терапевтично ефективна кількість також являє собою таку кількість, при якій будь-які токсичні або шкідливі ефекти від антибіотика є незначними у порівнянні з терапевтично сприятливими ефектами. В одному з варіантів втілення, терапевтично ефективна кількість являє собою кількість, ефективну для зниження бактеріємії у випадку інфекції *in vivo*. В одному з аспектів, “терапевтично ефективна кількість” являє собою, щонайменше, кількість, ефективну для зниження бактеріального навантаження або кількості колонієутворюючих одиниць (КУО), виділених зі зразка, такого як кров, отриманого від пацієнта, щонайменше, на один порядок щодо бактеріального навантаження або кількості колонієутворюючих одиниць (КУО), виділених із зразка, такого як кров, отриманого від пацієнта до введення лікарського засобу. У більш певному аспекті, зниження становить, щонайменше, 2 порядки. В іншому аспекті, зниження становить 3, 4, 5 порядків. У ще одному аспекті, зниження призводить до рівня бактеріального навантаження або кількості колонієутворюючих одиниць, які нижче рівня виявлення. В іншому варіанті втілення терапевтично ефективна кількість являє собою кількість ААС в одній або декількох дозах, прийнятих у ході курсу лікування, що досить для одержання негативного посіву крові (тобто бактерії, на які спрямований ААС, не ростуть) у порівнянні з позитивним посівом крові до лікування або на початку лікування інфікованого пацієнта.

“Профілактично ефективна кількість” відноситься до кількості, ефективної при необхідних дозах і протягом необхідного періоду часу для досягнення бажаного профілактичного результату. Зазвичай, але необов'язково, оскільки профілактична доза використовується для суб'єктів до захворювання, на ранніх стадіях захворювання або навіть до впливу умов, при яких зростає ризик інфекції, профілактично ефективна кількість може бути менше терапевтично ефективної кількості. В одному з варіантів втілення, профілактично ефективна кількість являє собою, щонайменше, кількість, ефективну для запобігання виникнення або зниження поширення інфекції від однієї клітини до іншої.

“Хронічне” введення відноситься до безперервного введення лікарського засобу (лікарських засобів) на протигагу однократному введенню, так що первісний терапевтичний ефект (активність) зберігається протягом тривалого періоду часу. “Переривчасте” введення являє собою лікування, що проводиться не безупинно та без перерв, а має циклічний характер.

Використовуваний термін “вкладиш в упакування” відноситься до інструкцій, зазвичай включених у комерційні упакування терапевтичних продуктів, які містять інформацію про показання, застосування, дозування, введення, комбіновану терапію, протипоказання й/або застереження, що стосуються застосування таких терапевтичних продуктів.

Термін “хіральний” відноситься до молекул, які мають властивості не сполучатися у просторі з своїм дзеркальним відображенням, тоді як термін “ахіральний” відноситься до молекул, які мають властивості сполучатися у просторі з своїми дзеркальними відображеннями.

Термін “стереоізомери” відноситься до сполук, які мають ідентичну хімічну будову, але відрізняються розташуванням атомів або груп атомів у просторі.

“Діастереомер” відноситься до стереоізомеру з двома або декількома центрами хіральності, і молекули яких не є дзеркальними зображеннями один одного. Діастереомери мають різні фізичні властивості, наприклад, температуру плавлення, температуру кипіння, спектральні властивості та хімічну активність. Суміші діастереомерів можуть бути розділені за допомогою аналітичних процедур з високою роздільною здатністю, таких як електрофорез і хроматографія.

“Енантіомери” відносяться до двох стереоізомерів сполуки, які не є поєднувальними дзеркальними відображеннями, один одного.

Стереохімічні визначення й умовні позначення, що використовуються в даному документі, як правило, збігаються з визначеннями й позначеннями в S. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; і Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. Багато органічних сполук існують в оптично активних формах, тобто вони мають здатність обертати площину плоско-поляризованого світла. При описі оптично активної сполуки префікси D і L або R і S використовуються для позначення абсолютної конфігурації молекули відносно її хірального центра (хіральних центрів). Префікси d і l або (+) і (-) використовуються для

позначення знака обертання плоско-поляризованого світла сполукою, при цьому (-) або 1 означає, що сполука є лівообертальною. Сполука з префіксом (+) або d є правообертальною. Для даної хімічної структури ці стереоізомери є ідентичними за винятком того, що вони являють собою дзеркальні відображення один одного. Певний стереоізомер може також називатися

енантіомером, і суміш таких ізомерів часто називається енантіомерною сумішшю. Суміш енантіомерів 50:50 називається рацемічною сумішшю або рацематом, вона може виникнути, якщо в хімічній реакції або процесі не було стереоселективності або стереоспецифічності. Терміни "рацемічна суміш" і "рацемат" відносяться до еквімолярної суміші двох типів енантіомерів, позбавленої оптичної активності.

Термін "захисна група" відноситься до замісника, що зазвичай використовується для блокування або захисту конкретної функціональної групи, тоді як інші функціональні групи сполуки вступають у реакцію. Наприклад, "аміно-захисна група" являє собою замісник, приєднаний до аміногрупи, що блокує або захищає функціональну аміногрупу в сполуці. Підходящі аміно-захисні групи включають, але не обмежуються ними, ацетильну, трифторацетильну, трет-бутоксикарбонільну (BOC), бензилоксикарбонільну (CBZ) і 9-флуоренілметилоксикарбонільну (Fmoc). Загальний опис захисних груп та їхнє застосування дивіться в T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley & Sons, New York, 1991, або у більш пізньому виданні.

Використовуваний у даному документі термін "приблизно" відноситься до звичайного діапазону помилки для відповідного значення, добре відомому фахівцю в даній області техніки. Посилання "приблизно" на значення або параметр також включають (і описує) варіанти втілення, які відносяться до цього значення або параметра як такого.

Використовувані в даному документі форми однини включають також вказання множини, якщо в контексті ясно не зазначено інше. Наприклад, посилання на "антитіло" є посиланням на одне або множину антитіл, наприклад, на молярні кількості антитіл, і включає їхні еквіваленти, відомі фахівцям у даній області техніки, і тому подібне.

III. КОМПОЗИЦІЇ ТА СПОСОБИ

КОН'ЮГАТИ АНТИТІЛО-АНТИБІОТИК (AAC)

Сполуки AAC даного винаходу включають сполуки AAC, що мають антибактеріальну активність, які є ефективними проти ряду грамположитивних, грамнегативних патогенів людини та тварин, у тому числі, проти *Staphylococci*. У варіанті втілення, наведеному як приклад, сполуки AAC включають антитіло з введенням методом генної інженерії цистеїном, кон'юговане, тобто ковалентно приєднане за допомогою лінкера до фрагмента антибіотика типу рифаміцину. Біологічну активність фрагмента антибіотика типу рифаміцину модулюють за рахунок кон'югації з антитілом. Кон'югати антитіло-антибіотик (AAC) даного винаходу селективно доставляють ефективну дозу антибактеріального агента в осередок інфекції, завдяки чому підвищується селективність, тобто може бути використана менша ефективна доза, але при цьому збільшується терапевтичний індекс ("терапевтичне вікно").

Даний винахід передбачає нову антибактеріальну терапію, спрямовану на запобігання відхилення від дії антибіотиків цільової популяції бактерій, на яку не діє терапія традиційними антибіотиками. Для нової антибактеріальної терапії використовується кон'югат антитіло-антибіотик (AAC), у якому антитіло, специфічне до компонентів клітинної стінки *S. aureus* (у тому числі MRSA), хімічно сполучене з потужним антибіотиком (похідною рифаміцину). Антибіотик сполучений з антитілом через розщеплюваний протеазою пептидний лінкер, сконструйований таким чином, що він розщеплюється катепсином B, лізосомальною протеазою, виявленою у більшості типів клітин ссавців (Dubowchik et al (2002) *Bioconj. Chem.* 13:855-869). AAC виступає як проліки, в яких антибіотик є неактивним (через великий розмір антитіла) доти, поки лінкер не буде розщеплений. Оскільки значна частина *S. aureus*, виявленого у випадку природної інфекції, у деякий момент у ході інфекції поглинається клітинами-хазяїнами, у першу чергу, нейтрофілами та макрофагами, то цей час всередині клітин-хазяїнів дає можливість бактеріям уникнути дії антибіотика. AAC даного винаходу сконструйовані таким чином, щоб зв'язуватись з *S. aureus* і вивільняти антибіотик всередину фаголізосоми після того, як бактерія поглинена клітиною-хазяїном. Відповідно до цього механізму, завдяки AAC відбувається концентрування активного антибіотика конкретно в тих місцях, де *S. aureus* погано піддається лікуванню традиційними антибіотиками. Хоча даний винахід не обмежений конкретним механізмом дії або не має на увазі конкретний механізм дії, AAC поліпшує активність антибіотика за трьома можливими механізмами: (1) AAC доставляє антибіотик всередину клітин ссавців, що поглинули бактерію, тим самим збільшуючи активність антибіотика, що погано дифундує у фаголізосоми з поглиненими бактеріями; (2) AAC опсонізує бактерію, тим самим збільшуючи поглинання вільних бактерій фагоцитарними клітинами, вивільняє антибіотик локально та знищує поглинену

бактерію у фаголізосомах; (3) AAC поліпшує період напівжиття антибіотиків *in vivo* (поліпшена фармакокінетика) за рахунок зв'язування антибіотика з антитілом. Поліпшена фармакокінетика AAC забезпечує доставку достатньої кількості антибіотика в ділянки, у яких сконцентрований *S. aureus*, але при цьому загальна доза антибіотика, що повинна бути введена системно, знижується. Ця особливість дає можливою тривалу терапію AAC з мінімальними побічними ефектами від антибіотика, спрямовану проти персистуючої інфекції.

Дана заявка описує створення нових терапевтичних агентів, кон'югованих анти-WTA антитіл, і їхнє застосування для лікування інфекцій, викликаних грампозитивними (Gm+) бактеріями, у тому числі інфекцій, викликаних *S. aureus*. Ці антитіла здатні направлено діяти на популяції Gm+ бактерій, на які не діє терапія традиційними антибіотиками.

Сполука кон'югат антитіло-антибіотик даного винаходу включає антитіло проти тейхоєвих кислот клітинної стінки бета (WTA бета), ковалентно приєднане за допомогою пептидного лінкера до антибіотика типу рифаміцину.

В одному з варіантів втілення, кон'югат антитіло-антибіотик має формулу:

$Ab-(L-abx)_p$,

де:

Ab являє собою антитіло проти тейхоєвих кислот клітинної стінки;

L являє собою пептидний лінкер, що має формулу:

-Str-Pep-Y-,

де Str являє собою сполучну частину; Pep являє собою пептид, що складається з двох-дванадцяти амінокислотних залишків, і Y являє собою спейсер;

abx являє собою антибіотик типу рифаміцину; і

p являє собою ціле число від 1 до 8.

Кількість фрагментів антибіотиків, що може бути кон'югована через реакційноздатний лінкер з молекулою антитіла, може бути обмежена кількістю вільних залишків цистеїну, які введені способами, описаними в даному документі. Приклади AAC, що відповідають формулі I, таким чином, включають антитіла, які мають 1, 2, 3 або 4 амінокислоти цистеїну, введені методами генної інженерії (Lyon, R. et al (2012) *Methods in Enzym.* 502:123-138).

АНТИТІЛА ПРОТИ ТЕЙХОЄВИХ КИСЛОТ КЛІТИННОЇ СТІНКИ (WTA)

У даному документі розкриті деякі анти-WTA антитіла та кон'юговані анти-WTA антитіла, які сполучаються з WTA, що експресуються на деяких Gm+ бактеріях, у тому числі на *Staphylococcus aureus*. Анти-WTA антитіла можуть бути вибрані й отримані способами, описаними в US 8283294; Meijer PJ et al (2006) *J Mol Biol.* 358(3):764-72; Lantto J, et al (2011) *J Virol.* 85(4):1820-33, і у Прикладі 21 нижче. Даний винахід передбачає композиції цих анти-WTA антитіл.

Клітинна стінка грампозитивних бактерій складається з товстого шару великого числа пептидогліканових (PGN) оболонок, які не тільки стабілізують клітинну мембрану, але також забезпечують множини сайтів, до яких можуть бути приєднані інші молекули (Фіг. 3). Основним класом цих глікопротеїнів клітинної поверхні є тейхоєві кислоти ("TA"), які являють собою багаті фосфатом молекули, виявлені на багатьох глікан-сполучних білках (GPB). TA бувають двох типів: (1) ліпотейхоєві кислоти ("LTA"), закорені у плазматичній мембрані та простягаються від клітинної поверхні у пептидоглікановий шар; і (2) TA клітинної стінки (WTA), які ковалентно приєднані до пептидогліканів і простягаються крізь клітинну стінку та назовні за її межі (Фіг. 3). WTA можуть становити до 60% від загальної маси клітинної стінки у грампозитивних бактерій. У результаті, вони являють собою високо експресований антиген клітинної поверхні.

Хімічні структури WTA різні в різних організмах. В *S. aureus* WTA ковалентно зв'язані з 6-ОН N-ацетилмурамової кислоти (MurNAc) через дисахарид, що складається з N-ацетилглюкозамін (GlcNAc)-1-P і N-ацетилманозаміну (ManNAc), за яким ідуть приблизно дві або три одиниці гліцерол-фосфату (Фіг. 4). Даний полімер WTA, таким чином, складається приблизно з 11-40 повторюваних одиниць рибіт-фосфату (Rbo-P). Покроковий синтез WTA спочатку ініціюється ферментом, що називається TagO, і штамми *S. aureus*, у яких відсутній ген TagO (у результаті видалення гена), не синтезують WTA. Повторювані одиниці можуть бути далі сполучені з D-аланіном (D-Ala) у положенні C2-ОН і/або з N-ацетилглюкозаміном (GlcNAc) у положенні C4-ОН через α - (альфа) або β - (бета) глікозидні зв'язки. Залежно від штамму *S. aureus* або фази росту бактерії глікозидні зв'язки можуть являти собою α -, β - або суміш двох аномерів. Ці модифікації цукром GlcNAc здійснюють дві специфічні глікозилтрансферази *S. aureus* (Gtfs): TarM Gtf опосередковує утворення α -глікозидних зв'язків, тоді як TarG Gtf опосередковує утворення β - (бета)глікозидних зв'язків.

Враховуючи істотні докази того, що внутрішньоклітинні MRSA захищені від антибіотиків, нові терапевтичні композиції даного винаходу були розроблені для запобігання цього способу

відхилення бактерій від дії антибіотиків, і нові терапевтичні композиції використовують антитіла, специфічні до *S. aureus*, щоб зв'язати антибіотик з бактерією, так що коли бактерія поглинається або іншим способом інтерналізується клітиною-хазяїном *in vivo*, антибіотик разом із нею потрапляє в клітину-хазяїна.

В одному аспекті, даний винахід передбачає анти-WTA антитіла, які являють собою анти-WTA α або анти-WTA β . В іншому аспекті, даний винахід передбачає анти-Staph aureus антитіла. Наведені як приклад антитіла клоновані з В клітин пацієнтів, інфікованих *S. aureus* (як описано у Прикладі 21). В одному з варіантів втілення, анти-WTA й анти-Staph aureus антитіла являють собою людські моноклональні антитіла. Даний винахід включає химерні антитіла та гуманізовані антитіла, що включають CDR антитіл проти WTA даного винаходу.

Для терапевтичного застосування WTA антитіла даного винаходу, призначені для кон'югації з антибіотиками й утворення AAC, можуть належати до будь-якого ізотипу за винятком IgM. В одному з варіантів втілення, WTA антитіла є людськими антитілами ізотипу IgG. У більш певному варіанті втілення, WTA антитіла являють собою людські IgG1.

На Фіг. 6A і 6B наведений список антитіл, які являють собою анти-WTA α або анти-WTA β . В описі й на Фігурах антитіла, позначені 4-значним номером (наприклад, 4497), також можуть бути позначені символом "S" на початку, наприклад, S4497; обидві назви відносяться до того самого антитіла дикого типу (WT), що має немодифіковану послідовність. Варіанти антитіл відмічені символом "v" після номера антитіла, наприклад, 4497.v8. Якщо не зазначено інше (наприклад, номер варіанта), наведені амінокислотні послідовності являють собою вихідні, немодифіковані/ незмінні послідовності. У цих антитілах може бути змінений один або декілька залишків, наприклад, з метою поліпшення рК, стабільності, експресії, можливості виробництва (наприклад, як описано у Прикладах нижче), із збереженням по суті приблизно такої самої або поліпшеної афінності зв'язування з антигеном у порівнянні з немодифікованим антитілом дикого типу. Варіанти даних WTA антитіл, що мають консервативні заміни амінокислот, включені в даний винахід. Нижче, якщо не зазначено інше, нумерація CDR наведена відповідно до Kabat, і нумерація константного домену наведена відповідно до нумерації EU.

На Фіг. 13A і Фіг. 13B наведене вирівнювання амінокислотної послідовності варіабельних областей легких ланцюгів (VL) і варіабельних областей важких ланцюгів (VH), відповідно, чотирьох людських анти-WTA альфа антитіл. Підкреслені послідовності CDR L1, L2, L3 і CDR H1, H2, H3 відповідно до нумерації Kabat.

Таблиця 6A

Послідовності CDR легкого ланцюга анти-WTA α .

Антитіло	CDR L1	CDR L2	CDR L3
4461	KSSQSVLSRANNYYVA (SEQ ID NO:1)	WASTREF (SEQ ID NO:2)	QQYYTSRRT (SEQ ID NO:3)
4624	RSNQNLSSSNYYLA (SEQ ID NO:7)	WASTRES (SEQ ID NO:8)	QQYYANPRT (SEQ ID NO:9)
4399	KSNQNVLASSNDKNYLA (SEQ ID NO:13)	WASIRES (SEQ ID NO:14)	QQYYTNPRT (SEQ ID NO:15)
6267	KSSQNVLYSSNNKNYLA (SEQ ID NO:19)	WASTRES (SEQ ID NO:20)	QQYYTSPPYT (SEQ ID NO:21)

Таблиця 6В

Послідовності CDR важкого ланцюга анти-WTAα.

Антитіло	CDR H1	CDR H2	CDR H3
4461	DYYMH (SEQ ID NO:4)	WINPKSGGTNYAQRFGG (SEQ ID NO:5)	DCGSGGLRDF (SEQ ID NO:6)
4624	DYYIH (SEQ ID NO:10)	WINPNTGGTYAQAQKFRD (SEQ ID NO:11)	DCGRGGLRDI (SEQ ID NO:12)
4399	DYYIH (SEQ ID NO:16)	WINPNTGGTNYAQAQKFGG (SEQ ID NO:17)	DCGNAGLRDI (SEQ ID NO:18)
6267	SYWIG (SEQ ID NO:22)	IIHPGDSKTRYSPSFQG (SEQ ID NO:23)	LYCSGGSCYSDFRSSLGAGGYYYYGMGV (SEQ ID NO:24)

Послідовності кожної пари VL і VH.

Варіабельна область легкого ланцюга 4461

5 DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLSRANNNYYVAWYQHKPGQPPKLLIYWASTREFGV
PDRFSGSGSGTDFTLTINSQAEDVAVYYCQYYTSRRTFGGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 25)

Варіабельна область важкого ланцюга 4461

10 QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYSTDYIMHWVRQAPGQGLEWMGWINPKSGGTNYA
QRFQGRVTMTGDTSSAAYMDLASLTSDDTAVYYCVKDCGSGGLRDFWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 26)

Варіабельна область легкого ланцюга 4624

DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCRSNQNLSSNNNNYLAWYQQKPGQPLKLLIYWASTRESGVP
DRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQYYANPRTFGGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 27)

Варіабельна область важкого ланцюга 4624

15 QVQLQQSRVEVKRPGTSVKVSCKTSGYTFSDDYIHWVRLAPGQGLELMGWINPNTGGTYAQAQK
FRDRVTMTRDTSIATAYLEMSSLTSDDTAVYYCAKDCGRGGLRDIWGPGTMVTVSS (SEQ ID NO: 28)

Варіабельна область легкого ланцюга 4399

20 EIVLTQSPDSLAVSLGERATINCKSNQNVLASSNDKNYLAWFQHKPGQPLKLLIYWASIRESGVPD
RFSGSGSGTDFTLTISLRAEDVAVYYCQYYTNPRTFGGQGTKVEFN (SEQ ID NO: 29)

Варіабельна область важкого ланцюга 4399

EVQLVQSGAEVKKPGTSVKVSCKASGYTFTDYIHWVRLAPGQGLELMGWINPNTGGTNYAQAQK
QGRVTMTRDTSIATAYMELSSLTSDDTAVYYCAKDCGNAGLRDIWGQGTITVTVSS (SEQ ID NO: 30)

Варіабельна область легкого ланцюга 6267

25 DIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQNVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVP
DRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQYYTSPPYTFGGQGTKLEIE (SEQ ID NO: 31)

Варіабельна область важкого ланцюга 6267

30 EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKSGSYSTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIHPGDSKTRYSPSF
QQQVTISADKSISTAYLQWNSLKASDTAMYYCARLYCSGGSCYSDFRSSLGAGGYYYYGMGVWG
QGTITVTVSS (SEQ ID NO: 32).

Даний винахід передбачає виділене моноклональне антитіло, що зв'язується з тейхоевою кислотою клітинної стінки (WTA), що включає легкий ланцюг і H ланцюг, де L ланцюг включає CDR L1, L2, L3, і H ланцюг включає CDR H1, H2, H3, де CDR L1, L2, L3 і H1, H2, H3 включають амінокислотні послідовності CDR кожного з антитіл 4461 (SEQ ID NO: 1-6), 4624 (SEQ ID NO: 7-12), 4399 (SEQ ID NO: 13-18) і 6267 (SEQ ID NO: 19-24), відповідно, як показано в Таблицях 6А і 6В.

В іншому варіанті втілення, виділене моноклональне антитіло, що зв'язується з WTA, включає варіабельну область H (VH) і варіабельну область L ланцюга (VL), де VH має, щонайменше, 95% ідентичність послідовності за довжиною послідовності області VH кожного з антитіл 4461, 4624, 4399 і 6267, відповідно. У ще одному конкретному варіанті втілення, ідентичність послідовностей становить 96%, 97%, 98%, 99% або 100%.

Даний винахід також передбачає анти-WTA бета антитіла, що включають послідовності CDR L і H ланцюгів, як показано на Фіг. 14. В одному з варіантів втілення, виділені анти-WTA бета

моноклональні антитіла включають CDR L1, L2, L3 і H1, H2, H3, вибрані з групи, що складається з CDR кожного з 13 антитіл, наведених на Фіг. 14. В іншому варіанті втілення, даний винахід передбачає виділені анти-WTA бета антитіла, що мають, щонайменше, 95% ідентичність послідовності за довжиною V доменів з кожним з 13 антитіл. У ще одному певному варіанті втілення, ідентичність послідовностей становить 96%, 97%, 98%, 99% або 100%.

З 13 анти-WTA бета антитіл, 6078 і 4497 були модифіковані для одержання i) варіантів, що містять Cys, введений методами генної інженерії в один з L або H ланцюгів, або в обидва ланцюги L і H, для кон'югації з інтермедіатом лінкер-антибіотик; і ii) варіантів, у яких перший залишок в H ланцюзі Q змінений на E (v2) або перші два залишки QM змінені на EI або EV (v3 і v4).

На Фіг. 15A-1 і 15A-2 наведена амінокислотна послідовність повнорозмірного L ланцюга анти-WTA бета антитіла 6078 (немодифіковане) і її варіантів, v2, v3, v4. Варіанти L ланцюга, які містять Cys, введений методами генної інженерії, відзначені символом C у чорному квадраті на кінці константної області (у цьому випадку залишок має номер 205 згідно з EU). Позначення варіанта, наприклад, v2LC-Cys, означає, що варіант 2 містить Cys, введений методами генної інженерії, в L ланцюзі. HCLC-Cys означає, що Cys, введений методами генної інженерії, міститься як в H ланцюзі, так і в L ланцюзі антитіла. На Фігурах з 15B-1 до 15B-4 наведене вирівнювання повнорозмірного H ланцюга анти-WTA бета антитіла 6078 (немодифікованого) і її варіантів, v2, v3, v4, у яких змінені перший залишок або перші два залишки в H ланцюзі. Варіанти H ланцюга, які містять Cys, введений методами генної інженерії, відмічені символом C у чорному квадраті на кінці константної області (у цьому випадку залишок має номер 118 згідно з EU).

Варіабельна область легкого ланцюга (VL) 6078

DIVMTQSPSILSASVGDRVITITCRASQTISGWLAWYQQKPAEAPKLLIYKASTLESGVPSRFSGSG
SGTEFTLTISLQPDFFGIYYCQQYKSYSFNFGQGTKEIK (SEQ ID NO:111)

Варіабельна область важкого ланцюга (VH) 6078

XX,QLVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGYTLTSYDINWVRQATGQGPEWMGWMNANSNGNTGYA
QKFQGRVTLTGDTISSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSSILVRGALGRYFDLWGRGTLVTVSS (SEQ
ID NO:112) де X являє собою Q або E; і X₁ являє собою M, I або V.

Легкий ланцюг 6078

DIVMTQSPSILSASVGDRVITITCRASQTISGWLAWYQQKPAEAPKLLIYKASTLESGVPSRFSGSG
SGTEFTLTISLQPDFFGIYYCQQYKSYSFNFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL
LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDfDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:113)

Легкий ланцюг з введеним методом генної інженерії цистеїном 6078

DIVMTQSPSILSASVGDRVITITCRASQTISGWLAWYQQKPAEAPKLLIYKASTLESGVPSRFSGSG
SGTEFTLTISLQPDFFGIYYCQQYKSYSFNFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL
LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDQSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL
SSPCTKSFNRGEC (SEQ ID NO:115)

Повнорозмірний важкий ланцюг WT 6078

QMQLVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGYTLTSYDINWVRQATGQGPEWMGWMNANSNGNTGYA
QKFQGRVTLTGDTISSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSSILVRGALGRYFDLWGRGTLVTVSSASTK
GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
NO:114)

Повнорозмірний важкий ланцюг варіанта 6078 (v2, v3 або v4)

EXQLVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGYTLTSYDINWVRQATGQGPEWMGWMNANSNGNTGYAQ
KFQGRVTLTGDTISSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSSILVRGALGRYFDLWGRGTLVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKV
SNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID
NO:116) де X може являти собою M, I або V.

Cys-генно-інженерний важкий ланцюг варіанта 6078 (v2, v3 або v4)

EXQLVQSGAEVKKPGASVKVSCEASGYTLTSYDINWVRQATGQGPEWMGWMNANSNGNTGYAQ
KFQGRVTLTGDTISSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARSSILVRGALGRYFDLWGRGTLVTVSSCSTKGP

SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:117) де Х може являти собою М, І або V.

В одному з варіантів втілення, даний винахід передбачає виділене анти-WTA бета антитіло, що включає важкий і легкий ланцюг, де важкий ланцюг включає VH, що має, щонайменше, 95% ідентичність послідовності з SEQ ID NO: 112. У додатковому варіанті втілення, це антитіло також включає VL, що має, щонайменше, 95% ідентичність послідовності з SEQ ID NO: 111. У певному варіанті втілення, анти-WTA бета антитіло включає легкий ланцюг і важкий ланцюг, де L ланцюг включає VL з SEQ ID NO: 111, і H ланцюг включає VH з SEQ ID NO: 112. У ще одному певному варіанті втілення, виділене анти-WTA бета антитіло включає L ланцюг з SEQ ID NO: 113 і H ланцюг з SEQ ID NO: 114.

Cys-генно-інженерні варіанти Н і L ланцюгів 6078 можуть бути спарені в кожній з наступних комбінацій з утворенням повних антитіл для кон'югації з інтермедіатами лінкер-Abx й утворення анти-WTA AAC згідно з даним винаходом. Немодифікований L ланцюг (SEQ ID NO:113) може бути спарений з Cys-генно-інженерним варіантом Н ланцюга з SEQ ID NO: 117; варіант може являти собою такий варіант, у якому Х являє собою М, І або V. Cys-генно-інженерний L ланцюг з SEQ ID NO: 115 може бути спарений з Н ланцюгом з SEQ ID NO:114; варіантом Н ланцюга з SEQ ID NO:116; або Cys-генно-інженерним варіантом Н ланцюга з SEQ ID NO:117 (у цьому варіанті як Н, так і L ланцюги містять Cys, введений методами генної інженерії). У конкретному варіанті втілення, анти-WTA бета антитіло й анти-WTA бета AAC даного винаходу включають L ланцюг з SEQ ID NO: 115 і Н ланцюг з SEQ ID NO:116.

На Фіг. 16A-1 і 16A-2 наведений повнорозмірний L ланцюг анти-WTA бета антитіла 4497 (немодифіковане) і її варіантів v8. Варіанти L ланцюга, які містять Cys, введений методами генної інженерії, позначені символом С у чорному квадраті на кінці константної області (залишок має номер 205 за EU). На Фіг. 16B-1, 16B-2, 16B-3 наведене вирівнювання повнорозмірного Н ланцюга анти-WTA бета антитіла 4497 (немодифіковане) і її варіанта v8, у якому D замінений на Е у положенні 96 в CDR H3, і який містить або не містить Cys, введений методами генної інженерії. Варіанти Н ланцюга, які містять Cys, введений методами генної інженерії, позначені символом С у чорному квадраті на кінці константної області (у цьому випадку залишок має номер 118 за EU). Немодифікований CDR H3 має послідовність GDGGLDD (SEQ ID NO:104); CDR H3 4497v8 має послідовність GEGGLDD (SEQ ID NO:118).

Варіабельна область легкого ланцюга 4497
DIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSIFRTSRNKNLLNWYQQRPGQPPRLLIHWASTRKSGVP
DRFSGSGFGTDFTLTITSLQAEDVAIYYCQQYFSPPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 119)

Варіабельна область важкого ланцюга 4497
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFSFNSFWMHWRVQVPGKGLVWISFTNNEGTTTAYADS
VRGRFIISRDNAKNTLYLEMNLRGEDTAVYYCARGDGLDDWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 120)

Варіабельна область важкого ланцюга 4497.v8
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFSFNSFWMHWRVQVPGKGLVWISFTNNEGTTTAYADS
VRGRFIISRDNAKNTLYLEMNLRGEDTAVYYCARGEGGLDDWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 156)

Легкий ланцюг 4497
DIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSIFRTSRNKNLLNWYQQRPGQPPRLLIHWASTRKSGVP
DRFSGSGFGTDFTLTITSLQAEDVAIYYCQQYFSPPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPRQAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE
VTHQGLSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 121)

Важкий ланцюг 4497 v.8
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFSFNSFWMHWRVQVPGKGLVWISFTNNEGTTTAYADS
VRGRFIISRDNAKNTLYLEMNLRGEDTAVYYCARGEGGLDDWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPS
SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 122)

Легкий ланцюг 4497-Cys
DIQLTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSIFRTSRNKNLLNWYQQRPGQPPRLLIHWASTRKSGVP
DRFSGSGFGTDFTLTITSLQAEDVAIYYCQQYFSPPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLNNFYPRQAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE

VTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 123)

Важкий ланцюг 4497.v8

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFSFNSFWMHWRQVPGKGLVWISFTNNEGTTTAYADS
VRGRFIISRDNAKNTLYLEMNNLRGEDITAVYYCARGEGGLDDWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPS
5 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 157; так само
10 як в SEQ ID NO:122).

Важкий ланцюг 4497.v8-Cys

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFSFNSFWMHWRQVPGKGLVWISFTNNEGTTTAYADS
VRGRFIISRDNAKNTLYLEMNNLRGEDITAVYYCARGEGGLDDWGQGTLLVTVSSCSTKGPSVFPLAPS
15 SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYI
CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 124)

Інше виділене анти-WTA бета антитіло, передбачене даним винаходом, включає важкий та
20 легкий ланцюги, де важкий ланцюг включає VH, що має, щонайменше, 95% ідентичність
послідовності з SEQ ID NO: 120. У додатковому варіанті втілення, це антитіло також включає
VL, що має, щонайменше, 95% ідентичність послідовності з SEQ ID NO: 119. У певному варіанті
втілення, анти-WTA бета антитіло включає легкий ланцюг і важкий ланцюг, де L ланцюг включає
VL з SEQ ID NO: 119, і H ланцюг включає VH з SEQ ID NO: 120. У ще одному певному варіанті
25 втілення, виділене анти-WTA бета антитіло включає L ланцюг з SEQ ID NO: 121 і H ланцюг з
SEQ ID NO: 122.

Cys-генно-інженерні варіанти H і L ланцюгів 4497 можуть бути спарені в кожній з наступних
комбінацій з утворенням повних антитіл для кон'югації з інтермедіатами лінкер-Abx й утворення
анти-WTA AAC згідно з даним винаходом. Немодифікований L ланцюг (SEQ ID NO:121) може
30 бути спарений з Cys-генно-інженерним варіантом H ланцюга з SEQ ID NO: 124. Cys-генно-
інженерний L ланцюг з SEQ ID NO: 123 може бути спарений з варіантом H ланцюга з SEQ ID
NO:157; або Cys-генно-інженерним варіантом H ланцюга з SEQ ID NO:124 (у цьому варіанті як
H, так і L ланцюги містять Cys, введений методами генної інженерії). У конкретному варіанті
втілення, анти-WTA бета антитіло й анти-WTA бета AAC даного винаходу включають L ланцюг з
35 SEQ ID NO: 123.

Інший варіант втілення являє собою антитіло, що зв'язується з тим же самим епітопом, що й
кожне з анти-WTA альфа антитіл, наведених на Фіг. 13A і Фіг. 13B. Також передбачене антитіло,
що зв'язується з тим же самим епітопом, що й кожне з анти-WTA бета антитіл, наведених з Фіг.
14, Фіг. 15A і 15B і Фіг. 16A і 16B.

На зв'язування анти-WTA антитіл з WTA впливає аномерна орієнтація GlcNAc-модифікацій
цукру на WTA. WTA модифіковані N-ацетилглюкозаміном (GlcNAc) у положенні C4-OH через α -
або β -глікозидні зв'язки під дією TarM глікозилтрансферази або TarS глікозилтрансферази,
відповідно. Відповідно, препарати клітинних стінок зі штамів-мутантів за глікозилтрансферазою,
45 в яких відсутній Tar(Δ TarM), Tar (Δ TarS) або обидва ферменти, TarM і TarS (Δ TarM/ Δ TarS), були
проаналізовані за допомогою імуноблотингу з антитілами проти WTA. WTA антитіло (S7574),
специфічне до α -GlcNAc модифікаціям на WTA, не зв'язується з препаратом клітинної стінки з
штаму Δ TarM. Навпаки, WTA антитіло (S4462), специфічне до модифікацій β -GlcNAc на WTA, не
зв'язується з препаратом клітинної стінки зі штаму Δ TarS. Як і очікувалось, обидва цих антитіла
не зв'язуються з препаратами клітинних стінок із штаму з делецією, в якого відсутні обидві
50 глікозилтрансферази (Δ TarM/ Δ TarS), і також із штаму, в якого відсутні WTA (Δ TagO). Відповідно
до цього аналізу, антитіла були охарактеризовані як анти- α -GlcNAc WTA моноклональні
антитіла або як анти- β -GlcNAc WTA моноклональні антитіла, як зазначено в Таблиці та на Фіг.
6A і 6B.

Методами генної інженерії в реакційноздатні ділянки в антитілі можуть бути введені залишки
амінокислоти цистеїн, які не утворюють внутрішньоланцюгові або міжланцюгові дисульфідні
зв'язки (Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; Dornan et al (2009) Blood
114(13):2721-2729; US 7521541; US 7723485; WO2009/052249, Shen et al (2012) Nature Biotech.,
30(2):184-191; Junutula et al (2008) Jour of Immun. Methods 332:41-52). Тіоли цистеїнів, введених
методами генної інженерії, можуть реагувати з лінкерами або інтермедіатами лінкер-антибіотик
60 даного винаходу, у яких є тіол- реакційноздатні електрофільні групи, такі як малеїмід або

альфа-галоген амід, з утворенням AAC із фрагментами антитіла з введеним методом генної інженерії цистеїном (ThioMab) і антибіотика (abx). Таким чином, можна задати, контролювати й знати розташування фрагмента антибіотика. Можна контролювати навантаження антибіотика, оскільки тиольні групи цистеїну, введені методами генної інженерії, як правило, реагують з тиол-реакційноздатними лінкерами або інтермедіатами лінкер-антибіотик з високим виходом. Введення амінокислоти цистеїну в анти-WTA антитіло шляхом заміни в одному сайті важкого або легкого ланцюга дає два нових цистеїни в симетричному тетрамерному антитілі. Можна одержати майже гомогенний продукт кон'югації AAC з навантаженням антибіотика, приблизно рівний 2.

У деяких варіантах втілення, може бути бажаним одержати анти-WTA антитіла з введеним методом генної інженерії цистеїном, наприклад, "ThioMab", у яких один або декілька залишків антитіла заміщені на залишки цистеїну. У конкретних варіантах втілення, заміщені залишки перебувають у доступних ділянках антитіла. У результаті заміни цих залишків на цистеїн реакційноздатні тиольні групи виявляються розташованими в доступних ділянках антитіла та можуть бути використані для кон'югації антитіла з іншими фрагментами, такими як фрагменти антитіла або фрагменти лінкер-антибіотик, з метою одержання імунокон'югату, як описано далі в даному документі. У деяких варіантах втілення, будь-який один або декілька з наступних залишків можуть бути заміщені на цистеїн, включаючи V205 (нумерація за Kabat) легкого ланцюга; A118 (нумерація EU) важкого ланцюга; і S400 (нумерація EU) області Fc важкого ланцюга. Наведені необмежуючі приклади мутантів анти-WTA антитіла з цистеїном генно-інженерним важким ланцюгом A118C (SEQ ID NO: 149) і легким ланцюгом V205C (SEQ ID NO:151). Анти-WTA антитіла з введеним методом генної інженерії цистеїном можуть бути отримані, як описано в Junutula, et al., 2008b Nature Biotech., 26(8):925-932; US 7521541; US-2011/0301334.

В іншому варіанті втілення даний винахід відноситься до виділеного анти-WTA антитіла, що включає важкий та легкий ланцюги, де важкий ланцюг включає послідовність константної області важкого ланцюга дикого типу або мутанта з введеним методом генної інженерії цистеїном (ThioMab) і послідовність константної області легкого ланцюга дикого типу або мутанта з введеним методом генної інженерії цистеїном (ThioMab). В одному з варіантів, важкий ланцюг має, щонайменше, 95% ідентичність послідовності з константною областю важкого ланцюга (IgG1) дикого типу

```
ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO:148)
```

константною областю важкого ланцюга (IgG1) A118C "ThioMab"

```
CSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL
LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
NGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO:149)
```

і легкий ланцюг має, щонайменше, 95% ідентичність послідовності з константною областю легкого ланцюга (каппа) дикого типу

```
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO:150)
```

константною областю легкого ланцюга (каппа) V205C "ThioMab"

```
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO:151).
```

AAC даного винаходу включають анти-WTA антитіла з введеним методом генної інженерії цистеїном, у яких одна або декілька амінокислот в антитілі дикого типу або вихідному анти-WTA антитілі заміщені на амінокислоту цистеїн. Будь-яка форма антитіла може бути змінена таким чином, тобто мutowана. Наприклад, вихідний Fab фрагмент антитіла може бути змінений для одержання Fab з введеним методом генної інженерії цистеїном, що називається в даному документі "thioFAB." Аналогічно, вихідне моноклональне антитіло може бути змінене для одержання "ThioMab". Слід зазначити, що мутація в одному сайті дає один введений методами

генної інженерії залишок цистеїну в ThioFAB, тоді як мутація в одному сайті дає два введених методи генної інженерії залишку цистеїну в ThioMab через димерну природу IgG антитіла. У мутантах із заміщеними ("введеними методами генної інженерії") залишками цистеїну (Cys) оцінюють реакційну здатність введених методами генної інженерії тільних груп цистеїнів.

Антитіла, описані в даному документі, можуть бути отримані з використанням клітин-хазяїнів у культурі. Клітини-хазяїни можна трансформувати векторами (експресуючими векторами або векторами для клонування), які включають одну або декілька нуклеїнових кислот, що кодують антитіла, описані в даному документі. Клітини можна культивувати в умовах, що підходять для одержання антитіл, і антитіла, продуковані клітиною, далі можуть бути очищені. Підходящі клітини для одержання антитіл можуть включати клітини прокариот, дріжджів або вищих еукаріот (наприклад, ссавців). У деяких варіантах втілення, використовують клітину ссавців (людську або не людську клітину ссавців). У деяких варіантах втілення, використовують клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO).

Клітини ссавців можна культивувати, і розмноження клітин ссавців у культурі (культурі тканини) є рутинною процедурою. Приклади ліній клітин ссавців, які можуть бути використані в якості хазяїнів, включають, без обмеження, лінію клітин нирок мавпи CV1, трансформовану SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); лінію клітин людських ембріональних нирок (клітини 293 або 293, субклоновані для росту в суспензійній культурі, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); клітини нирки дитинчати хом'яка (BHK, ATCC CCL 10); клітини Сертолї мишей (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); клітини нирок мавпи (CV1 ATCC CCL 70); клітини нирок африканської зеленої мавпи (VERO-76, ATCC CRL-1587); людські клітини карциноми шийки матки (HELA, ATCC CCL 2); клітини нирок собаки (MDCK, ATCC CCL 34); клітини печінки сірого пацюка Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); людські клітини легенів (W138, ATCC CCL 75); людські клітини печінки (Hep G2, HB 8065); клітини пухлини молочної залози мишей (MMT 060562, ATCC CCL51); клітини TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); клітини MRC 5; клітини FS4; і лінію людської гепатоми (Hep G2). Інші використовувані в якості хазяїнів лінії клітин ссавців включають лінії клітин мієломи, такі як NS0 і Sp2/0. Огляд деяких ліній клітин ссавців, які можуть бути використані в якості хазяїнів для одержання антитіл, дивіться, наприклад, в Yazaki and Wu, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 255-268.

В якості хазяїнів також можуть бути використані культури рослинних клітин бавовни, кукурудзи, картоплі, соєвих бобів, петунії, томатів, ряски (*Leninaceae*), люцерни (*M. truncatula*) і тютюну.

Підходящі прокаріотичні клітини для цих цілей включають еубактерій, таких як грамнегативні або грампозитивні організми, наприклад, *Enterobacteriaceae*, такі як *Escherichia*, наприклад, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, наприклад, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, наприклад, *Serratia marcescens* і *Shigella*, а також *Bacilli*, такі як *B. subtilis* і *B. licheniformis* (наприклад, *B. licheniformis* 41P, розкритий в DD 266,710, опублікованому 12 квітня 1989), *Pseudomonas*, такі як *P. aeruginosa*, і *Streptomyces*. Серед *E. coli* кращим хазяїном для клонування є *E. coli* 294 (ATCC 31,446), хоча підходящими є й інші штами, такі як *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31,537) і *E. coli* W3110 (ATCC 27,325). Ці приклади наведені тільки як приклад і не призначені для обмеження об'єму даного винаходу.

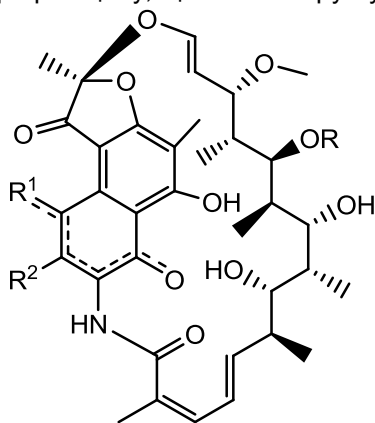
На додаток до прокаріотів підходящими хазяїнами для клонування або експресії векторів, що кодують антитіла, є еукаріотичні мікроорганізми, такі як нитчасті гриби або дріжджі. *Saccharomyces cerevisiae*, або звичайні пекарські дріжджі, є найбільш часто використовуваними серед нижчих еукаріотичних мікроорганізмів-хазяїнів. Проте, ряд інших родів, видів і штамів, таких як *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces*, такі як, наприклад, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilae* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans* і *K. marxianus*; *Yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, такі як *Schwanniomyces occidentalis*; і нитчасті гриби, такі як, наприклад, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, і *Aspergillus*, такі як *A. nidulans* і *A. niger*, широко доступні та можуть бути використані в даному документі.

ФРАГМЕНТИ АНТИБІОТИКА ТИПУ РИФАМІЦИНУ

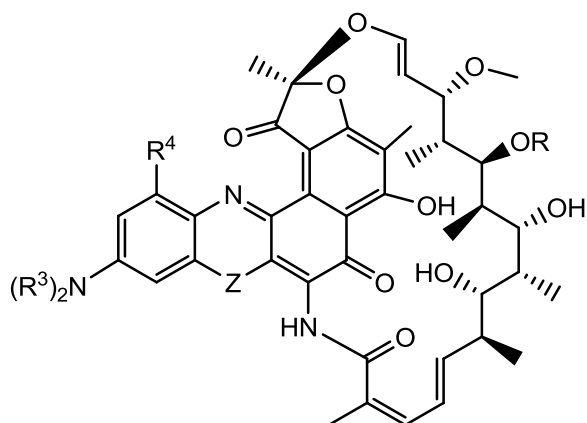
Фрагмент антибіотика (абх) кон'югатів антитіло-антибіотик (AAC) даного винаходу являє собою антибіотик типу рифаміцину або групу, що має цитотоксичний або цитостатичний ефект. Рифаміцини являють собою групу антибіотиків, які одержують або з природних джерел, бактерій *Nocardia mediterranei*, *Amiclatopsis mediterranei*, або штучно. Вони являють собою підклас більшого сімейства ансаміцинів, які інгібують бактеріальну РНК полімеразу (Fujii *et al* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1489-1492; Feklistov, *et al* (2008) *Proc Natl Acad Sci USA*,

105(39): 14820-5) і мають активність проти грампозитивних і деяких грамнегативних бактерій. Рифаміцини особливо ефективні проти мікобактерій і тому використовуються для лікування туберкульозу, лепри й інфекцій мікобактеріального комплексу (МАС). Група антибіотиків типу рифаміцину включає "класичні" лікарські препарати рифаміцину, а також похідні рифаміцину, рифампіцин (рифампін, реєстраційний номер СА 13292-46-1), рифабутин (реєстраційний номер СА 72559-06-9; US 2011/0178001), рифапентин і рифалазил (реєстраційний номер СА 129791-92-0, Rothstein et al (2003) Expert Opin. Investig. Drugs 12(2):255-271; Fujii et al (1994) Antimicrob. Agents Chemother. 38:1118-1122). До багатьох антибіотиків типу рифаміцину розвивається стійкість (Wichelhaus et al (2001) J. Antimicrob. Chemother. 47:153-156). Рифаміцини були вперше виділені в 1957 з ферментативної культури *Streptomyces mediterranei*. Було відкрито біля семи рифаміцинів, названих рифаміцин А, В, С, D, Е, S і SV (US 3150046). Рифаміцин В першим був введений у комерційну практику та використовувався для лікування стійкого до лікарських засобів туберкульозу в 1960-х. Рифаміцини використовували для лікування багатьох захворювань, серед яких найбільш значимим був ВІЛ-асоційований туберкульоз. Через велику кількість доступних аналогів і похідних рифаміцини широко використовували для елімінації патогенних бактерій, що стали стійкими до зазвичай використовуваних антибіотиків. Наприклад, рифампіцин відомий своєю потужною дією та здатністю запобігати виникненню стійкості до лікарських засобів. Він швидко знищує штами бацил, що швидко діляться, а також "персистуючі" клітини, які залишаються біологічно неактивними протягом тривалих періодів часу, що дозволяє їм уникати дії антибіотиків. Крім того, рифабутин і рифапентин обидва використовувались проти туберкульозу, набутого ВІЛ-позитивними пацієнтами.

Фрагменти антибіотика (abx) кон'югатів антитіло-антибіотик, що відповідають формулі I, являють собою фрагменти типу рифаміцину, що мають структуру:

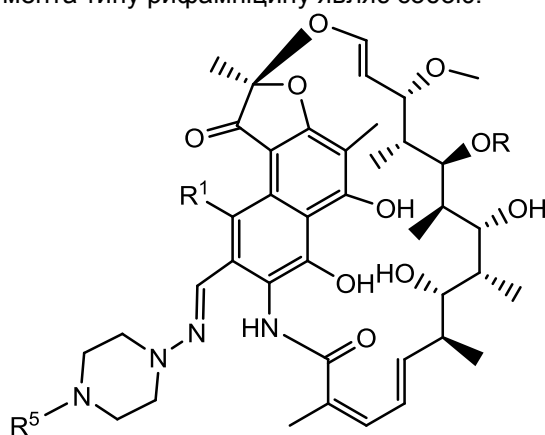


де:
пунктирні лінії означають необов'язковий зв'язок;
R являє собою H, C₁-C₁₂ алкіл або C(O)CH₃;
R¹ являє собою OH;
R² являє собою CH=N-(гетероцикл), де гетероцикл необов'язково заміщений однією або декількома групами, незалежно вибраними з C(O)CH₃, C₁-C₁₂ алкілу, C₁-C₁₂ гетероарилу, C₂-C₂₀ гетероциклілу, C₆-C₂₀ арилу та C₃-C₁₂ карбоциклілу;
або R¹ і R² утворюють п'яти- або шестичленний конденсований гетероарил або гетероцикліл, і необов'язково утворюють спірозчленоване або конденсоване шестичленне гетероарильне, гетероциклільне, арильне або карбоциклільне кільце, де спірозчленоване або конденсоване шестичленне гетероарильне, гетероциклільне, арильне або карбоциклільне кільце необов'язково заміщене H, F, Cl, Br, I, C₁-C₁₂ алкілом або OH; і
де пептидний лінкер L ковалентно приєднаний до R².
Варіант втілення фрагмента типу рифаміцину являє собою:



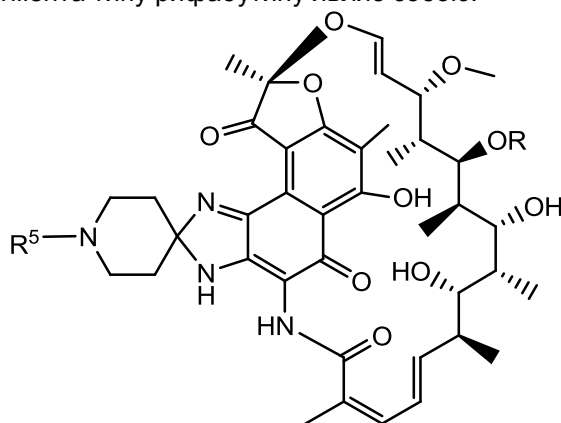
де R^3 незалежно вибраний з H і C_1-C_{12} алкілу; R^4 вибраний з H, F, Cl, Br, I, C_1-C_{12} алкілу та OH; і Z вибраний з NH, $N(C_1-C_{12}$ алкілу), O і S; і де пептидний лінкер L ковалентно приєднаний до атома азоту $N(R^3)_2$.

5 Варіант втілення фрагмента типу рифампіцину являє собою:



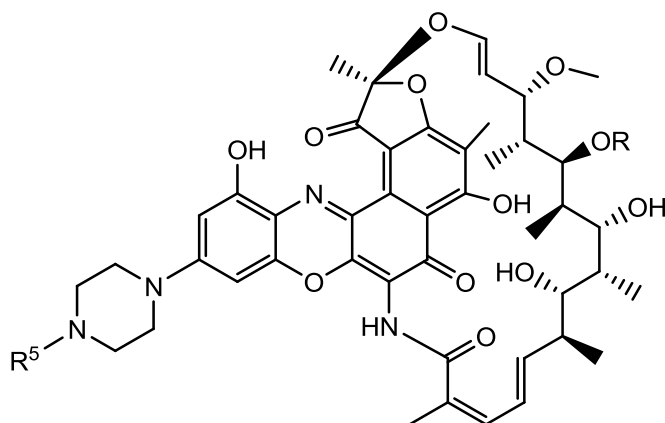
де R^5 вибраний з H і C_1-C_{12} алкілу; і де пептидний лінкер L ковалентно приєднаний до атома азоту NR^5 .

10 Варіант втілення фрагмента типу рифабутину являє собою:



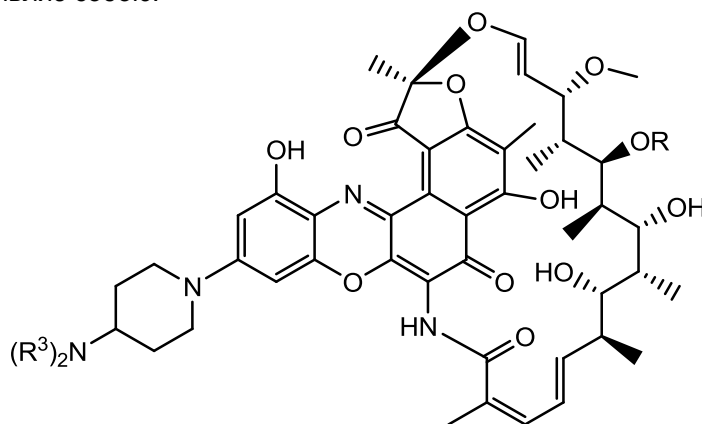
де R^5 вибраний з H і C_1-C_{12} алкілу; і де пептидний лінкер L ковалентно приєднаний до атома азоту NR^5 .

Варіант втілення фрагмента типу бензоксазинорифаміцину являє собою:



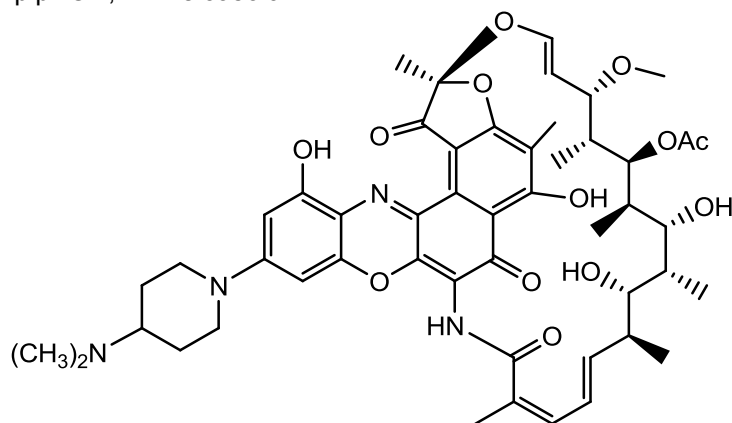
де R^5 вибраний з H і C_1 - C_{12} алкілу; і де пептидний лінкер L ковалентно приєднаний до атома азоту NR^5 .

Варіант втілення фрагмента типу бензоксазинорифаміцину, що називається у даному документі $ripBOR$, являє собою:



де R^3 незалежно вибраний з H і C_1 - C_{12} алкілу; і де пептидний лінкер L ковалентно приєднаний до атома азоту $N(R^3)_2$.

Варіант втілення фрагмента типу бензоксазинорифаміцину, що називається у даному документі $dimethyl\ ripBOR$, являє собою:

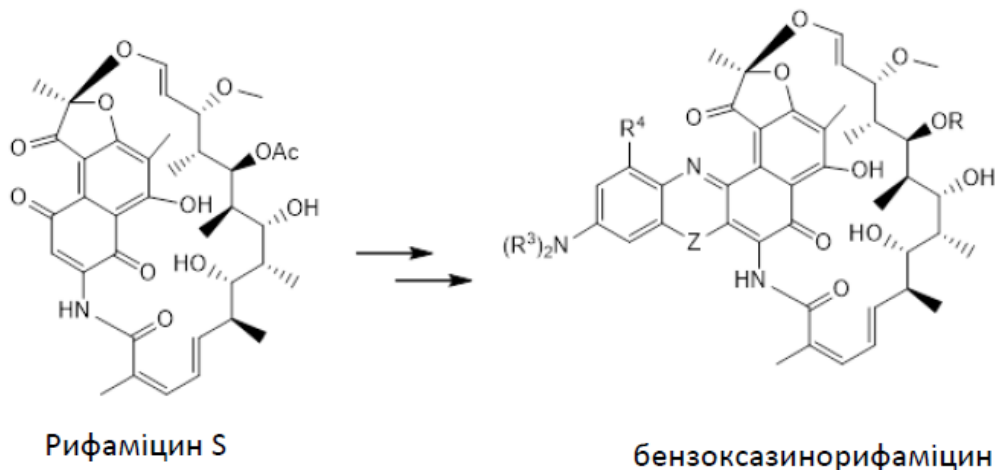


де пептидний лінкер L ковалентно приєднаний до атома азоту $N(CH_3)_2$.

Напівсинтетична похідна рифаміцину S або відновлена натрієва сіль рифаміцину SV можуть бути перетворені в антибіотики типу рифалазилу за кілька стадій, де R являє собою H або Ac, R^3 незалежно вибраний з H і C_1 - C_{12} алкілу; R^4 вибраний з H, F, Cl, Br, I, C_1 - C_{12} алкілу і OH; і Z вибраний з NH, $N(C_1$ - C_{12} алкілу), O і S, як показано на Фіг. 9-11. Можуть бути отримані бензоксазино ($Z = O$), бензтіазино ($Z = S$), бенздіазино ($Z = NH$, $N(C_1$ - C_{12} алкіл) рифаміцини (US7271165). Аналоги бензоксазинорифаміцину (BOR), бензтіазинорифаміцину (BTR) і бенздіазинорифаміцину (BDR), які містять замісники, нумеруються згідно зі схемою нумерації, передбаченою у формулі A у колонці 28 в US 7271165, включеному в даний документ за допомогою посилання для цієї мети. "25-O-деацетил" рифаміцин означає аналог рифаміцину, в

якого була вилучена ацетильна група у положенні 25. Аналоги, в яких це положення далі дериватизується, називаються "25-О-деацетил-25-(замісник)рифаміцин", при цьому "замісник" замінюється на повну назву сполуки відповідно до номенклатури для дериватизуючої групи.

- 5 Фрагменти антибіотика типу рифаміцину можуть бути синтезовані способами, аналогічними тим, які розкриті в US 4610919; US 4983602; US 5786349; US5981522; US 4859661; US 7271165; US 2011/0178001; Seligson, et al., (2001) *Anti-Cancer Drugs* 12:305-13; *Chem. Pharm. Bull.*, (1993) 41:148, кожний з яких включений у даний документ за допомогою посилання. Фрагменти антибіотика типу рифаміцину можуть бути піддані скринінгу на антибактеріальну активність шляхом вимірювання їх мінімальної інгібуючої концентрації (MIC) з використанням стандартних
- 10 аналізів MIC *in vitro* (Tomioka et al., (1993) *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:67).



ПЕПТИДНІ ЛІНКЕРИ

- 15 "Пептидний лінкер" (L) являє собою біфункціональний або мультифункціональний фрагмент, що ковалентно приєднаний до одного або декількох фрагментів антибіотиків (abx) й антитіла (Ab) з утворенням кон'югату антитіло-антибіотик (AAC), що відповідає формулі I. Пептидні лінкери в AAC є субстратами для розщеплення внутрішньоклітинними протеазами, у тому числі в лізосомах. Протеази включають різні катепсини та каспази. Розщеплення пептидного лінкера в AAC всередині клітини може вивільняти антибіотик типу рифаміцину з антибактеріальною дією.

Кількість активного антибіотика, що вивільняється в результаті розщеплення AAC, може бути виміряна за допомогою аналізу вивільнення з каспазою з Прикладу 20.

- 25 Кон'югати антитіло-антибіотик (AAC) можна одержувати з використанням лінкера або інтермедіату лінкер-антибіотик, що мають реакційноздатну функціональну групу для зв'язування з антибіотиком (abx) і з антитілом (Ab). В одному з варіантів втілення, наведеному як приклад, тиол цистеїну в антитілі з введенням методом генної інженерії цистеїном (Ab) може утворювати зв'язок з функціональною групою лінкерного реагенту, фрагментом антибіотика або інтермедіатом антибіотик-лінкер.

- 30 В одному з аспектів, лінкерний реагент або інтермедіат лінкер-антибіотик мають реакційноздатний сайт із електрофільною групою, що реагує з нуклеофільним цистеїном на антитілі. Тиол цистеїну антитіла реагує з електрофільною групою лінкерного реагенту або інтермедіату лінкер-антибіотик з утворенням ковалентного зв'язку. Використовувані електрофільні групи включають малеїмідні та галогенацетамідні групи, але не обмежуються ними.

- 35 Антитіла з введенням методом генної інженерії цистеїном реагують з лінкерними реагентами або інтермедіатами лінкер-антибіотик, що несуть електрофільні функціональні групи, такі як малеїмідна або α -галогенкарбонільна, згідно зі способом кон'югації, описаним на сторінці 766 в Klussman, et al (2004), *Bioconjugate Chemistry* 15(4):765-773, і відповідно до протоколу з Прикладу 19.

- 40 В іншому варіанті втілення, реакційноздатна група лінкерного реагенту або інтермедіату лінкер-антибіотик містить тиол-реакційноздатну функціональну групу, що може утворювати зв'язок з вільним тиолом цистеїну антитіла. Приклади тиол-реакційноздатних функціональних груп включають малеїмід, α -галогенацетил, активовані ефіри, такі як сукцинімідні ефіри, 4-нітрофенілові ефіри, пентафторфенілові ефіри, тетрафторфенілові ефіри, ангідриди, хлорангідриди кислот, сульфонілхлориди, ізоціанати та ізотіоціанати, але не обмежуються
- 45

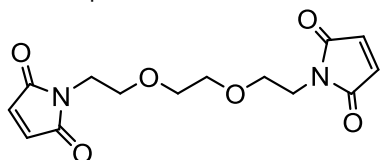
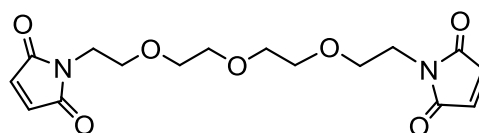
ними.

В іншому варіанті втілення, лінкерний реагент та інтермедіат антибіотик-лінкер має реакційноздатну функціональну групу з нуклеофільною групою, що реагує з електрофільною групою на антитілі. Використовувані електрофільні групи на антитілі включають піридил дисульфідні, альдегідні або кетонів карбонільні групи, але не обмежуються ними. Гетероатом нуклеофільної групи лінкерного реагенту або інтермедіату антибіотик-лінкер може реагувати з електрофільною групою на антитілі й утворювати ковалентний зв'язок з антитілом. Використовувані нуклеофільні групи на лінкерних реагентах або інтермедіатах антибіотик-лінкер включають гідразид, оксим, аміно, тіол, гідразин, тіосемікарбазон, гідразинкарбоксилат й арилгідразид, але не обмежуються ними. Електрофільна група на антитілі забезпечує зручний сайт для прикріплення лінкерного реагенту або інтермедіату антибіотик-лінкер.

Пептидний лінкер може включати один або декілька компонентів лінкера. Приклади компонентів лінкера включають пептидну частину, 6-малеїмідокапроїл ("MC"), малеїмідпропаноїл ("MP"), валін-цитрулін ("val-cit" або "vc"), аланін-фенілаланін ("ala-phe"), п-амінобензилноксикарбоніл ("PAB"), N-сукцинімідил-4-(2-піридилтіо)пентаноат ("SPP") і 4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1 карбоксилат ("MCC"). Різні компоненти лінкера відомі в даній області техніки, деякі з них описані нижче.

В іншому варіанті втілення лінкер може бути заміщений групами, які модулюють розчинність або реакційну здатність. Наприклад, заряджений замісник, такий як сульфонат ($-\text{SO}_3^-$) або амоній, може збільшувати розчинність реагенту у воді та полегшувати проведення реакції зв'язування лінкерного реагенту з антитілом або фрагментом антибіотика або полегшувати проведення реакції зв'язування Ab-L (інтермедіат антитіло-лінкер) з abx або abx-L (інтермедіат антибіотик-лінкер) з Ab залежно від способу синтезу, що використовується для одержання AAC.

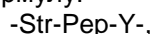
AAC даного винаходу спеціально включають, без обмеження, ті AAC, які отримані за допомогою наступних лінкерних реагентів: BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC, сульфо-SMPB, SVSB (сукцинімідил-(4-вінілсульфон)бензоат) і біс-малеїмідних реагентів, таких як DTME, BMB, BMDV, BMH, BMOE, BM(PEG)₂, і BM(PEG)₃. Біс-малеїмідні реагенти забезпечують можливість приєднання тіольної групи антитіла з введенням методом генної інженерії цистеїном до фрагменту антитіла, яке містить тіол, мітці або інтермедіату лінкера послідовним або конвергентним способом. Інші функціональні групи, крім малеїмідної, які реагують з тіольною групою антитіла з введенням методом генної інженерії цистеїном, тіольною групою фрагменту антибіотика або інтермедіату лінкер-антибіотик, включають бромацетамід, вінілпіридин, дисульфід, піридил дисульфід, ізоціанат та ізотіоціанат.

BM(PEG)₂BM(PEG)₃

Використовувані лінкерні реагенти також можуть бути отримані з інших комерційних джерел, такі як Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO), або синтезовані відповідно до методик, описаних в Toki et al (2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872; Dubowchik, et al. (1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-60; Walker, M.A. (1995) J. Org. Chem. 60:5352-5355; Frisch et al (1996) Bioconjugate Chem. 7:180-186; US 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583; і WO 04/032828.

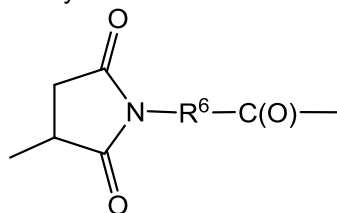
В іншому варіанті втілення, фрагмент пептидного лінкера AAC включає лінкер дендритного типу для ковалентного приєднання більше ніж одного фрагменту антибіотика до антитіла за допомогою розгалуженого мультифункціонального фрагменту лінкера (Sun et al (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:2213-2215; Sun et al (2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:1761-1768). За допомогою дендритних лінкерів може бути збільшене молярне співвідношення антибіотик: антитіло, тобто навантаження, що пов'язане з активністю AAC. Таким чином, якщо антитіло з введенням методом генної інженерії цистеїном містить тільки одну реакційноздатну тіольну групу цистеїну, за допомогою дендритного лінкера може бути приєднана множина фрагментів антибіотика.

У деяких варіантах втілення AAC, що відповідають формулі I, пептидний лінкер має формулу:



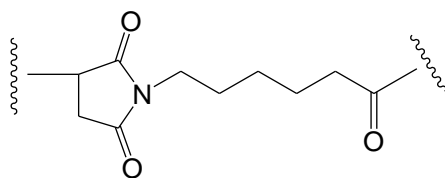
де Str являє собою сполучну частину, ковалентно приєднану до антитіла проти тейхоєвих кислот клітинної стінки (WTA); Рер являє собою пептид, що складається з двох-дванадцяти амінокислотних залишків, і Y являє собою спейсер, ковалентно приєднаний до антибіотика типу рифаміцину. Приклади варіантів втілення таких лінкерів описані в US7498298, спеціально включеному в даний документ за допомогою посилання.

В одному з варіантів втілення, сполучна частина "Str" має формулу:

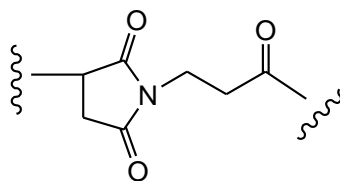


де R⁶ вибраний з групи, що складається з C₁-C₁₀ алкілену-, -C₃-C₈ карбоцикло-, -O-(C₁-C₈ алкілу)-, -арилу-, -C₁-C₁₀ алкілен-арилу-, -арил-С₁-C₁₀ алкілену-, -C₁-C₁₀ алкілен-(C₃-C₈ карбоцикло)-, -(C₃-C₈ карбоцикло)-C₁-C₁₀ алкілену-, -C₃-C₈ гетероцикло-, -C₁-C₁₀ алкілен-(C₃-C₈ гетероцикло)-, -(C₃-C₈ гетероцикло)-C₁-C₁₀ алкілену-, -(CH₂CH₂O)_r і -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-; і r являє собою ціле число в діапазоні від 1 до 10.

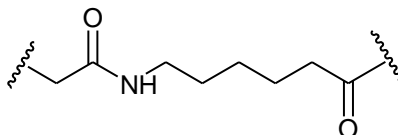
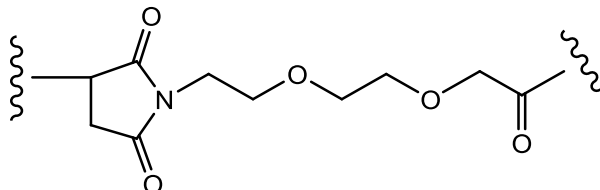
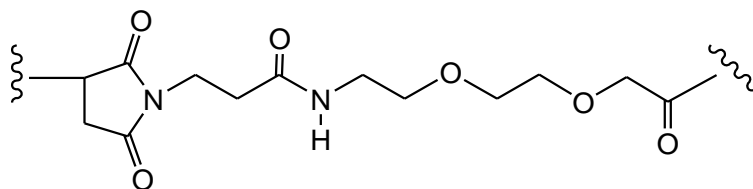
Приклади сполучної частини наведені нижче (де хвиляста лінія означає місце ковалентного приєднання до антитіла):



MC



MP



Пептидна частина "Рер" включає два або більше амінокислотних залишки, які зустрічаються у природі, включаючи двадцять основних амінокислот, а також міnorні амінокислоти, такі як цитрулін, добре відомі в області біохімії. Амінокислоти відрізняються своїми бічними ланцюгами. Пептидна частина, таким чином, включає два або більше бічні ланцюги амінокислот, включаючи, але не обмежуючись цим, -CH₃ (аланін), -CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂ (аргінін), -CH₂C(O)NH₂ (аспарагін), -CH₂CO₂H (аспарагінова кислота), -CH₂CH₂CH₂NHC(O)NH₂ (цитрулін), -CH₂SH (цистеїн), -CH₂CH₂CO₂H (глутамінова кислота), -CH₂CH₂C(O)NH₂ (глутамін), -H (гліцин), -CH₂(імідазоліл) (гістидин), -CH(CH₃)CH₂CH₃ (ізолейцин), -CH₂CH(CH₃)CH₃ (лейцин), -CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂ (лізин), -CH₂CH₂SCH₃ (метіонін), -CH₂(C₆H₅) (фенілаланін), -CH₂CH₂CH₂- (пролін), -CH₂OH (серин), -CH(OH)CH₃ (треонін), -CH₂(індол) (триптофан), -CH₂(p-C₆H₄OH) (тирозин), -CHCH(CH₃)CH₃ (валін). Дивіться сторінки 1076-1077,

"Organic Chemistry" 5th Ed. John McMurry, Brooks/Cole pub. (2000). Амінокислотні залишки пептидної частини включають всі стереоізомери, і можуть бути в D або L конфігураціях. В одному з варіантів втілення, Рер включає від двох до дванадцяти амінокислотних залишків, незалежно вибраних із гліцину, аланіну, фенілаланіну, лізину, аргініну, валіну та цитруліну. В одному з таких варіантів втілення, амінокислотна частина забезпечує можливість розщеплення лінкера протеазою, полегшуючи тим самим вивільнення антибіотика з AAC при впливі внутрішньоклітинних протеаз, таких як лізосомальні ферменти (Doronina et al. (2003) *Nat. Biotechnol.* 21:778-784). Приклади амінокислотної частини включають дипептид, трипептид, тетрапептид, пентапептид і гексапептид, але не обмежуються ними. Приклади дипептидів включають валін-цитрулін (vc або val-cit), аланін-фенілаланін (af або ala-phe); фенілаланін-лізин (fk або phe-lys); або N-метил-валін-цитрулін (Me-val-cit). Приклади трипептидів включають гліцин-валін-цитрулін (gly-val-cit), валін-цитрулін-фенілаланін (val-cit-phe) і гліцин-гліцин-гліцин (gly-gly-gly). Додаткові пептидні лінкери включають GGAFAGGG (SEQ ID NO: 126); trpm-cit; GPImeLFF (SEQ ID NO: 129); і LAFG (SEQ ID NO: 128). Пептидні лінкери можуть бути отримані за рахунок утворення пептидного зв'язку між двома або декількома амінокислотами та/або пептидними фрагментами. Такі пептидні зв'язки можуть бути отримані, наприклад, відповідно до методу рідкофазного синтезу (E. Schroder and K. Lubke (1965) "The Peptides", volume 1, pp 76-136, Academic Press), добре відомого в області пептидної хімії. Амінокислотна частина може бути сконструйована й оптимізована для селективного ферментативного розщеплення конкретним ферментом, наприклад, асоційованою з пухлиною протеазою, катепсином B, C і D або протеазою плазміном.

В одному з варіантів втілення, спейсер Y включає пара-амінобензил або пара-амінобензилоксикарбоніл. "Не саморозщеплюючий" спейсер являє собою спейсер, у якому частина спейсера або весь спейсер залишаються зв'язаними з фрагментом антибіотика при ферментативному (наприклад, протеолітичному) розщепленні AAC. Приклади не саморозщеплюючих спейсерів включають гліциновий спейсер і спейсер гліцин-гліцин, але не обмежуються ними. Також передбачені інші комбінації пептидних спейсерів, підданих послідовність-специфічному ферментативному розщепленню. Наприклад, ферментативне розщеплення AAC, що містять спейсер гліцин-гліцин, асоційованою з пухлинною клітиною протеазою буде призводити до вивільнення фрагмента гліцин-гліцин-антибіотик від AAC, що залишилось. В одному з таких варіантів втілення, фрагмент гліцин-гліцин-антибіотик далі піддають окремій стадії гідролізу в пухлинній клітині, таким чином, відщеплюючи спейсер гліцин-гліцин від фрагмента антибіотика.

Завдяки спейсеру фрагмент антибіотика може вивільнятися без окремої стадії гідролізу. Спейсер може бути "саморозщеплюючим" або "не саморозщеплюючим". У деяких варіантах втілення, спейсер лінкера включає п-амінобензилову одиницю (PAB). В одному з таких варіантів втілення, п-амінобензиловий спирт приєднаний до амінокислоти за допомогою амідного зв'язку, а між п-амінобензиловою групою та фрагментом антитіла перебуває така група як карбамат, метилкарбамат або карбонат (Hamann et al. (2005) *Expert Opin. Ther. Patents* (2005) 15:1087-1103). В одному з варіантів втілення, спейсер являє собою п-амінобензилоксикарбоніл (PAB).

В одному з варіантів втілення, антибіотик утворить четвертинний амін, наприклад, диметиламінопіридилову групу, коли приєднується до PAB спейсера пептидного лінкера. Прикладами таких четвертинних амінів є інтермедіати лінкер-антибіотик (LA) 54, 61, 66, 67, 73, 74, 76, 78, 79, 83, 84 з Таблиці 2. Четвертинна аміногрупа може модулювати розщеплення фрагмента антибіотика для оптимізації антибактеріальної дії AAC. В іншому варіанті втілення, антибіотик зв'язаний з спейсером PABC пептидного лінкера, утворюючи карбаматну функціональну групу в AAC. Така карбаматна функціональна група може також оптимізувати антибактеріальну дію AAC. Прикладами інтермедіатів PABC карбаматний лінкер-антибіотик (LA) є 51, 52, 53, 55, 56, 57, 58, 62, 63, 64, 65, 72, 75, 80, 81, 87 з Таблиці 2. В інших інтермедіатах лінкер-антибіотик (LA) використані амідна (59, 69, 70, 71, 77, 82, 85) або фенольна (60, 68, 86) групи.

Інші приклади спейсерів, що саморозщеплюються, включають, але не обмежуються ними, ароматичні сполуки, які з погляду електронної будови аналогічні групі PAB, такі як похідні 2-аміноімідазол-5-метанолу (US 7375078; Hay et al. (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237) і орто- або пара-амінобензилацетали. Можуть використовуватись спейсери, що перетерпіли циклізацію в ході гідролізу амідного зв'язку, такі як заміщені та незаміщені амідні 4-аміномасляної кислоти (Rodrigues et al (1995) *Chemistry Biology* 2:223), відповідно заміщені біцикло[2.2.1] і біцикло[2.2.2] кільцеві системи (Storm et al (1972) *J. Amer. Chem. Soc.* 94:5815) й амідні 2-амінофенілпропіонової кислоти (Amsberry, et al (1990) *J. Org. Chem.* 55:5867). Відщеплення лікарських засобів, що містять амін, приєднаних до гліцину (Kingsbury et al (1984) *J. Med. Chem.*

27:1447), також є прикладом спейсерів, що саморозщеплюються, корисних для ААС.

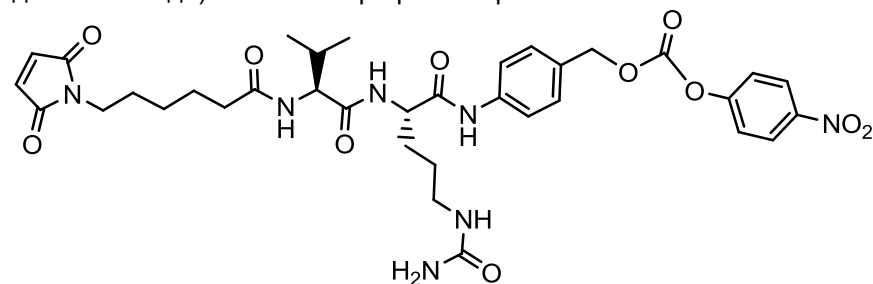
ІНТЕРМЕДІАТИ ЛІНКЕР-АНТИБІОТИК, ЩО ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ ДЛЯ ААС

Інтермедіати лінкер-антибіотик (LA), що відповідають формулі II та наведені в Таблиці 2, були отримані за рахунок зв'язування фрагмента антибіотика типу рифаміцину з пептидним

5

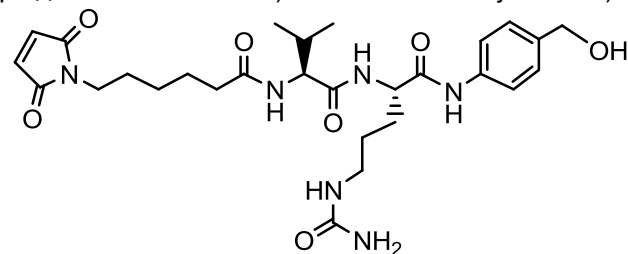
лінкерним реагентом, як описано як приклад на Фіг. 23-25 й у Прикладах 1-17. Лінкерні реагенти були отримані способами, описаними у WO 2012/113847; US 7659241; US 7498298; US 20090111756; US 2009/0018086; US 6214345; Dubowchik et al (2002) Bioconjugate Chem. 13(4):855-869, включаючи

10



6

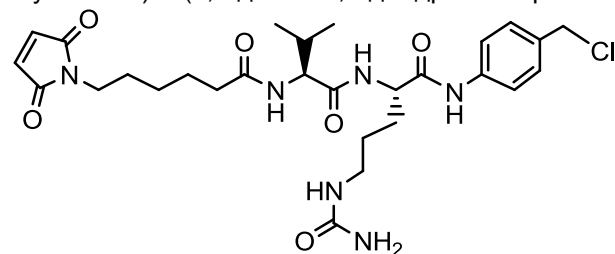
6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1Н-пірол-1-іл)-N-((S)-1-((S)-1-(4-(гідроксиметил) феніламіно)-1-оксо-5-уреїдопентан-2-іламіно)-3-метил-1-оксобутан-2-іл)гексанамід 8



8

15

N-((S)-1-((S)-1-(4-(хлорметил)феніламіно)-1-оксо-5-уреїдопентан-2-іламіно)-3-метил-1-оксобутан-2-іл)-6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1Н-пірол-1-іл)гексанамід 9



9

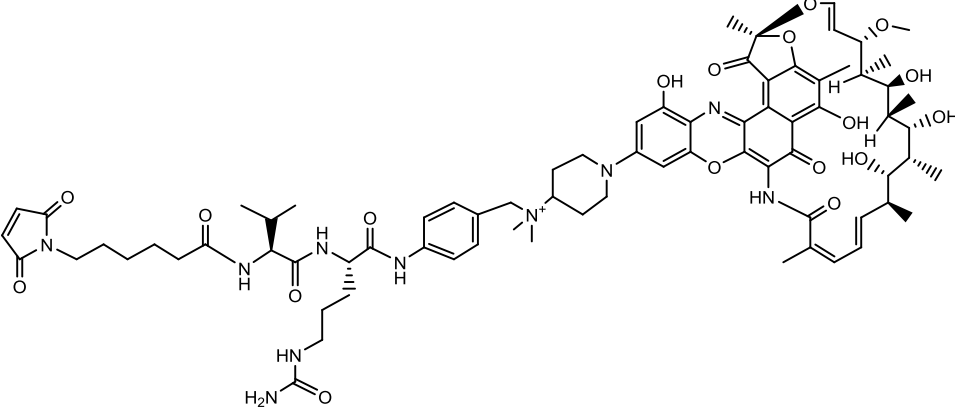
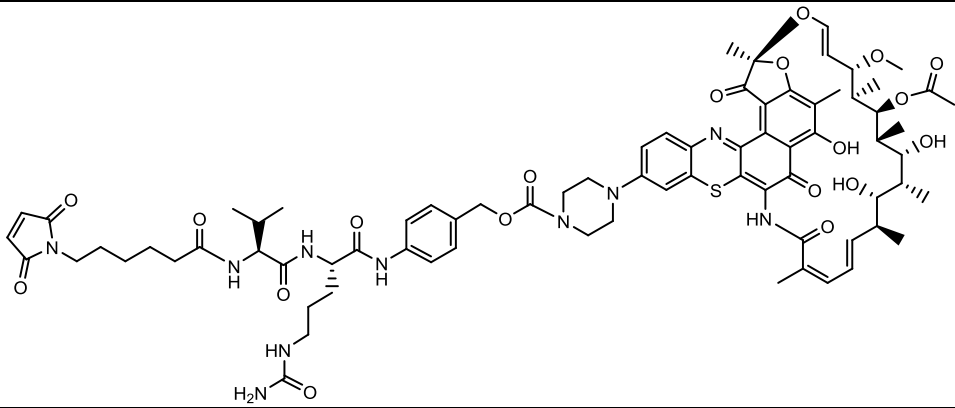
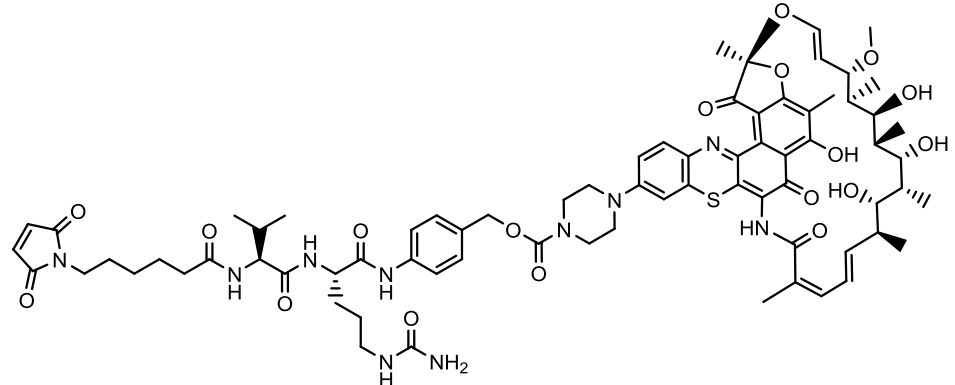
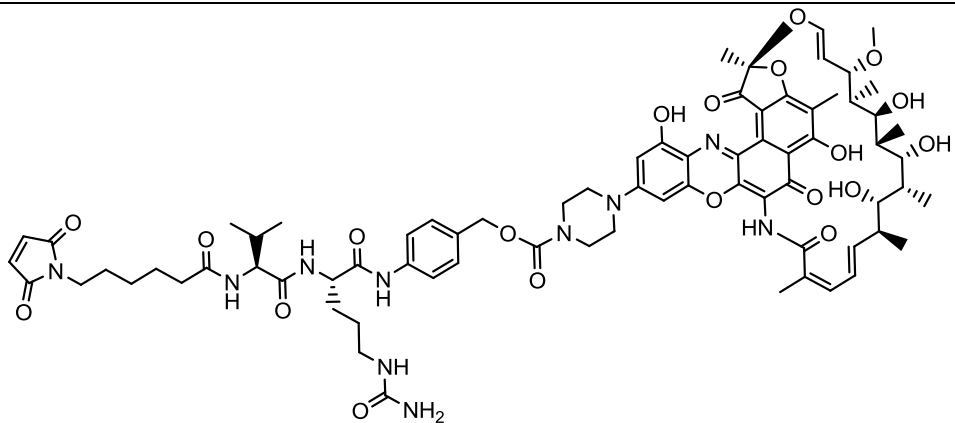
Таблиця 2

Інтермедіати лінкер-антибіотик (LA)

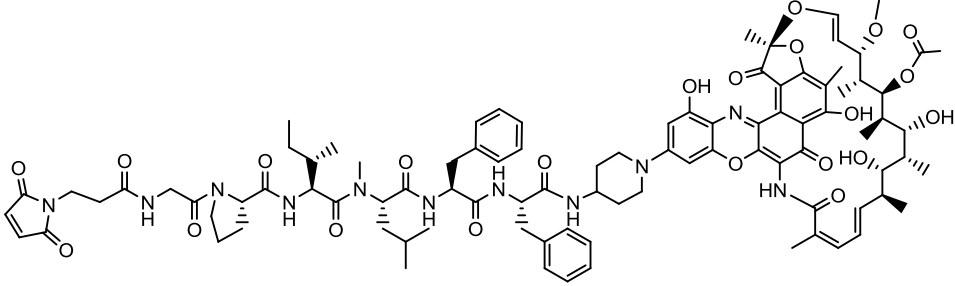
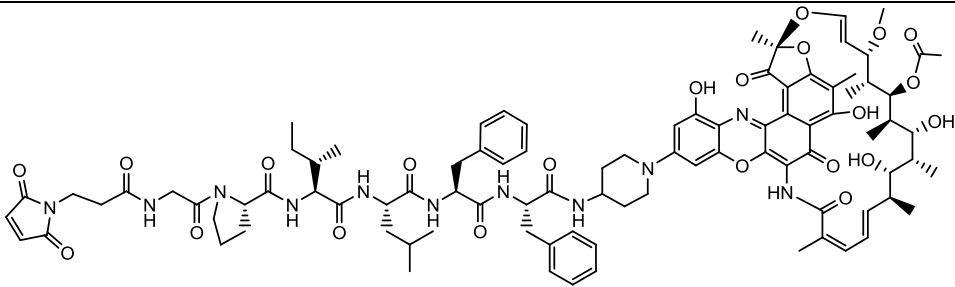
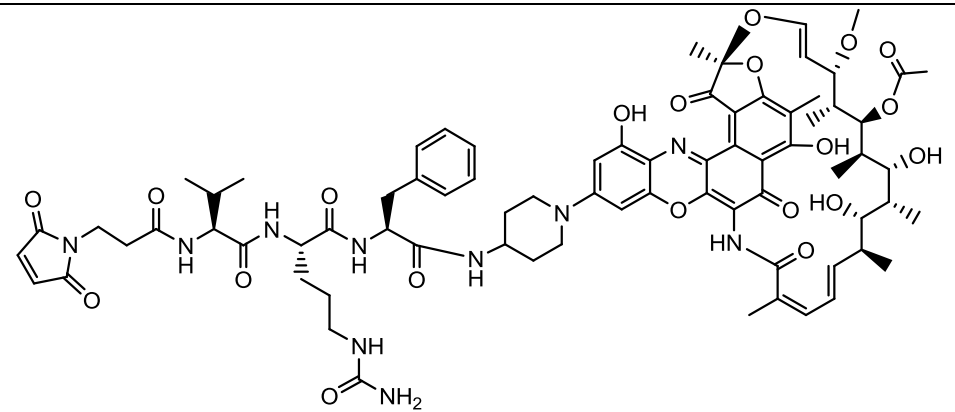
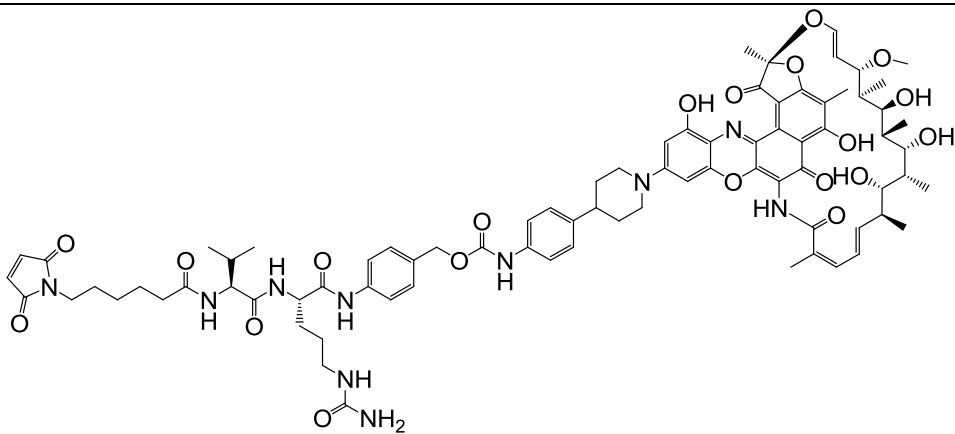
Номер LA	Структура
LA-51	

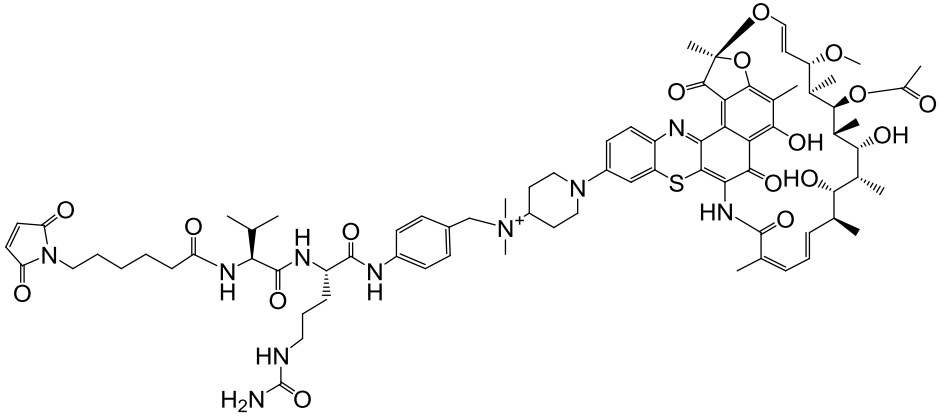
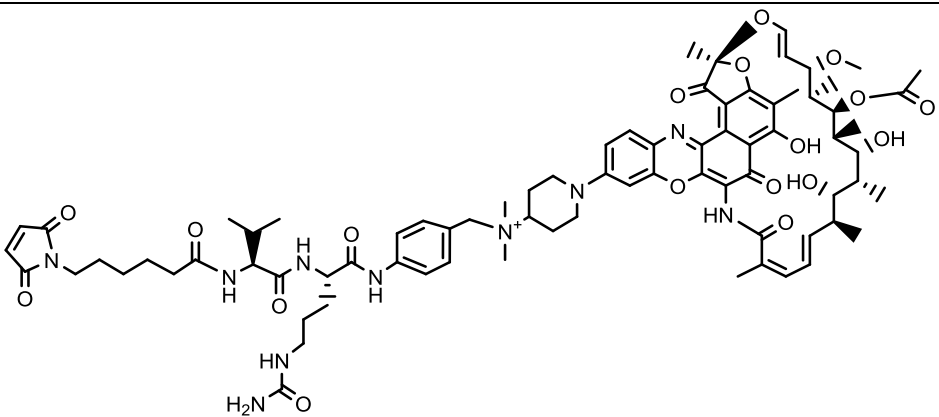
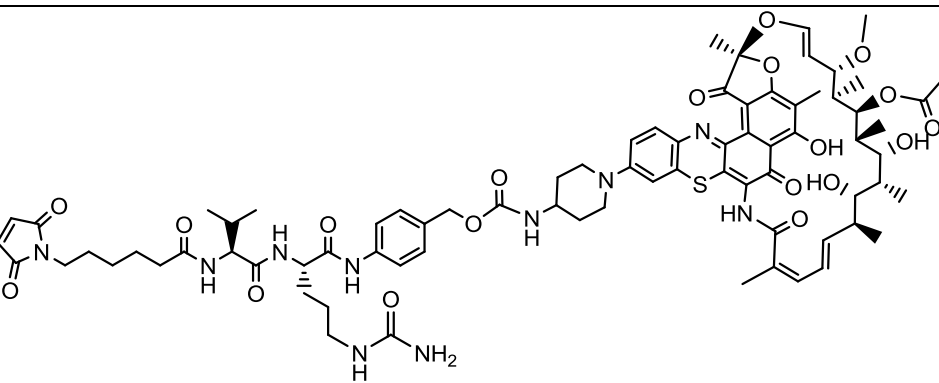
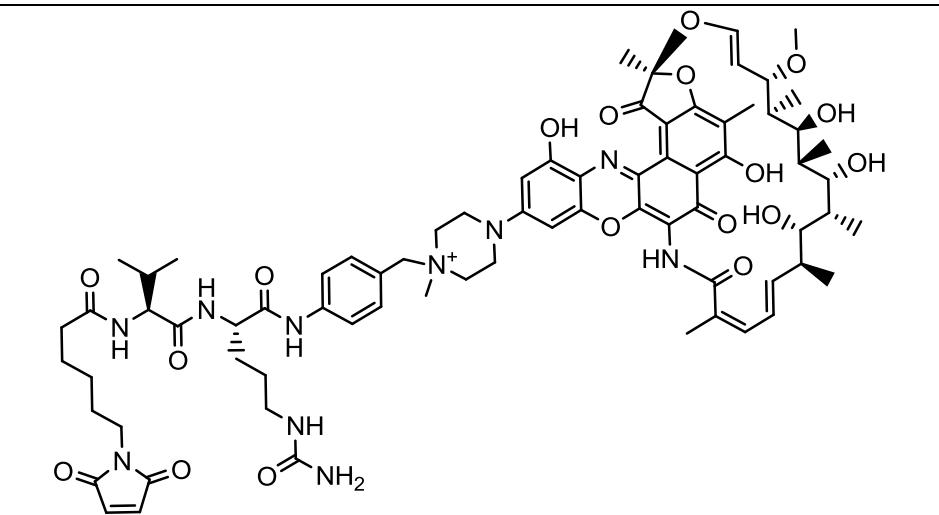
Номер LA	Структура
LA-52	
LA-53	
LA-54	
LA-55	

Номер LA	Структура
LA-56	
LA-57	
LA-58	
LA-59	
LA-60	

Номер LA	Структура
LA-61	
LA-62	
LA-63	
LA-64	

Номер LA	Структура
LA-65	
LA-66	
LA-67	
LA-68	

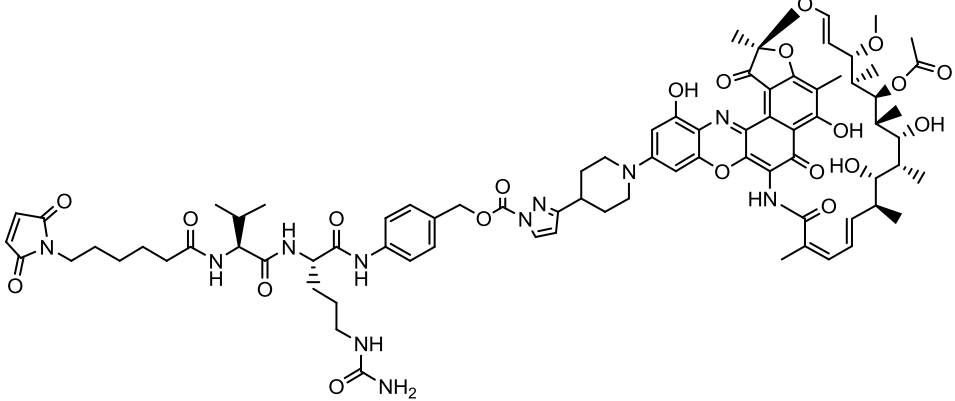
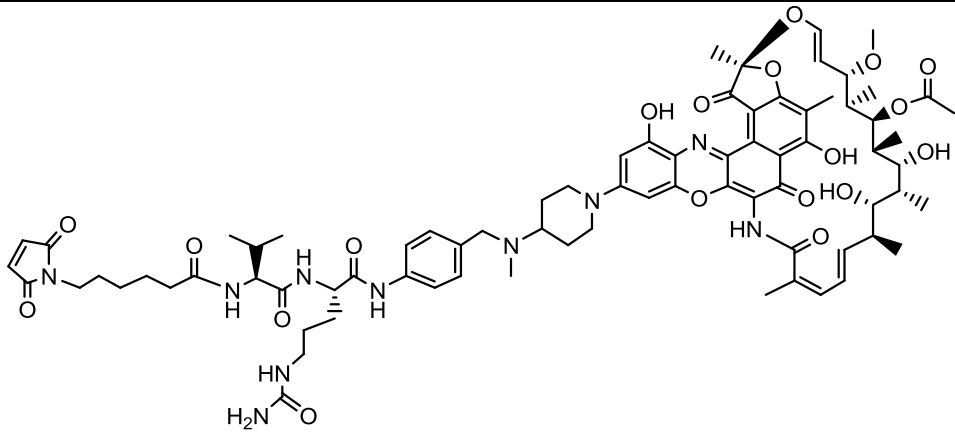
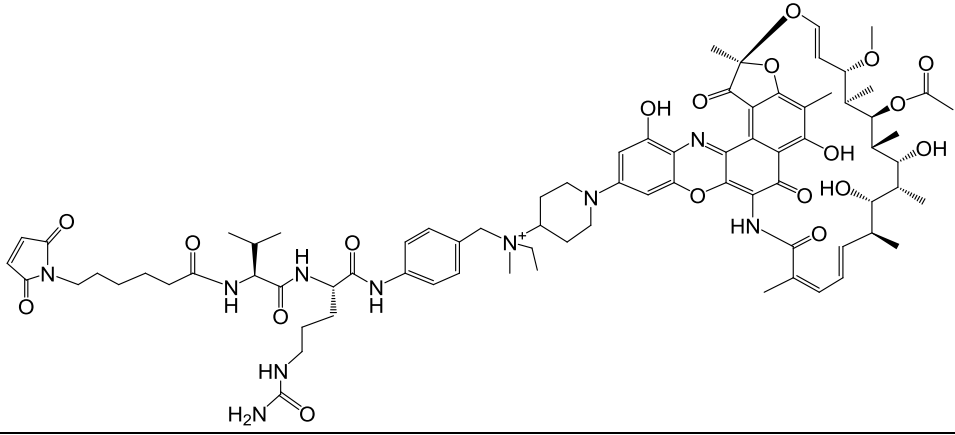
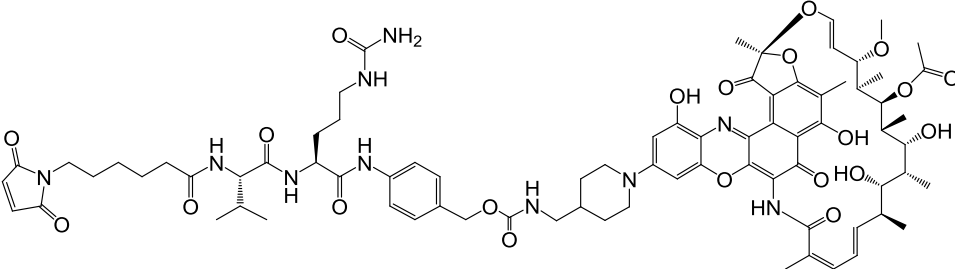
Номер LA	Структура
LA-69	
LA-70	
LA-71	
LA-72	

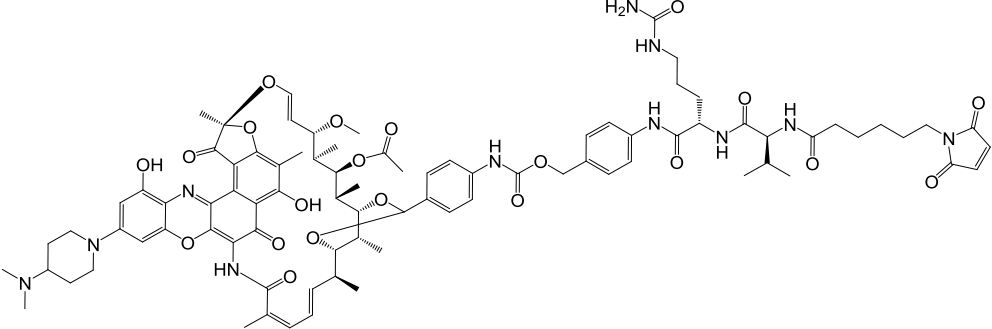
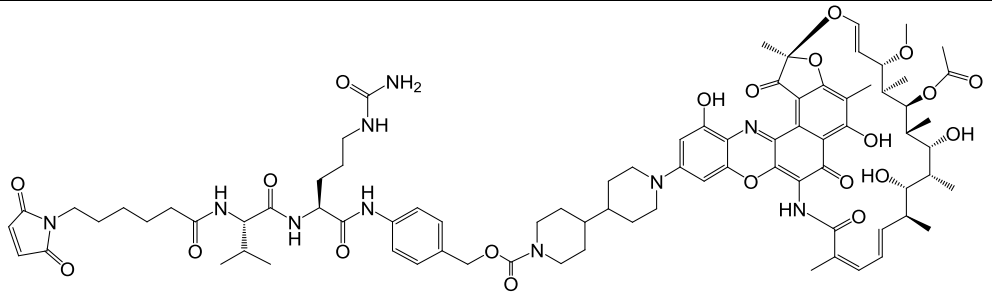
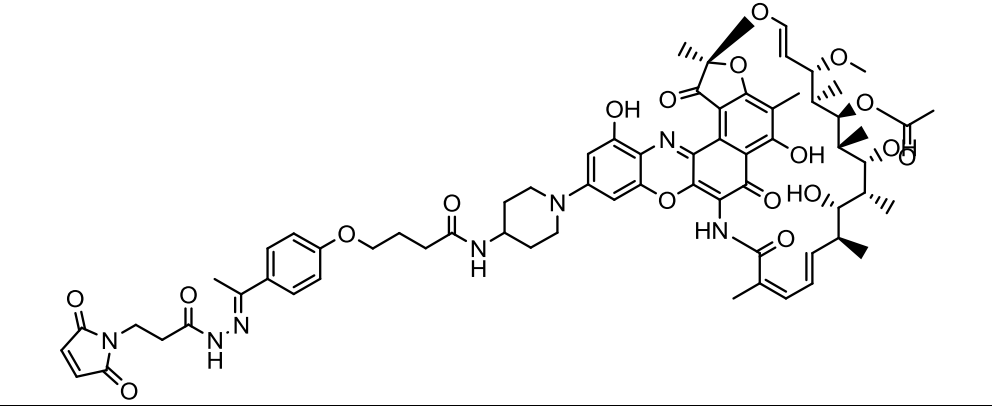
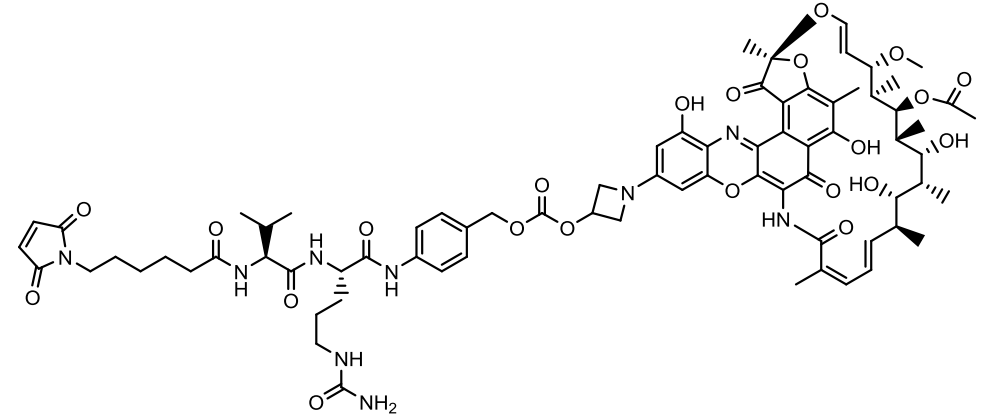
Номер LA	Структура
LA-73	
LA-74	
LA-75	
LA-76	

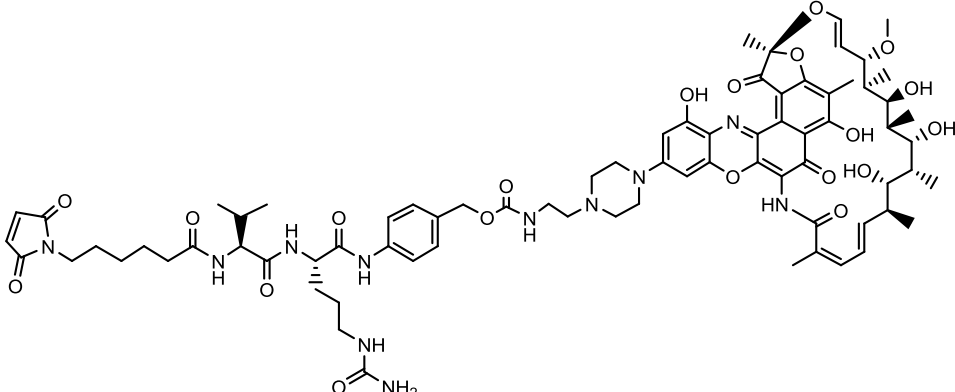
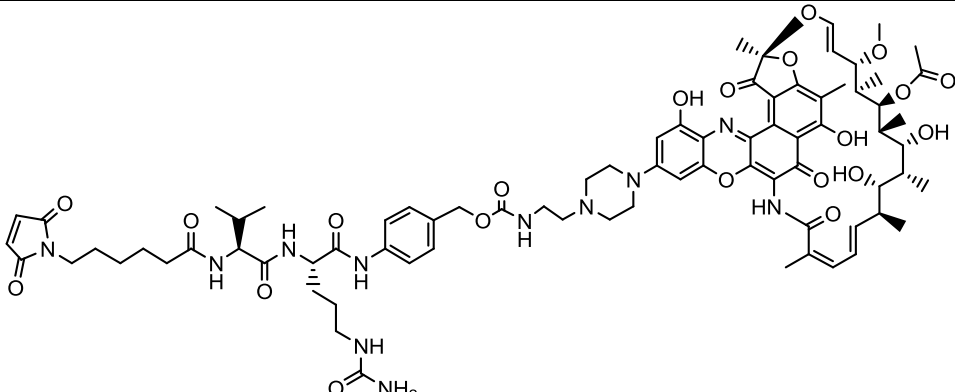
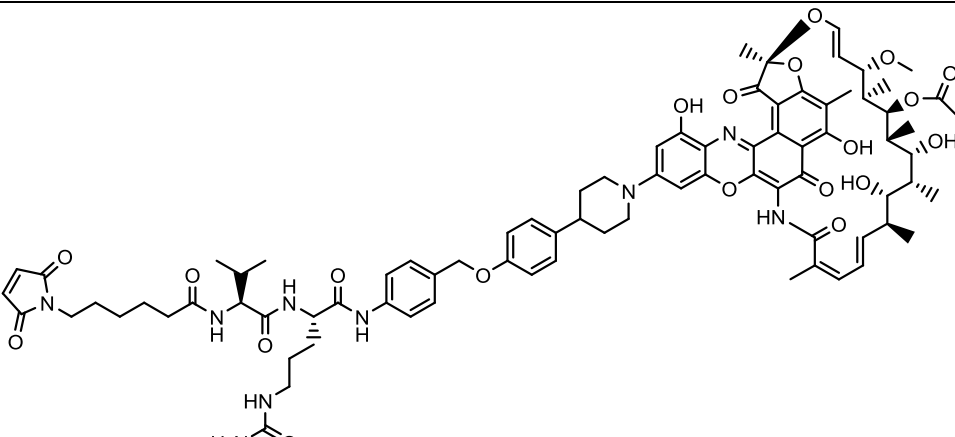
[illegible]

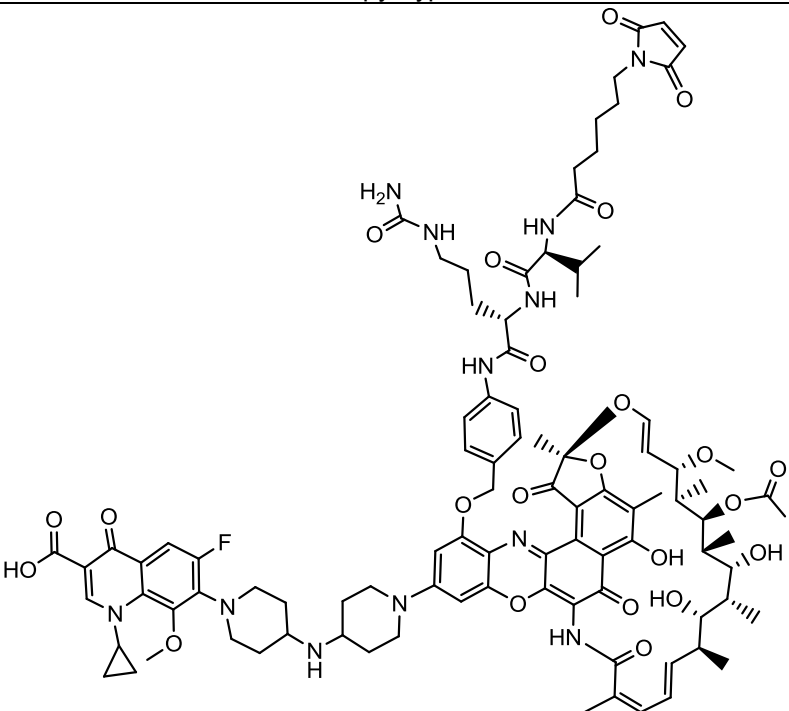
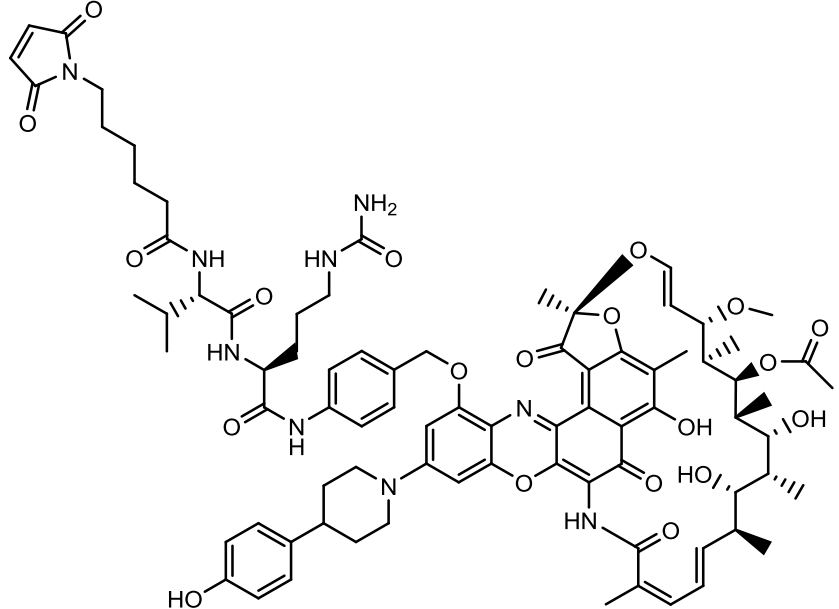
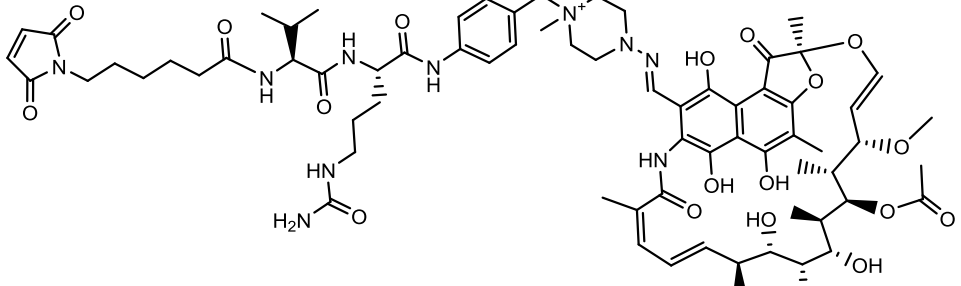
Номер LA	Структура
LA-81	
LA-82	
LA-83	
LA-84	

Номер LA	Структура
LA-85	
LA-86	
LA-87	
LA-88	

Номер LA	Структура
LA-89	
LA-90	
LA-91	
LA-92	

Номер LA	Структура
LA-93	
LA-94	
LA-95	
LA-96	

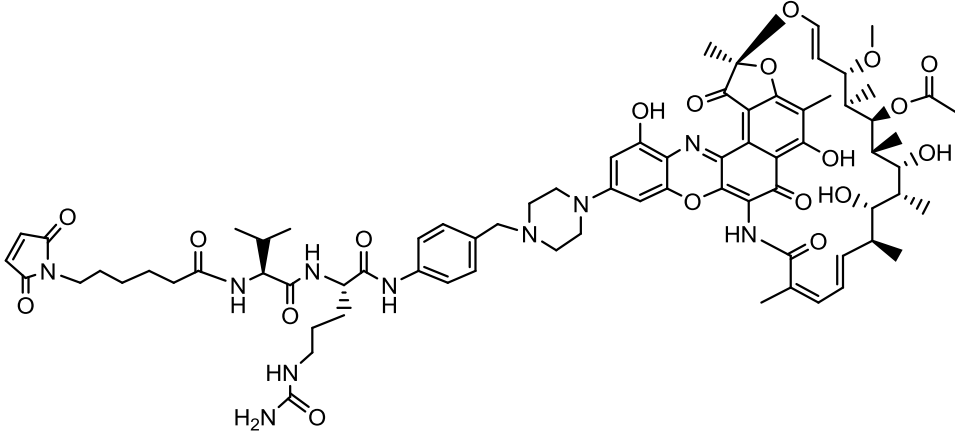
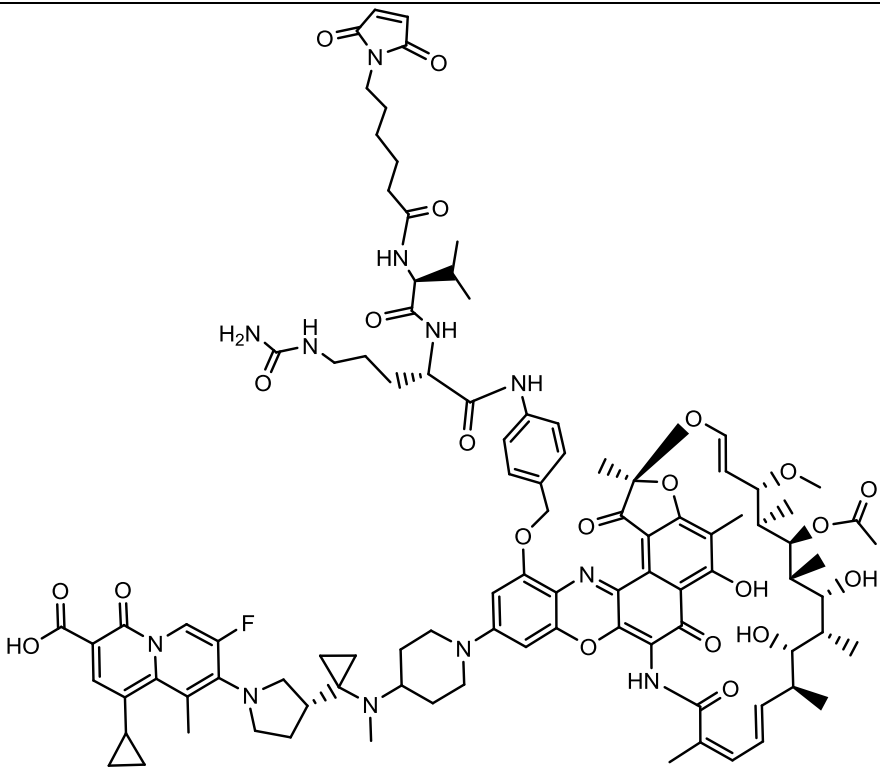
Номер LA	Структура
LA-97	
LA-98	
LA-99	

Номер LA	Структура
LA-100	 <p>Chemical structure of LA-100, a complex molecule featuring a central polycyclic core with multiple functional groups, including a carboxylic acid, a fluorine atom, and a piperidine ring. The structure is highly branched and includes a long chain with a terminal amide group.</p>
LA-101	 <p>Chemical structure of LA-101, a complex molecule featuring a central polycyclic core with multiple functional groups, including a carboxylic acid, a fluorine atom, and a piperidine ring. The structure is highly branched and includes a long chain with a terminal amide group.</p>
LA-102	 <p>Chemical structure of LA-102, a complex molecule featuring a central polycyclic core with multiple functional groups, including a carboxylic acid, a fluorine atom, and a piperidine ring. The structure is highly branched and includes a long chain with a terminal amide group.</p>

Номер LA	Структура
LA-103	
LA-104	
LA-105	
LA-106	
LA-107	

Номер LA	Структура
LA-108	
LA-109	
LA-110	
LA-111	

Номер LA	Структура
LA-112	
LA-113	
LA-114	
LA-115	

Номер LA	Структура
LA-116	 <p>Chemical structure of LA-116, a complex molecule featuring a central chromane core. The structure includes a long chain with a terminal amide group (H₂N-C(=O)-NH-) and a terminal amide group (-NH-C(=O)-CH₂-CH₂-N-). The chain is connected to a phenyl ring, which is further linked to a piperazine ring. The piperazine ring is connected to a chromane core, which is substituted with a hydroxyl group (OH) and a methoxy group (OCH₃). The chromane core is also substituted with a long chain containing a terminal amide group (H₂N-C(=O)-NH-) and a terminal amide group (-NH-C(=O)-CH₂-CH₂-N-).</p>
LA-117	 <p>Chemical structure of LA-117, a complex molecule featuring a central chromane core. The structure includes a long chain with a terminal amide group (H₂N-C(=O)-NH-) and a terminal amide group (-NH-C(=O)-CH₂-CH₂-N-). The chain is connected to a phenyl ring, which is further linked to a piperazine ring. The piperazine ring is connected to a chromane core, which is substituted with a hydroxyl group (OH) and a methoxy group (OCH₃). The chromane core is also substituted with a long chain containing a terminal amide group (H₂N-C(=O)-NH-) and a terminal amide group (-NH-C(=O)-CH₂-CH₂-N-).</p>

Номер LA	Структура
LA-118	

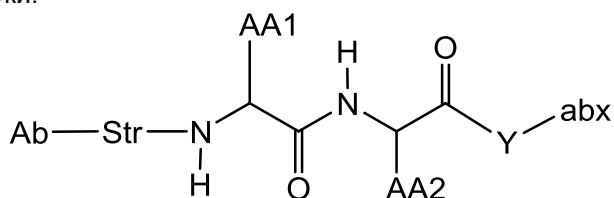
ВАРІАНТИ ВТІЛЕННЯ КОН'ЮГАТІВ АНТИТІЛО-АНТИБІОТИК

Антитіло S4497 було кон'юговано з похідними рифаміцину, зазначеним у Таблиці 3, що називається рірBOR, і іншими похідними рифаміцину, за допомогою пептидного лінкера, розщеплюваного протеазою. Лінкер сконструйований таким чином, щоб він міг бути розщеплений лізосомальними протеазами, у тому числі катепсинами B, D та іншими протеазами, що розпізнають пептидні фрагменти, включаючи дипептид валін-цитрулін (val-cit, vc) (Dubowchik et al (2002) Bioconj. Chem. 13:855-869). Утворення інтермедіату лінкер-антибіотик, що складається з антибіотика та лінкера MC-vc-PAB або інших лінкерів, докладно описано у Прикладах 1-17. Лінкер сконструйований таким чином, що розщеплення амідного зв'язку у фрагменті PAB призводить до відділення антитіла від антибіотика в активному стані.

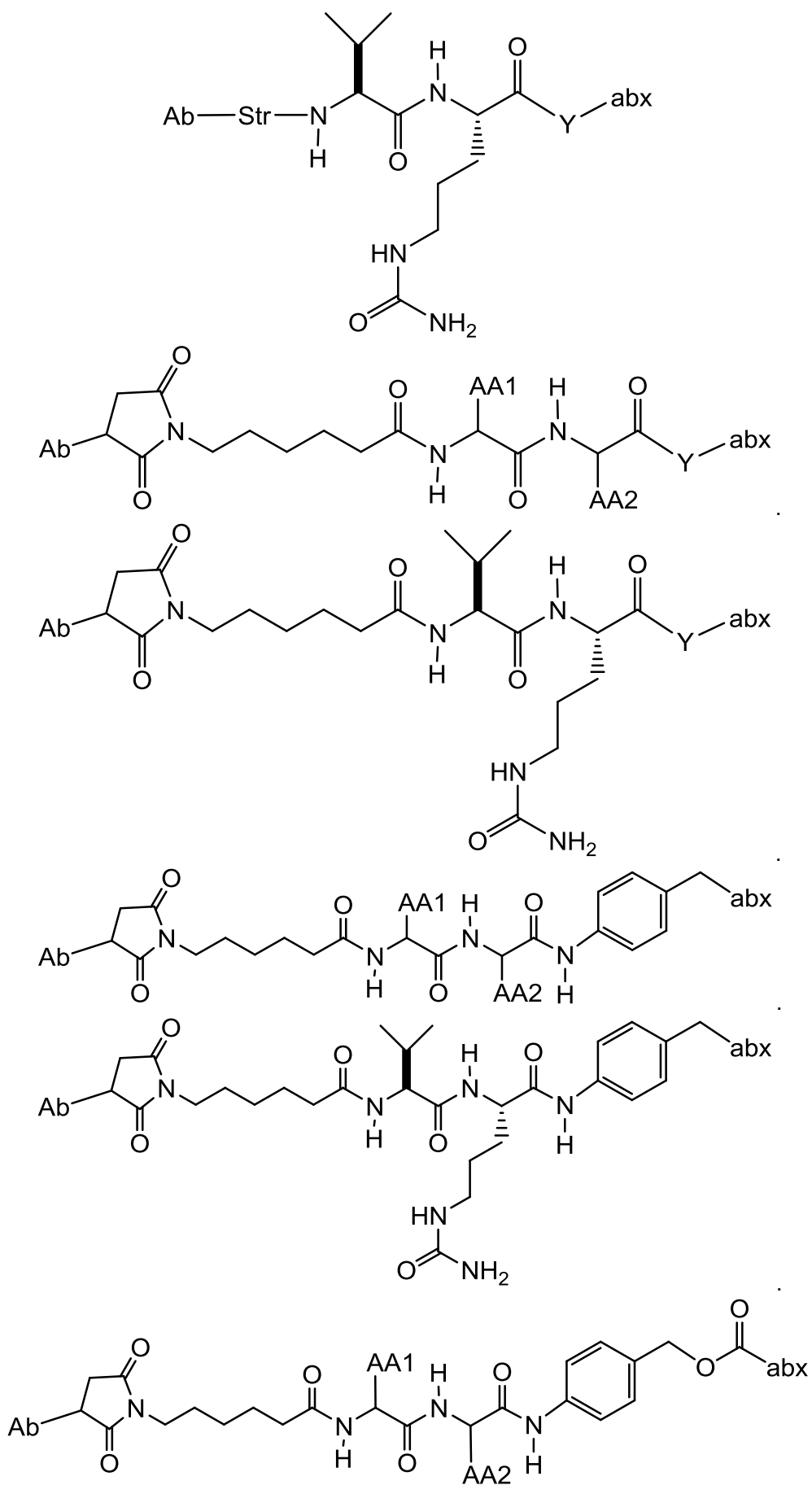
AAC, що називається S4497-диметил-рірBOR, ідентичний S4497-рірBOR AAC за винятком наявності диметилірованої аміногрупи в антибіотику та оксикарбонільної групи в лінкері.

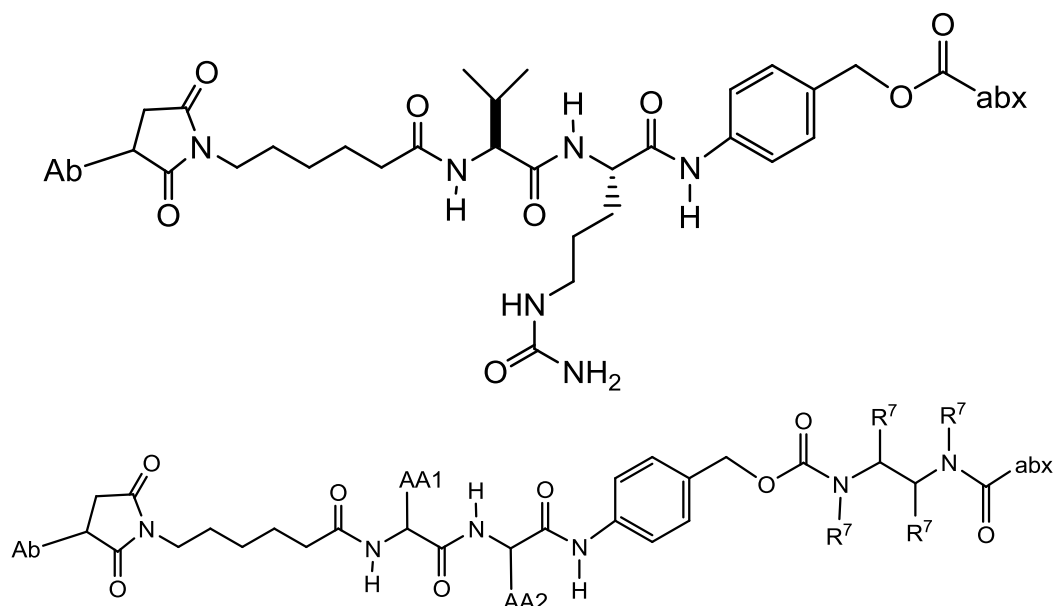
На Фіг. 5 наведений можливий механізм активації лікарського засобу для кон'югатів антитіло-антибіотик (AAC). Активний антибіотик (Ab) вивільняється тільки після інтерналізації AAC всередину клітин ссавців. Fab фрагмент антитіла в AAC зв'язується з *S. aureus*, тоді як фрагмент Fc AAC підсилює поглинання бактерій за рахунок зв'язування через Fc-рецептор із фагоцитарними клітинами, у тому числі нейтрофілами та макрофагами. Після інтерналізації у фаголізосоми лінкер Val-Cit розщеплюється лізосомальними протеазами з вивільненням активного антибіотика всередині фаголізосоми.

Один із варіантів втілення сполук кон'югатів антитіло-антибіотик (AAC) даного винаходу включає наступні сполуки:

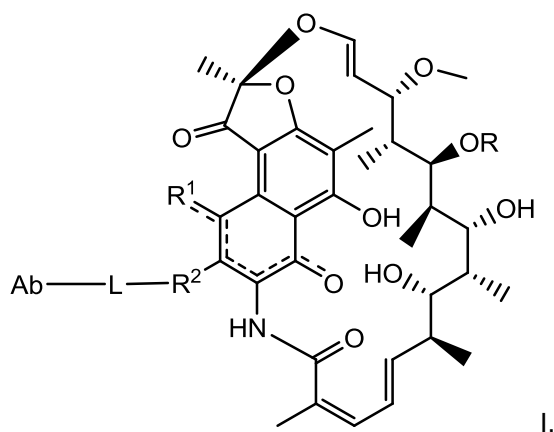


де AA1 і AA2 незалежно вибрані з бічних ланцюгів амінокислот, включаючи H, -CH₃, -CH₂(C₆H₅), -CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂, -CHCH(CH₃)CH₃ і -CH₂CH₂CH₂NHC(O)NH₂; і включає формули:





Один із варіантів втілення сполук кон'югатів антитіло-антибіотик (AAC) даного винаходу включає наступні сполуки:



де:

пунктирні лінії означають необов'язковий зв'язок;

R являє собою H, C₁-C₁₂ алкіл або C(O)CH₃;

R¹ являє собою OH;

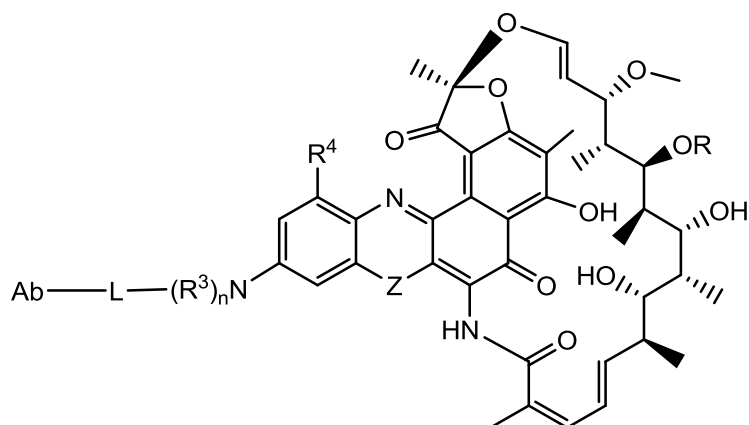
R² являє собою CH=N-(гетероцикл), де гетероцикл необов'язково заміщений однією або декількома групами, незалежно вибраними з C(O)CH₃, C₁-C₁₂ алкілу, C₁-C₁₂ гетероарилу, C₂-C₂₀ гетероциклілу, C₆-C₂₀ арилу та C₃-C₁₂ карбоциклілу;

або R¹ і R² утворюють п'яти- або шестичленний конденсований гетероарил або гетероциклілу, і необов'язково утворюють спірозчленоване або конденсоване шестичленне гетероарильне, гетероциклільне, арильне або карбоциклільне кільце, де спірозчленоване або конденсоване шестичленне гетероарильне, гетероциклільне, арильне або карбоциклільне кільце необов'язково заміщене H, F, Cl, Br, I, C₁-C₁₂ алкілом або OH;

L являє собою пептидний лінкер, приєднаний до R² або конденсованому гетероарилу або гетероциклілу, утвореним R¹ і R²; і

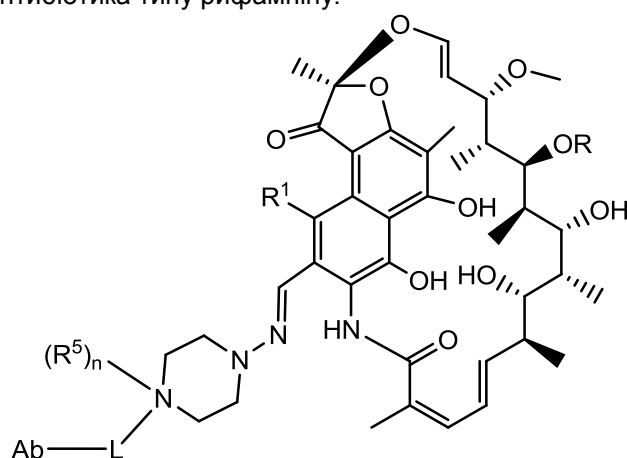
Ab являє собою антитіло проти тейхоєвих кислот клітинної стінки (WTA).

Один із варіантів втілення сполук кон'югатів антитіло-антибіотик даного винаходу включає наступні сполуки:



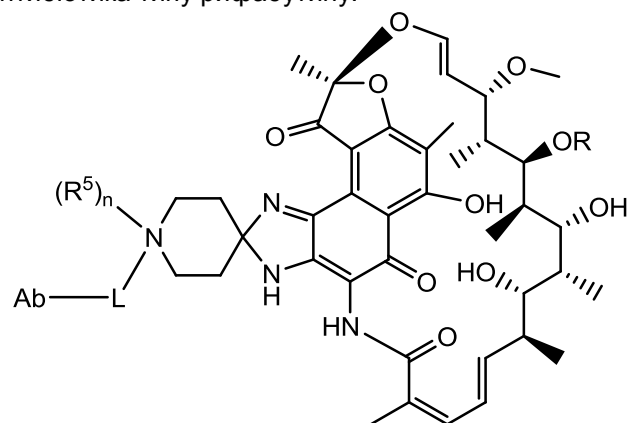
де R^3 незалежно вибраний з H і C_1 - C_{12} алкілу; n являє собою 1 або 2; R^4 вибраний з H, F, Cl, Br, I, C_1 - C_{12} алкілу та OH; і Z вибраний з NH, N(C_1 - C_{12} алкілу), O і S.

Один із варіантів втілення сполук кон'югатів антитіло-антибіотик даного винаходу включає наступний фрагмент антибіотика типу рифампіну:



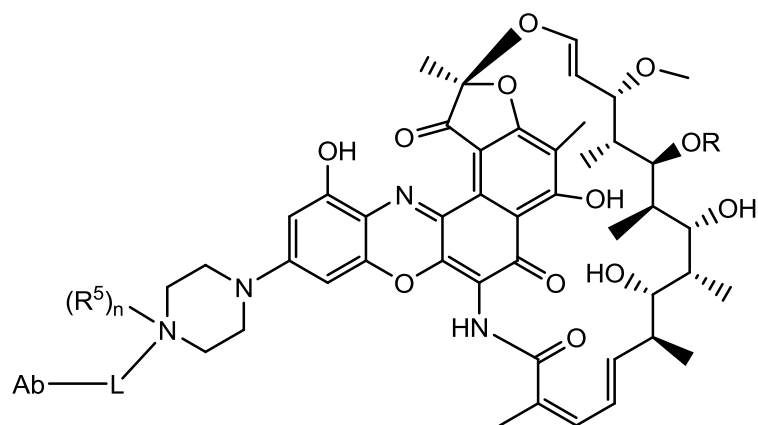
де R^5 вибраний з H і C_1 - C_{12} алкілу; і n являє собою 0 або 1.

Один із варіантів втілення сполук кон'югатів антитіло-антибіотик даного винаходу включає наступний фрагмент антибіотика типу рифабутину:



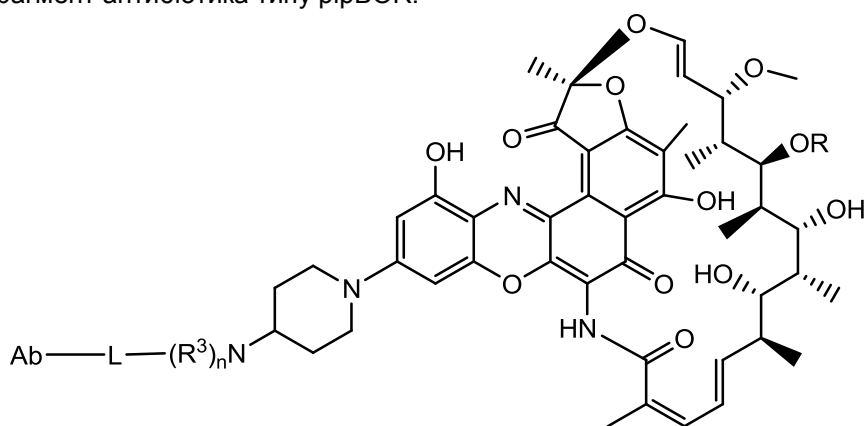
де R^5 вибраний з H і C_1 - C_{12} алкілу; і n являє собою 0 або 1.

Один із варіантів втілення сполук кон'югатів антитіло-антибіотик даного винаходу включає наступний фрагмент антибіотика типу рифалазилу:



де R^5 незалежно вибраний з H і C_1 - C_{12} алкілу; і n являє собою 0 або 1.

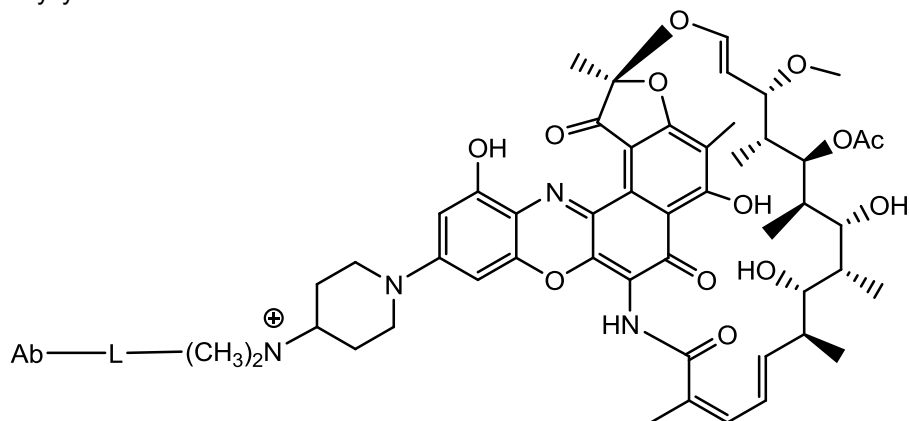
Один із варіантів втілення сполук кон'югатів антитіло-антибіотик даного винаходу включає наступний фрагмент антибіотика типу ріпBOR:



5

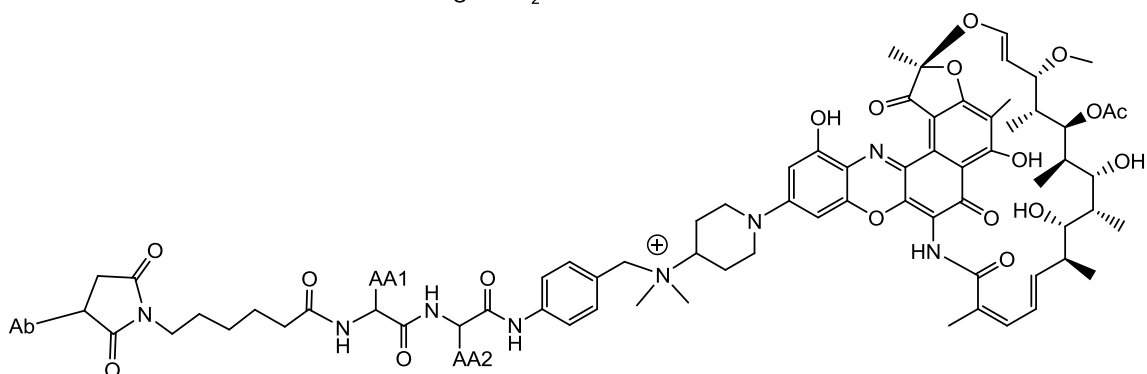
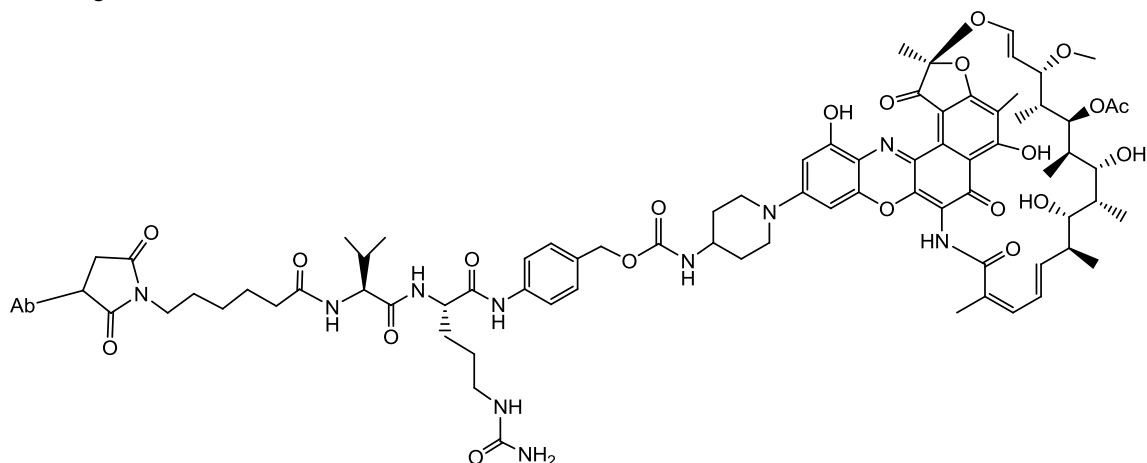
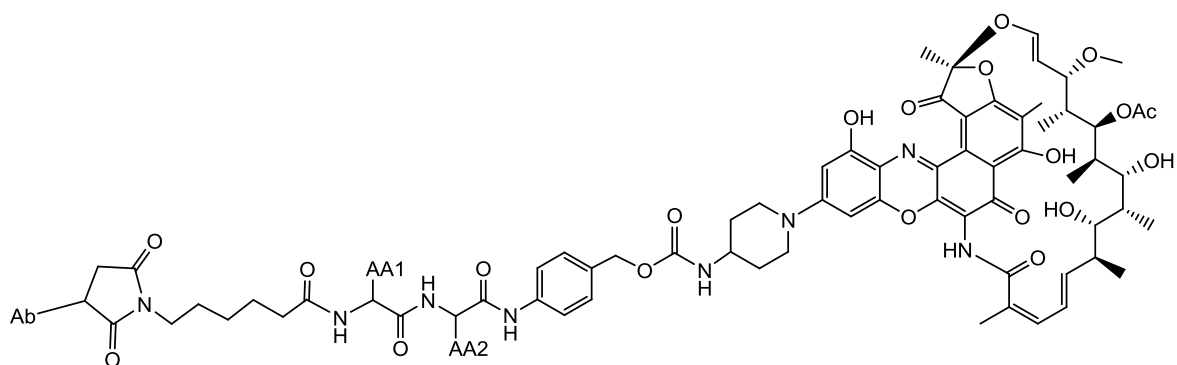
де R^3 незалежно вибраний з H і C_1 - C_{12} алкілу; і n являє собою 1 або 2.

Один із варіантів втілення сполук кон'югатів антитіло-антибіотик даного винаходу включає наступну сполуку:

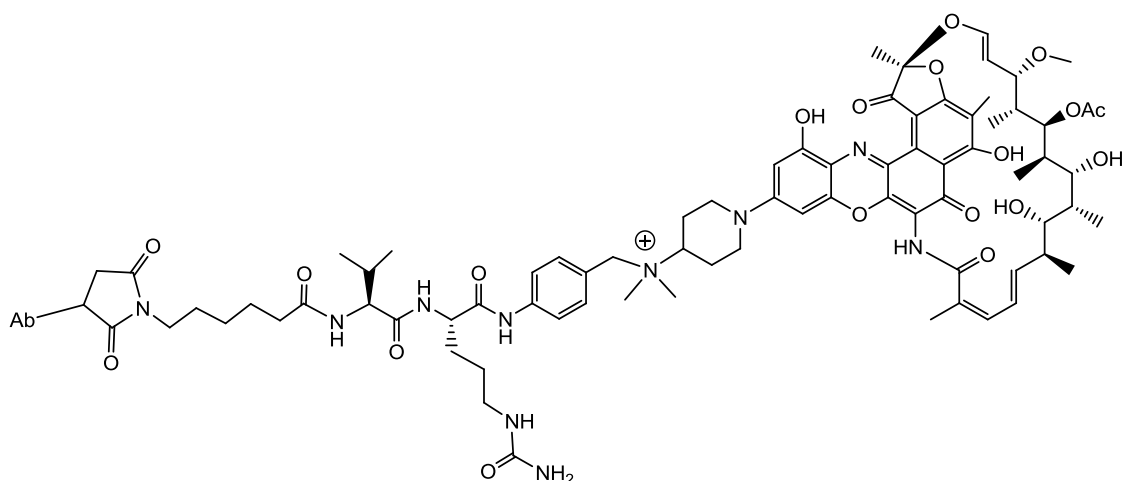


10

Інші варіанти втілення сполук кон'югат антитіло-антибіотик даного винаходу включають наступні сполуки:



i



5

НАВАНТАЖЕННЯ АНТИБІОТИКА ДЛЯ ААС

Навантаження антибіотика виражається параметром p , і являє собою середню кількість фрагментів антибіотика (abx) на антитіло в молекулі, що відповідає формулі I. Навантаження антибіотика може варіювати в діапазоні від 1 до 20 фрагментів антибіотика (D) на антитіло.

AAC, що відповідає формулі I, включає набір або пул антитіл, кон'югованих з різною кількістю фрагментів антибіотиків, від 1 до 20. Середню кількість фрагментів антибіотика на антитіло у препаратах AAC, отриманих реакцією кон'югації, можна охарактеризувати звичайними способами, такими як мас-спектрометрія, ІФА аналіз і ВЕРХ. Також можна визначити кількісний розподіл AAC за значеннями r . У деяких випадках поділ та очищення гомогенного AAC, у якого r являє собою певне значення, від AAC з іншими навантаженнями антибіотика, а також вивчення його властивостей можна досягти такими способами як звернена-фазова ВЕРХ або електрофорез.

Для деяких кон'югатів антитіло-антибіотик r може бути обмежено кількістю сайтів приєднання на антитілі. Наприклад, якщо приєднання здійснюється за тіолом цистеїну, як в ілюстративних варіантах втілення, наведених вище, антитіло може мати тільки одну або декілька тіольних груп цистеїну, або може мати тільки одну або декілька досить реакційноздатних тіольних груп, за якими може бути приєднаний лінкер. У деяких варіантах втілення, більш високе навантаження антибіотика, наприклад $r > 5$, може викликати агрегацію, нерозчинність, токсичність або втрату здатності проникати в клітини для певних кон'югатів антитіло-антибіотик. У деяких варіантах втілення, навантаження антибіотика для AAC даного винаходу варіює від 1 до приблизно 8; від приблизно 2 до приблизно 6; від приблизно 2 до приблизно 4; або від приблизно 3 до приблизно 5; або становить приблизно 4; або приблизно 2.

У деяких варіантах втілення, у ході реакції кон'югації з антитілом кон'югують меншу кількість фрагментів антибіотика у порівнянні з теоретичним максимумом. Антитіло може містити, наприклад, залишки лізину, які не реагують з інтермедіатом антибіотик-лінкер або лінкерним реагентом, як обговорюється нижче. Як правило, антитіла не містять багато вільних і реакційноздатних тіольних груп цистеїну, які можуть бути зв'язані з фрагментом антибіотика; у дійсності, більшість тіольних залишків цистеїну в антитілах існують у вигляді дисульфідних містків. У деяких варіантах втілення, антитіло може бути відновлено відновлюючим агентом, таким як дитіотреїтол (DTT) або трикарбонілетилфосфін (TCEP), у частково або повністю відновлюючих умовах, з утворенням тіольних груп цистеїну. У деяких варіантах втілення, антитіло піддають впливу денатуруючих умов для виявлення реакційноздатних нуклеофільних груп, таких як лізин або цистеїн.

Навантаження (співвідношення антибіотик/антитіло, "AAR") для AAC можна контролювати різними способами, наприклад: (i) обмежуючи молярний надлишок інтермедіату антибіотик-лінкер або лінкерного реагенту щодо антитіла, (ii) обмежуючи тривалість або температуру реакції кон'югації, і (iii) використовуючи часткові або обмежені відновлюючі умови, для модифікації тіолу цистеїну.

Варто розуміти, що якщо з інтермедіатом антибіотик-лінкер або з лінкерним реагентом і далі з реагентом фрагментом антибіотика реагує більше однієї нуклеофільної групи, то отриманий продукт являє собою суміш сполук AAC, у яких до антитіла прикріплені один або більше фрагментів антибіотиків. Середню кількість антибіотиків на антитіло для суміші можна розрахувати за допомогою подвійного аналізу ELISA з антитілами, які специфічні для антитіла та специфічні для антибіотика. Індивідуальні молекули AAC можуть бути ідентифіковані в суміші за допомогою мас-спектрометрії та розділені за допомогою ВЕРХ, наприклад, за допомогою хроматографії гідрофобних взаємодій (дивіться, наприклад, McDonagh et al (2006) Prot. Engr. Design & Selection 19(7):299-307; Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Hamblett, K.J., et al. "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004; Alley, S.C., et al. "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004). У деяких варіантах втілення, гомогенний AAC з однаковим значенням навантаження антибіотиком може бути виділений з суміші за допомогою електрофорезу або хроматографії. Антитіла з введенням методом генної інженерії цистеїном даного винаходу являють собою більш гомогенні препарати, оскільки реакційноздатні сайти на антитілі в основному обмежені тіолами цистеїнів, введених методами генної інженерії. В одному з варіантів втілення, середня кількість фрагментів антибіотика на антитіло перебуває в діапазоні від приблизно 1 до приблизно 20. У деяких варіантах втілення, діапазон вибирають і контролюють на рівні від приблизно 1 до 4.

СПОСОБИ ОДЕРЖАННЯ КОН'ЮГАТИВ АНТИТІЛО-АНТИБІОТИК

AAC, що відповідає формулі I, може бути отриманий декількома способами з використанням реакцій, умов і реагентів з області органічної хімії, відомих фахівцям у даній області техніки, включаючи: (1) реакцію нуклеофільної групи антитіла з бівалентним лінкерним реагентом з

утворенням Ab-L за допомогою ковалентного зв'язку та наступну реакцію з фрагментом антибіотика (abx); і (2) реакцію нуклеофільної групи фрагмента антибіотика з бівалентним лінкерним реагентом з утворенням L-abx за допомогою ковалентного зв'язку та наступну реакцію з нуклеофільною групою антитіла. Приклади способів одержання AAC, що відповідають формулі I, описаним вище шляхом, описані в US 7498298, що спеціально включений у даний документ за допомогою посилання.

Нуклеофільні групи антитіла включають, без обмеження: (i) N-кінцеві аміногрупи, (ii) аміногрупи бічного ланцюга, наприклад, лізину, (iii) тіольні групи бічного ланцюга, наприклад, цистеїну, і (iv) гідроксильні групи або аміногрупи цукру, якщо антитіло глікозильоване. Аміногрупи, тіольні та гідроксильні групи є нуклеофільними і можуть реагувати з утворенням ковалентних зв'язків з електрофільними групами лінкерних фрагментів і лінкерних реагентів, включаючи (i) активовані складні ефіри, такі як NHS ефіри, HOBT ефіри, галогенформіати та галогенангідриди; (ii) алкіл і бензилгалогеніди, такі як галогенацетаміди; (iii) альдегіди, кетони, карбоксильні та малеїмідні групи. Деякі антитіла містять відновлювані міжланцюгові дисульфідні зв'язки, тобто цистеїнові містки. Антитіла можна зробити реакційноздатними для кон'югації з лінкерними реагентами шляхом обробки відновлюючим агентом, таким як DTT (дитіотреїтол) або трикарбонілетилфосфін (TCPE), так що антитіло частково або повністю відновлюється. Кожен цистеїновий місток буде теоретично утворювати, таким чином, два реакційноздатних тіольних нуклеофіли. Додаткові нуклеофільні групи можуть бути введені в антитіла за допомогою модифікації залишків лізину, наприклад, за рахунок реакції залишків лізину з 2-імінотіолоном (реагент Траута), що призводить до перетворення аміну в тіол. Реакційноздатні тіольні групи можуть бути введені в антитіло за рахунок введення одного, двох, трьох, чотирьох або більшого числа залишків цистеїну (наприклад, одержуючи варіанти антитіл, що включають один або декілька неприродних амінокислотних залишків цистеїну).

Кон'югати антитіло-антибіотик даного винаходу також можуть бути отримані реакцією між електрофільною групою на антитілі, такою як альдегідна або кетонна карбонільна група, і нуклеофільною групою на лінкерному реагенті або антибіотику. Використовувані нуклеофільні групи на лінкерному реагенті включають гідразид, оксим, аміно, гідразин, тіосемікарбазон, гідразинкарбоксилат й арилгідразид, але не обмежуються ними. В одному з варіантів втілення, антитіло модифіковане для введення електрофільних фрагментів, які можуть реагувати з нуклеофільними замісниками на лінкерному реагенті або антибіотику. В іншому варіанті втілення, цукри глікозильованого антитіла можуть бути окиснені, наприклад, окислюючими реагентами на основі періодату, з утворенням альдегідних або кетонних груп, які можуть реагувати з аміногрупою лінкерного реагенту або фрагменту антибіотика. Одержувані іміногрупи основи Шиффа можуть утворювати стабільний зв'язок або можуть бути відновлені, наприклад, борогідридними реагентами, з утворенням стабільних амінних зв'язків. В одному з варіантів втілення, реакція вуглеводної частини глікозильованого антитіла з галактозооксидазою, або з метаперіодатом натрію може призводити до утворення карбонільних (альдегідних і кетонних) груп в антитілі, які можуть реагувати з відповідними групами на антибіотику (Hermanson, Bioconjugate Techniques). В іншому варіанті втілення антитіла, що містять N-кінцеві залишки серину або треоніну, можуть реагувати з метаперіодатом натрію, що призводить до утворення альдегіду замість першої амінокислоти (Geoghegan & Stroh, (1992) *Bioconjugate Chem.* 3:138-146; US 5362852). Такий альдегід може реагувати з фрагментом антибіотика або нуклеофілом лінкера.

Нуклеофільні групи на фрагменті антибіотика включають, без обмеження, аміно, тіольні, гідроксильні, гідразидні, оксимні, гідразинові, тіосемікарбазонові, гідразинкарбоксилатні й арилгідразидні групи, здатні реагувати з утворенням ковалентних зв'язків з електрофільними групами на лінкерних фрагментах і лінкерних реагентах, включаючи (i) активовані складні ефіри, такі як NHS ефіри, HOBT ефіри, галогенформіати та галогенангідриди; (ii) алкіл і бензилгалогеніди, такі як галогенацетаміди; (iii) альдегіди, кетони, карбоксильні та малеїмідні групи.

Кон'югати антитіло-антибіотик (AAC), наведені в Таблиці 3, були отримані кон'югацією описаних анти-WTA антитіл з інтермедіатами лінкер-антибіотик, наведеними в Таблиці 2, згідно зі способами, описаними у Прикладі 24. Ефективність AAC тестували в аналізі з макрофагами *in vitro* (Приклад 18) і в моделі мишачих нирок *in vivo* (Приклад 19).

Таблиця 3

Кон'югати антитіло-антибіотик (AAC)

Номер AAC	Формула AAC	лінкер-abx LA № (Таблиця 2)	AAR*
AAC-101	тіо-трастузумаб HC A118C-MC-vc-PAB-(диметил- pipBOR)	LA-54	1,8
AAC-102	тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(pipBOR)	LA-51	1,9
AAC-103	тіо-S4497-HC-A114C-MC-fk-PABC-(pipBOR)	LA-52	1,0
AAC-104	тіо-S4497-HC-A114C-MP-vc-PABC-(pipBOR)	LA-53	1,8
AAC-105	тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(диметилpipBOR)	LA-54	1,73
AAC-106	тіо-S4462-HC-A118C-MC-vc-PAB-(диметилpipBOR)	LA-54	1,9
AAC-107	тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(монометилпір, деацетилBOR)	LA-55	1,75
AAC-108	тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(монометилпірBOR)	LA-56	1,5
AAC-109	тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(пір, деацетилBOR)	LA-57	1,9
AAC-110	тіо-hu-анти g 5B5-HC-A118C-MC-vc-PAB- (диметилpipBOR)	LA-54	1,94
AAC-111	тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(рифабутин)	LA-58	1,6
AAC-112	тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(диметил-pipBOR)	LA-54	1,65
AAC-113	тіо-S4497 HC-MC-GGAFAGGG-(pipBOR) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 126)	LA-59	1,6
AAC-114	тіо-S4462 HC-MC-GGAFAGGG-(pipBOR) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 126)	LA-59	1,8
AAC-115	тіо-Tmab LC-MC-GGAFAGGG-(pipBOR) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 126)	LA-59	1,7
AAC-116	тіо-S7578-MC-vc-PAB-(диметил-pipBOR)	LA-54	tbd
AAC-117	тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(pipBOR)	LA-51	tbd
AAC-118	тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(оксиBOR)	LA-60	1,8
AAC-119	тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(диметилпір, деацетилBOR)	LA-61	1,7
AAC-120	тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(піперазBTR)	LA-62	1,8
AAC-121	тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(піпераз, деацетилBTR)	LA-63	1,8
AAC-122	тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(диметилpipBOR)	LA-54	1,9
AAC-123	тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(диметилpipBOR)	LA-54	1,9
AAC-124	тіо-S4497-HC-A118C- MC-vc-PABC-(піперазBTR)	LA-62	1,8
AAC-125	тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(піпераз, деацетилBOR)	LA-64	0,9
AAC-126	тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(піперазBOR)	LA-65	1,7
AAC-127	тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-PAB- (диметилpipBOR)	LA-66	1,7
AAC-128	тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(метилпіпераз BOR)	LA-67	1,9
AAC-129	тіо-S6078-HC A114C-LCWT-MC-vc-PAB- (диметилpipBOR)	LA-54	1,6
AAC-130	тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(окси, ізопропілpipBOR)	LA-68	1,8
AAC-131	тіо-S4497-HC-A118C-MC-tpm-cit-PAB-(диметилpipBOR)	LA-69	1,8
AAC-132	тіо-S4497 HC MC-GPIImeLFF-(pipBOR) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 129)	LA-69	1,3
AAC-133	тіо-S4497 HC MC-GPILFF-(pipBOR) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 130)	LA-70	1,2
AAC-134	тіо-S4497 HC MC-val-cit-phe-(pipBOR)	LA-71	1,7
AAC-135	тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(диметилpipBOR)	LA-54	1,9
AAC-136	тіо-S4497.v1 HC WT, LC V205C-MC-vc-PAB- (диметилpipBOR)	LA-54	2

Номер AAC	Формула AAC	лінкер-abx LA № (Таблиця 2)	AAR*
AAC-137	тіо-S4497.v1 HC WT, LC V205C-MC-vc-PAB-(піперазBOR)	LA-65	tbd
AAC-138	тіо-S4497 HC WT v8, LC V205C- MC-vc-PAB-(диметилріпBOR)	LA-54	1,9
AAC-139	тіо-S4497-HC-A118C- MC-vc-PAB-(диметилріпBOR)	LA-54	1,8
AAC-140	тіо-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MC-vc-PAB-(піперазBOR)	LA-65	1,6
AAC-141	тіо-S6078-HCA114C-LCWT-MC-vc-PAB-(диметилріпBOR)	LA-54	1,6
AAC-142	тіо-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MC-vc-PAB-(диметилріпBOR)	LA-54	1,7
AAC-143	тіо-S4497 HC-MP-GGAFA-PAB-(ріпBOR) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 131)	LA-87	1,55
AAC-144	тіо-S4497 v1HC-MC-vc-PAB-(фенілріпBOR)	LA-72	1,7
AAC-145	тіо-S4497 v1HC-MC-vc-PAB-(диметилBTR)	LA-73	1,7
AAC-146	тіо-Tmab HC A118C-MP-GGAFA-PABC-(ріпBOR) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 131)	LA-87	1,3
AAC-147	тіо-S4497 v1HC-MC-vc-PAB-(диметилріпBOR)	LA-74	1,9
AAC-148	тіо-S4497v1 HC-MC-vc-PABC-(ріпBTR)	LA-75	1,9
AAC-149	тіо-S4497v1 HC-MC-vc-PAB-(метилпіпераз, деацетилBOR)	LA-76	2
AAC-150	тіо-S4497v1 HC-MC-vc-(фенілріпBOR)	LA-77	1,8
AAC-151	тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(3- диметиламінопіролBOR)	LA-78	tbd
AAC-152	тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-(О-метил, диметилріпBOR)	LA-79	1,7
AAC-153	тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(фенілріпBOR)	LA-80	tbd
AAC-154	тіо-S4497v1 HC WT, LC V205C-MC-vc-PAB-(диметилріпBOR)	LA-54	1,8
AAC-155	тіо-S7578-HC WT-LC V205C-MC-vc-PAB-(диметилріпBOR)	LA-54	1,9
AAC-156	тіо-S4497v8-LC-MC-vc-PAB-(3-диметиламінопіролBOR)	LA-78	tbd
AAC-157	тіо-S4497v8-LC-MC-vc-PABC-(деацетил, ріпBTR)	LA-81	2,2
AAC-158	тіо-S4497v8-LC-MC-vc-(деацетил, фенілріпBOR)	LA-82	-
AAC-159	тіо-S4497v8-LC-MC-vc-PAB-(диметиламіно, метиламіноетилBTR)	LA-83	2,2
AAC-160	тіо-S4497v8-LC-MC-vc-PAB-(метилпіперазBTR)	LA-84	tbd
AAC-161	тіо-S4497v8-LC-MC-vc-(фенілріпBOR)	LA-85	tbd
AAC-162	тіо-S4497v8-LC-MC-vc-PAB-(окси, диметиламіноріпBOR)	LA-86	tbd
AAC-163	тіо-S4497-v8-LCV205C-MC-LAFG-PAB-(диметиламіно- 3-піролоBOR) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 128)	LA-88	2,2
AAC-164	тіо-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PAB-піразоло(ріпBOR)	LA-89	tbd
AAC-165	тіо-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PAB-(монометиламіноріпBOR)	LA-90	1,3
AAC-166	тіо-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MC-vc-PAB-(диметилріпBOR)	LA-54	1,8
AAC-167	тіо-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MC-vc-PAB-(метил,етиламіноріпBOR)	LA-91	2,0
AAC-168	тіо-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MC-vc-PABC-(амінометилріпBOR)	LA-92	1,6
AAC-169	тіо-S4497 WT (V8), LC V205C-MC-vc-PABC-C21,C23- фенілацеталь-(диметиламіноріпBOR)	LA-93	1,6
AAC-170	тіо-S4497 WT (V8), LC V205C-MC-vc-PABCріп-(ріпBOR)	LA-94	1,4

Номер AAC	Формула AAC	лінкер-abx LA № (Таблиця 2)	AAR*
AAC-171	тіо-S6078 v4 HC-Cys LC-Cys-MC-vc-PAB-(диметилріпBOR)	LA-54	3,9
AAC-172	тіо-S6078 v4 HC-CYS, LC-CYS-MC-vc-PAB-(піперазBOR)	LA-65	3,9
AAC-173	тіо-S6078 v4 HC-WT, LC-Cys-MC-vc-PAB-(диметилріпBOR)	LA-54	2,0
AAC-174	тіо-S6078.v4.HC-WT, LC-CYS-MC-vc-PAB-(піперазBOR)	LA-65	1,8
AAC-175	тіо-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MP-гідразидPP-(ріпBOR)	LA-95	2,0
AAC-176	тіо-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MC-vc-PABC-(азетидинілBOR)	LA-96	tbd
AAC-177	тіо-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PABC-(етилпіперазино, деацетилBOR)	LA-97	1,6
AAC-178	тіо-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PABC-(етиламінопіперазиноBOR)	LA-98	1,7
AAC-179	тіо-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PABфеніл-(ріпBOR)	LA-99	1,9
AAC-180	тіо-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PAB-(фторхінолон, оксиBOR)	LA-100	1,9
AAC-181	тіо-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PAB-(феноксиріп, оксиBOR)	LA-101	1,6
AAC-182	тіо-S6078 v4 HC-CYS, LC-CYS-MC-vc-PAB-(окси, диметиламіноріпBOR)	LA-86	4,0
AAC-183	тіо-S6078 v4 HC-CYS, LC-CYS-MC-vc-PABC-(деацетил, ріпBTR)	LA-81	3,8
AAC-184	тіо-S6078 v4 HC-CYS, LC-CYS-MC-vc-PAB-(окси, ізопропілріпBOR)	LA-68	tbd
AAC-185	тіо-S6078 v4 HC-CYS, LC-CYS-MC-vc-PAB-(метилрифампіцин)	LA-102	tbd
AAC-186	тіо-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MC-vc-PAB-(диметилріпBOR)	LA-54	1,9
AAC-187	тіо-S6078 v4 HC-CYS, LC-CYS-MC-vc-PAB-(диметилріпBOR)	LA-54	3,8
AAC-188	тіо-S6078 v4 HC-WT, LCCYS-MC-vc-PAB-(окси, ізопропілріпBOR)	LA-68	1,6
AAC-189	тіо-S6078 v4 HC-WT, LC-CYS-MC-vc-PAB-(метилрифампіцин)	LA-102	1,8
AAC-190	тіо-S7578-HC-WT-LC-Cys-MC-vc-PAB-(диметилріпBOR)	LA-54	1,9
AAC-191	тіо-S4497-v8-LC-V205C-MC-vc-PAB-(диметиламіноетилпіперазиноBOR)	LA-103	1,7
AAC-192	тіо-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MC-vc-PAB-(диметилріпBOR)	LA-54	1,9
AAC-193	тіо-S4497 HC v1-MP-LAFG-PABC-(піперазиноBOR) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 128)	LA-104	1,8
AAC-194	тіо-S6078 v4 HC-WT, LC-CYS-MC-vc-PAB-(піперазBOR)	LA-65	1,8
AAC-195	тіо-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-C21,C23-аніліноацеталь-(диметиламіноріпBOR)	LA-105	2,0
AAC-196	тіо-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-аніліно-(триметиламоній-ріп, оксиBOR)	LA-106	2,1
AAC-197	тіо-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(диметиламоній, фторріпBOR)	LA-107	2,0
AAC-198	тіо-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(диметиламоній, тіопропіл, деацетил BOR)	LA-108	1,9
AAC-199	тіо-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(диметиламоній, метиламінопропілBOR)	LA-109	1,8
AAC-200	тіо-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(диметилріпBOR)	LA-54	1,0

Номер AAC	Формула AAC	лінкер-abx LA № (Таблиця 2)	AAR*
AAC-201	tio-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PABC-(метиламінорір, деацетил BOR)	LA-110	1,9
AAC-202	tio-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(окси, рір, деацетил BOR)	LA-111	1,9
AAC-203	tio-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(метилрифампіцин)	LA-102	1,8
AAC-204	tio-S4497-v8-LC-cys-MC-vc-PAB-(диметиламоній, тіопропіл BOR)	LA-112	2,0
AAC-205	tio-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(окси, диметиламінорірBOR)	LA-113	1,8
AAC-206	tio-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(N-ізобутилрифабутин)	LA-114	1,9
AAC-207	tio-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(метилрифампіцин)	LA-102	1,8
AAC-208	tio-S4497-v8-LC V205C-MC-vc-PAB-(диметиламоній, фторрірBOR)	LA-107	1,8
AAC-209	tio-S4497-v8-LC cys-D10-MC-vc-PAB-(диметилрірBOR)	LA-54	1,9
AAC-210	tio-S4497-v8-LC cys-MC-vc-PABC-(монометилрірBTR)	LA-115	1,5
AAC-211	tio-S4497-v8-LC cys-MC-vc-PAB-(піперазиноBOR)	LA-116	tbd
AAC-212	tio-S4497-v8-LC cys-MC-vc-PAB-(R-фторхінолон, оксиBOR)	LA-117	tbd
AAC-213	tio-S4497-v8-LC cys-MC-vc-PAB-(S-фторхінолон, оксиBOR)	LA-118	tbd
AAC-214	tio-S4497-v8-LC-cys-MC-vc-PAB-(диметилрір, деацетилBOR)	LA-61	2,0
AAC-215	tio-S4497 LC v8-MP-LAFG-PABC-(піперазиноBOR) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 128)	LA-104	1,6
AAC-216	tio-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MC-vc-PAB-(піперазBOR)	LA-65	1,9
AAC-217	tio-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PAB-(монометиламінорірBOR)	LA-90	1,8
AAC-218	tio-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MC-vc-PAB-(диметилрірBOR)	LA-54	1,9
AAC-219	tio-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MC-vc-PABC-(піперазBOR)	LA-65	1,9
AAC-220	tio-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PAB-(піперазиноBOR)	LA-116	tbd
AAC-221	tio-S4497-v8-LCV205C-MC-vc-PAB-(метилпіперазBOR)	LA-67	tbd
AAC-222	tio-S4497 LC v8 -MP-LAFG-PABC-(піперазиноBOR) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 128)	LA-104	tbd

* AAR = середнє відношення антибіотик/антитіло

Дикий тип ("WT"), мутантне антитіло з введеним методом генної інженерії цистеїном ("tio"), легкий ланцюг ("LC"), важкий ланцюг ("HC"), 6-малеїмідокапроїл ("MC"), малеїмідопропаноїл ("MP"), валін-цитрулін ("val-cit" або "vc"), аланін-фенілаланін ("ala-phe"), п-амінобензил ("PAB") і п-амінобензилоксикарбоніл ("PABC")

tbd = підлягає визначенню

HC-A114C (Kabat) = HC-A118C (EU)

АНАЛІЗ *IN VITRO* ДЕМОНСТРУЮЧИЙ, ЩО AAC ЗНИЩУЄ ВНУТРІШНЬОКЛІТИННОГО MRSA

- 5 Експерименти *in vitro* підтверджують, що AAC вивільняє активний антибіотик тільки після розщеплення лінкера між антитілом й антибіотиком відповідним ферментом, таким як катепсин В. MRSA культивували протягом ночі в нормальному середовищі для росту бактерій з додаванням до 10 мкг/мл AAC. Інкубація MRSA з S4497-рірBOR AAC або S4497-диметил-рірBOR AAC не призводила до інгібування росту бактерій, якщо AAC не були попередньо оброблені катепсином В, щоб відбулося вивільнення активного антибіотика. В аналізі *in vitro* з
- 10 використанням мишачих перитонеальних макрофагів підтверджено, що AAC вивільняє активний

антибіотик і знищує MRSA всередині фагоцитуючих клітин (Приклад 18). AAC, що включає антитіло rF1, яке зв'язується з сімейством білків, асоційованих із клітинною стінкою, кон'югували з похідною рифаміцину. *S. aureus* (штам Newman) обробляли різними дозами rF1-AAC або еквівалентними дозами антитіла, рифампіцину або сумішшю антитіла та вільного рифампіцину, щоб забезпечити зв'язування антитіла з бактерією (опсонізацію), і через 1 годину інкубації опсонізовані бактерії додавали до макрофагів (Фіг. 7A).

На Фіг. 7A наведені результати аналізу з макрофагами *in vitro* демонструючи, що AAC знищує внутрішньоклітинні MRSA. *S. aureus* (Newman) інкубували з антитілом rF1, вільним рифампіцином, простою сумішшю антитіла rF1 і вільного рифампіцину, комбінованих у тому ж співвідношенні антитіло/антибіотик, що й в AAC, або з rF1-AAC протягом 1 години та додавали до мишачих макрофагів. Макрофаги інкубували при 37 °C протягом 2 годин, щоб відбувся фагоцитоз. Після закінчення фагоцитозу суміш для інфікування заміщали на нормальне середовище для росту з додаванням 50 мкг/мл гентаміцину для інгібування росту позаклітинних бактерій і через 2 дні після інфекції визначали загальну кількість внутрішньоклітинних бактерій, що вижили, роблячи посіви.

Макрофаги інфікували протягом 2 годин і суміш для інфікування видаляли й заміщали на середовище, що містить гентаміцин, для знищення будь-яких позаклітинних бактерій, що залишились, які не були захоплені макрофагами. Через 2 дні макрофаги лізували та визначали загальну кількість бактерій, що вижили, роблячи посіви на чашки з агаром. Аналіз показав, що обробка AAC призводить до зниження кількості внутрішньоклітинних бактерій більше ніж в 100 разів у порівнянні з обробкою простою сумішшю антитіла rF1 і вільного рифампіцину, комбінованих у тому ж співвідношенні антитіло/антибіотик, що й в AAC (Фіг. 7A).

MRSA може проникати в ряд нефагоцитарних типів клітин, у тому числі в остеобласти та різні епітеліальні й ендотеліальні клітини (Garzoni and Kelly, (2008) Trends in Microbiology). MRSA може інфікувати лінію клітин остеобластів (MG63), лінію клітин дихального епітелію (A549) та первинні культури людських ендотеліальних клітин пупкової вени (HUVEC). На Фіг. 7B показане внутрішньоклітинне знищення MRSA (штам USA300) 50 мкг/мл S4497-pipBOR AAC 102 у макрофагах, остеобластах (MG63), клітинах дихального епітелію (A549) та людських ендотеліальних клітинах пупкової вени (HUVEC), тоді як некон'юговане антитіло S4497 не давало такого ефекту. Ці типи клітин, імовірно, експресують катепсин В на більш низькому загальному рівні, ніж професійні фагоцитарні клітини, такі як макрофаги, проте, MRSA, оброблені 50 мкг/мл S4497-pipBOR AAC 102, ефективно знищувались після інтерналізації у всіх трьох зазначених лініях клітин. Пунктирна лінія означає межу виявлення для цього аналізу.

Для порівняння активності AAC, що мають варіації в лінкері, який з'єднує антитіло з антибіотиком, проводили аналіз *in vitro*. S4497-диметил-pipBOR AAC є більш активним, ніж S4497-pipBOR AAC в аналізі внутрішньоклітинного знищення в макрофагах. S4497-pipBOR AAC і S4497-диметил-pipBOR AAC титрували для визначення мінімальної ефективної дози в цьому аналізі внутрішньоклітинного знищення в макрофагах (Фіг. 7C). Обробка, щонайменше, 2 мкг/мл AAC може бути необхідною для досягнення оптимального кліренсу внутрішньоклітинних бактерій.

На Фіг. 7C показане порівняння AAC, отриманих з використанням pipBOR 51, і AAC, отриманих з використанням диметил-pipBOR (diMe-pipBOR) 54. MRSA опсонізували антитілом S4497 як таким або AAC, вибраним із S4497-pipBOR 102 і S4497-диметил-pipBOR 105, у різних концентраціях у діапазоні від 10 мкг/мл до 0,003 мкг/мл. Ці дані показали, що для обох AAC оптимальне знищення відбувалось при концентраціях AAC 2 мкг/мл і вище з дозозалежною втратою активності, що стала помітною при 0,4 мкг/мл. Загальний рівень знищення бактерій був значно вище у випадку S4497 диметил-pipBOR AAC 105. Обробка більш високими дозами S4497-диметил-pipBOR AAC 105 призводила до елімінації внутрішньоклітинних бактерій до рівня нижче межі виявлення, і при використанні субоптимальної дози 0,4 мкг/мл AAC спостерігалось зниження кількості бактерій більше ніж в 300 разів.

На Фіг. 7D показано, що AAC знищує внутрішньоклітинні бактерії без негативного впливу на макрофаги. Штам *S. aureus* USA300 попередньо інкубували з 50 мкг/мл анти-*S. aureus* антитіла S4497 (антитіло) або 50 мкг/мл тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PAB-диметилpipBOR 105 AAC протягом 1 години для забезпечення зв'язування антитіла з бактерією. Опсонізовані бактерії додавали до мишачих перитонеальних макрофагів із множинністю зараження 10-20 бактерій на макрофаг та інкубували при 37 °C протягом 2 годин, щоб відбувся фагоцитоз. Після завершення фагоцитозу вільні бактерії видаляли, і макрофаги культивували протягом 2 днів у нормальному середовищі для росту з додаванням 50 мкг/мл гентаміцину для знищення неінтерналізованих бактерій. Наприкінці періоду культивування оцінювали виживання макрофагів, визначаючи вивільнення цитоплазматичної лактатдегідрогенази (LDH) у супернатант клітинної культури.

Загальну кількість LDH, вивільнену в кожній ямці, порівнювали з контрольними ямками, що містять макрофаги, які були лізовані додаванням у ямки детергенту. Вимірювали ступінь лізису макрофагальних клітин у ямках, оброблених детергентом, не інфікованих макрофагів, макрофагів, інфікованих бактеріями штаму USA300, попередньо опсонізованими антитілом S4497, або макрофагів, інфікованих бактеріями штаму USA300, попередньо опсонізованими тіо-S4497-NC-A118C-MC-vc-PAB-диметилріпBOR 105 AAC.

На Фіг. 7Е показано виділення живих бактерій штаму USA300, що міститься всередині макрофагів, з клітинного лізату макрофагів, описаного вище. Для оцінки кількості бактеріальних клітин, що вижили, макрофаги лізували та робили посіви серійних розведень клітинного лізату.

На Фіг. 9 наведений аналіз інгібування росту, демонструючий, що AAC є нетоксичним для *S. aureus*, доки лінкер не буде розщеплений катепсином В. Схема аналізу вивільнення з катепсином (Приклад 20) наведена ліворуч. AAC обробляють катепсином В для вивільнення вільного антибіотика. Загальний рівень активності антибіотика у випадку інтактного AAC і AAC, обробленого катепсином В, визначали, роблячи серійні розведення отриманих реакційних сумішей і визначаючи мінімальну дозу AAC, при якій відбувалося інгібування росту *S. aureus*. Верхній правий графік демонструє результати аналізу вивільнення з катепсином для тіо-S4497-NC-A118C-MC-vc-PAB-ріпBOR 102, а нижній правий графік демонструє результати аналізу вивільнення з катепсином для тіо-S4497-NC-A118C-MC-vc-PAB-диметилріпBOR 105.

ЕФЕКТИВНІСТЬ КОН'ЮГАТІВ АНТИТІЛО-АНТИБІОТИК *IN VIVO*

Для тестування ефективності AAC була створена модель перитоніту *in vivo* на мишах. У цій моделі мишей інфікували шляхом внутрішньочеревинної (I.P.) ін'єкції MRSA і визначали бактеріальне навантаження через 2 дні після інфекції у перитонеальній рідині та в нирках. Бактерії, зібрані з черевної порожнини, являли собою або вільно плаваючі позаклітинні бактерії, або бактерії, інтерналізовані всередину перитонеальних клітин, у першу чергу, всередину нейтрофілів і макрофагів, приваблюваних у місце інфекції. Незважаючи на те, що бактерії, ідентифіковані в цій моделі, були чутливими до обробки антибіотиком, було показано, що внутрішньоклітинні бактерії не відповідають на обробку рядом клінічно значимих антибіотиків, у тому числі рифампіном (Sandberg et al (2009) Antimicrobial Agents Chemother), і тому являються відмінною мішенню для тестування ефективності даного AAC.

На Фіг. 8А показана ефективність S4497-ріпBOR AAC 102 *in vivo*. Модель внутрішньочеревинної інфекції на мишах A/J. Мишей інфікували 5×10^7 KYO MRSA шляхом внутрішньочеревинної ін'єкції й обробляли 50 мг/кг антитіла S4497 як такого або 50 мг/кг S4497-ріпBOR AAC 102, що вводять шляхом внутрішньочеревинної ін'єкції (протокол 11-2032A). Мишей умертвляли на 2 день після інфекції та вимірювали загальне бактеріальне навантаження у перитонеальному супернатанті (позаклітинні бактерії), перитонеальних клітинах (внутрішньоклітинні бактерії) або в нирках.

Мишей A/J інфікували USA300 і вводили їм 50 мг/кг антитіла S4497, або S4497-ріпBOR AAC 102 через тридцять хвилин після інфекції. Через 2 дні мишей умертвляли та бактеріальне навантаження вимірювали у перитонеальних змивах та в нирках. Щоб розрізнити позаклітинні та внутрішньоклітинні бактерії, перитонеальні змиви акуратно центрифугували для відділення супернатанта, що містить позаклітинні бактерії, від перитонеальних клітин. Перитонеальні клітини обробляли лізоштафіном для знищення будь-яких забруднюючих позаклітинних бактерій і лізували для оцінки загальної кількості внутрішньоклітинних бактерій на момент дослідження. Тоді як у мишей, оброблених антитілом як таким, кількість внутрішньоклітинних і позаклітинних бактерій становила 10^5 і 10^6 KYO у перитонеальному змиві та 10^4 і 10^6 бактерій в нирках, у мишей, оброблених S4497-ріпBOR AAC, відбувалася елімінація інфекції до рівня нижче межі виявлення. Ці дані свідчать про те, що, незважаючи на те, що AAC сконструйовано таким чином, що вивільнення активного антибіотика відбувається всередині фаголізосоми, спостерігається відмінний кліренс як внутрішньоклітинних, так і позаклітинних пулів MRSA. Оскільки позаклітинні бактерії не знищуються прямо AAC, той факт, що ці бактрії також елімінувалися в результаті обробки AAC, дозволяє припустити, що або значна частина позаклітинних бактерій поглинається клітинами в якийсь момент у ході інфекції, або AAC може підсилювати поглинання внутрішньоклітинних бактерій, тим самим збільшуючи відносну частку бактерій, що є внутрішньоклітинними, де вони ефективно знищуються AAC.

Ефективність AAC досліджували в моделі внутрішньовенної інфекції. У цій моделі відразу після зараження *S. aureus* поглинають циркулюючі нейтрофіли, так що більша частина бакетрій, виявлених у крові, асоційована з клітинами-хазяїнами через хвилини після зараження (Rogers, et al (1956) J. Exp. Med. 103:713-742). Мишей A/J інфікували 2×10^6 KYO MRSA шляхом внутрішньовенної ін'єкції та далі обробляли 50 мг/кг AAC шляхом внутрішньовенної ін'єкції через 30 хвилин після зараження. У цій моделі первинним місцем інфекції є нирки, і в мишей

розвивався великий абсцес, що міг бути виявлений через два дні після інфекції та не зникав протягом до 30 днів у відсутності лікування. Обробка 50 мг/кг S4497-pipBOR AAC 102 призводила до елімінації інфекції у всіх мишей, що беруть участь у тестуванні (Фіг. 8B).

На Фіг. 8B показана модель внутрішньовенної інфекції на мишах A/J. Мишей інфікували 2×10^6 КУО шляхом внутрішньовенної ін'єкції й обробляли 50 мг/кг антитіла S4497, 50 мг/кг S4497-pipBOR AAC 102 або простою сумішшю 50 мг/кг антитіла S4497 + 0,5 мг/кг вільного рифаміцину. Зазначені варіанти обробки доставляли шляхом внутрішньовенної ін'єкції через 30 хвилин після інфекції та нирки збирали через 4 дні після інфекції. Сірі пунктирні лінії означають межу виявлення для кожного органа. Обробка в контрольних групах 50 мг/кг антитіла S4497 як такого або простою сумішшю 50 мг/кг антитіла S4497 плюс 0,5 мг/кг рифаміцину (еквівалентна доза антибіотика, що перебуває в 50 мг/кг AAC) була неефективною.

Ефективність AAC, отриманих з використанням фрагментів антибіотиків pipBOR і диметил-pipBOR, порівнювали в моделі внутрішньовенної інфекції на мишах A/J *in vivo*. S4497-pipBOR AAC 102 (Фіг. 9A) або S4497-диметил-pipBOR AAC 105 (Фіг. 9B) вводили в різних дозах у діапазоні від 50 мг/кг до 2 мг/кг через 30 хвилин після інфекції та через 4 дні після інфекції для визначення загального бактеріального навантаження досліджували нирки. На Фіг. 9A показана ефективність pipBOR AAC 102 у моделі внутрішньовенної інфекції шляхом титрування S4497-pipBOR AAC 102. Самок мишей A/J у віці семи тижнів інфікували 2×10^6 КУО MRSA (штам USA300) шляхом внутрішньовенної ін'єкції у хвостову вену. На Фіг. 9B показана ефективність диметил-pipBOR AAC 105 у моделі внутрішньовенної інфекції шляхом титрування S4497-диметил-pipBOR AAC 105. Антитіло S4497, AAC 102 або AAC 105 вводили в зазначених дозах через 30 хвилин після інфекції. Мишей умертвляли через 4 дні після інфекції та визначали загальну кількість бактерій, що вижили, на мишу (2 об'єднані нирки), роблячи посіви.

Обидва AAC були ефективні в найбільш високій дозі 50 мг/кг, проте, S4497-pipBOR AAC 102 був тільки частково ефективний у більш низьких дозах. S4497-диметил-pipBOR AAC 105 призводив до повного кліренсу бактерій у дозах вище 10 мг/кг. Наступні експерименти показали, що дози вище 15 мг/кг були необхідні для стабільного кліренсу бактерій. На Фіг. 9A і 9B показано, що тіо-S4497-NC-A118C-MC-vc-PAB-диметилpipBOR 105 AAC більш ефективний, ніж тіо-S4497-NC-A118C-MC-vc-PAB-pipBOR 102 AAC у моделі внутрішньовенної інфекції, що вказує на ефект структурного розходження карбамату (51) і диметилпіперидилу (54) між 102 і 105, відповідно.

Мишей обробляли AAC через 30 хвилин після інфекції. Щоб краще відтворити умови, що виникають у пацієнтів з MRSA, які потребують лікування, визначили, чи є AAC ефективним для елімінації розвиненої інфекції, і чи забезпечує зв'язування антибіотика з анти-*S. aureus* антитілом певну перевагу у порівнянні з лікуванням антибіотиком як таким. З цією метою порівнювали ефективність AAC з еквівалентною дозою антибіотика диметил-pipBOR.

На Фіг. 9C показано, що мишей CB17.SC1D інфікували 2×10^7 КУО MRSA шляхом внутрішньовенної ін'єкції (протокол 12-2418). Через день після інфекції мишей обробляли 50 мг/кг антитіла S4497, 50 мг/кг S4497 диметил-pipBOR AAC 105 або 0,5 мг/кг антибіотика диметил-pipBOR 7, еквівалентною дозою антибіотика, що міститься в 50 мг/кг AAC. Мишей умертвляли через 4 дні після інфекції та визначали загальну кількість бактерій, що вижили, на мишу (2 об'єднані нирки), роблячи посіви. Обробка 50 мг/кг S4497-диметил-pipBOR AAC була явно ефективніше через 1 день після інфекції, тоді як обробка еквівалентною дозою диметил-pipBOR як такого не призводила до елімінації інфекції.

ОБРОБКА AAC ЕФЕКТИВНІШЕ У ПРИСУТНОСТІ ЛЮДСЬКИХ АНТИТІЛ І КРАЩЕ, НІЖ ОБРОБКА ІСНЮЮЧИМ СТАНДАРТОМ ЛІКУВАННЯ (SOC) ВАНКОМІЦИНОМ

Антитіло S4497 клонували з В клітин, отриманих з пацієнтів, інфікованих *S. aureus*. Це викликало побоювання, що нормальна людська сироватка крові або сироватка пацієнтів, інфікованих MRSA, може містити анти-MRSA антитіла, які будуть конкурувати за зв'язування з розробленим AAC. Для з'ясування цієї обставини людську сироватку крові, отриману з нормальних здорових донорів і ряду MRSA пацієнтів, тестували для оцінки загального рівня анти-MRSA антитіл, які розпізнають той же самий антиген, що й AAC. Був розроблений аналіз на основі ELISA з використанням препаратів клітинних стінок з MRSA. Для зменшення не специфічного зв'язування з препаратами клітинних стінок у цьому аналізі був використаний штам MRSA, дефіцитний за геном білка А. Білок А зв'язується з Fc областю IgG антитіл. Зв'язування різних зразків сироватки дикого типу (WT) з MRSA, експресуючими антиген S4497 (Фіг. 10A, WT), досліджували у порівнянні зі зв'язуванням з мутантним штамом MRSA Tar/Tar DKO (подвійний нокаут), у якого відсутні модифікації цукру, які розпізнаються антитілом S4497. На Фіг. 10A показаний рівень анти-*S. aureus* антитіл у сироватці крові людини. Пацієнти, інфіковані *S. aureus*, або здорові донори містять у сироватці крові високі рівні антитіл,

специфічних проти WTA, з тією ж самою специфічністю, що й анти-WTA S4497.

Стандартну криву будували, використовуючи моноклональне антитіло, що зв'язується з тим же самим антигеном, який розпізнається S4497. Порівнюючи рівень зв'язування в зразках сироватки крові з сигналом, отриманим від антитіла, що використовується для побудови стандартної кривої, оцінювали рівень анти-MRSA антитіл, що є присутнім у зразках сироватки крові, отриманих від здорових донорів або пацієнтів з MRSA, або у препаратах загального IgG, виділених з нормальної сироватки крові (Фіг. 10A). Нормальна людська сироватка крові містить 10-15 мг/мл всіх IgG (Manz et al. (2005) Annu Rev. Immunol. 23:367). Аналіз реактивності анти-MRSA у різних зразках сироватки крові виявив, що до 300 мкг/мл таких антитіл потенційно мають реактивність у відношенні того ж самого антигена, який розпізнається S4497, і тому, імовірно, конкурують з AAC за зв'язування.

Антитіло S4497 використовували для одержання AAC завдяки певним властивостям, включаючи дуже високе зв'язування з MRSA (за оцінками, 50000 сайтів зв'язування на бактерію). Достатня кількість AAC зможе зв'язуватися з MRSA навіть у присутності конкуруючих антитіл, виявлених у людській сироватці. Щоб перевірити це безпосередньо, S4497-диметил-ріpBOR AAC титрували у буфері з додаванням 10 мг/мл людських IgG (Фіг. 10B, +IGIV) і вимірювали рівень знищення внутрішньоклітинних бактерій в аналізі внутрішньоклітинного знищення в макрофагах.

На Фіг. 10B показані результати для моделі інфекції *in vivo*, що демонструють, що AAC ефективно у присутності фізіологічних рівнів людських IgG. Аналіз *in vitro* з макрофагами та штамом MRSA USA300 показав, що S4497-диметил-ріpBOR AAC 105 ефективний у присутності 10 мг/мл людських IgG. Штам MRSA USA300 опсонізували AAC як таким або AAC, розведеним в 10 мг/мл людських IgG, протягом 1 години при 37 °C з перемішуванням. Опсонізовані бактерії додавали безпосередньо до мишачих перитонеальних макрофагів та інкубували протягом 2 годин, щоб пройшов фагоцитоз. Після інфекції макрофагальну культуру підтримували у повному середовищі з додаванням гентаміцину, і загальну кількість внутрішньоклітинних бактерій, що вижили, оцінювали через 2 дні після інфекції. Ці дані свідчать про те, що, незважаючи на те, що людські IgG дійсно інгібували дію AAC при більш низьких дозах, при використанні доз вище 10 мкг/мл, які являють собою концентрацію антитіла, що легко можна досягти *in vivo*, досягалося відмінне знищення бактерій. IgG нормальної сироватки крові можуть зменшити функціональний ефект 105 AAC. Оскільки для прояву AAC максимальної активності знищення всередині макрофагів може вимагатися як високе зв'язування антигена, так й ефективна взаємодія з FcR (для опосередкованого опсонізацією фагоцитозу), що існують у сироватці крові антитіла можуть конкурувати за зв'язування з WTA, і відповідні імунні комплекси, що утворилися, можуть конкурувати за зв'язування з FcR на макрофагах.

Для того, щоб підтвердити, що AAC буде ефективний у присутності конкуруючих людських антитіл *in vivo*, модель інфекції *in vivo* була модифікована для створення мишей, які експресують нормальні рівні людських IgG у сироватці крові. У мишей CB17:SCID, в яких відсутні як Т клітини, так і В клітини, і тому відсутні антитіла в сироватці крові (Bosna & Carroll, (1991) Ann Rev Immunol. 9:323), створювали рівень людських IgG, що становить 10 мг/мл, шляхом щоденного дозування високими концентраціями людських IgG (IGIV). Попередні дослідження підтвердили, що ці миші, названі SCID:hulgG, дійсно мають постійний рівень людських IgG у сироватці крові, що становить, щонайменше, 10 мг/мл, і що ці миші були так само чутливі до інфекції MRSA, як і неопрацьований контроль. Мишей SCID:hulgG інфікували MRSA й обробляли або антитілом S4497, або S4497-диметил-ріpBOR AAC (50 мг/кг) через 1 день після інфекції. Через чотири дні після інфекції оцінювали бактеріальне навантаження в нирках (Фіг 10C).

На Фіг. 10C наведені комбіновані дані з 3 незалежних експериментів з використанням 2 окремих препаратів тіо-S4497-HC-A118C-MC-vs-PAB-диметил-ріpBOR AAC 105 або 112. У мишей CB17:SCID створювали рівень людських IgG, використовуючи режим дозування, оптимізований для досягнення постійного рівня людських IgG у сироватці крові, що становить, щонайменше, 10 мг/мл. Мишей обробляли антитілом S4497 (50 мг/кг) або S4497-диметил-ріpBOR AAC (50 мг/кг). У мишей, оброблених AAC, спостерігалось зниження бактеріального навантаження більше ніж на 4 порядки (t-критерій Стьюдента $p=0,0005$). У мишей, оброблених S4497-диметил-ріpBOR AAC, бактеріальне навантаження було в середньому в 10000 разів нижче у порівнянні з мишами, обробленими антитілом S4497 як контроль, що свідчить про те, що AAC явно ефективніше навіть у присутності високих доз конкуруючих людських анти-MRSA антитіл.

Ефективність AAC порівнювали з ефективністю обробки ванкомицином, сучасним стандартом лікування для інфекцій MRSA. На Фіг. 11A показана модель інфекції *in vivo*, що

демонструє, що в мишей з нормальним рівнем людських IgG AAC більш ефективний, ніж сучасний стандарт лікування (SOC) антибіотик ванкоміцин. У мишей CB17.SCID створювали рівень людських IgG, використовуючи режим дозування, оптимізований для досягнення постійного рівня людських IgG у сироватці крові, що становить, щонайменше, 10 мг/мл. Мишей обробляли антитілом S4497 (50 мг/кг), ванкоміцином (100 мг/кг), S4497-диметил-рірBOR AAC (50 мг/кг) 112 або AAC, що містить антитіло з тим же самим ізотипом, що не розпізнає MRSA, тіо- μ -анти gD 5B5-NC-A118C-MC-vc-PAB-диметилрірBOR AAC 110 (50 мг/кг). Мишам, що одержують AAC, давали однократну дозу AAC в 1 день після інфекції шляхом внутрішньовенної ін'єкції. Мишам, що одержують ванкоміцин, робили внутрішньочеревинні ін'єкції антибіотика два рази на день. Всіх мишей умертвляли на 4 день після інфекції та визначали загальну кількість бактерій, що вижили, на мишу (2 об'єднані нирки), роблячи посіви.

Обробка ванкоміцином ефективна для лікування інфекції MRSA у мишачій моделі внутрішньовенної інфекції, якщо лікування починали через 30 хвилин після інфекції. Дозування два рази на день 100 мг/кг ванкоміцину не призводило до елімінації інфекції, і призводило тільки до зниження бактеріального навантаження приблизно в 50 разів, коли лікування починали пізніше, ніж через 1 день після інфекції (Фіг. 11A). Дивовижно, що обробка однократною дозою S4497-диметил-рірBOR AAC через 1 день після інфекції призводила до елімінації інфекції у більшості мишей. Дивно, що обробка контрольним AAC, що містить людське антитіло IgG, що не розпізнає *S. aureus* (gD-AAC), мала таку саму ефективність у цій моделі. Антитіло gD не розпізнає *S. aureus* своїм антиген-сполучним сайтом, проте, антитіло може зв'язуватись з білком A, виявленим на *S. aureus*.

На Фіг. 11C показана модель інфекції *in vivo*, яка демонструє, що AAC тіо-S6078-NC A114C-LCWT-MC-vc-PAB-диметилрірBOR 129 більш ефективний, ніж голе анти-WTA антитіло S4497 при введенні відповідно до того самого режиму, що й на Фіг. 11A, у мишей, в яких створений нормальний рівень людських IgG. У мишей CB17.SCID створювали рівень людських IgG, використовуючи режим дозування, оптимізований для досягнення постійного рівня людських IgG у сироватці крові, що становить, щонайменше, 10 мг/мл. Мишей обробляли антитілом S4497 (50 мг/кг) або тіо-S6078-NC A114C-LCWT-MC-vc-PAB-диметилрірBOR 129 AAC (50 мг/кг).

Аналіз FACS показав, що фарбування бактерій, виділених при інфекції *in vivo*, високими концентраціями антитіл gD дає низький рівень зв'язування з *S. aureus* щодо зв'язування анти-MRSA антитіл з MRSA, виділених з інфікованих нирок (Фіг. 11B). Мишей інфікували MRSA шляхом внутрішньовенної ін'єкції, і інфіковані нирки видаляли через 3 дні після інфекції та гомогенізували. Анти-MRSA або контрольні антитіла були позначені Alexa-488 і проаналізовані в діапазоні концентрацій між 0,08 мкг/мл і 50 мкг/мл. Антитіло S4497 розпізнає модифікацію N-ацетилглюкозаміном, зв'язаним з тейхоевою кислотою клітинної стінки (WTA) через бета-аномерний зв'язок на клітинній стінці *S. aureus*. Антитіло S7578 зв'язується з аналогічною модифікацією N-ацетилглюкозаміном, приєднаним до WTA через альфа-аномерний зв'язок. Антитіло rF1 є позитивним контролем для анти-MRSA антитіла, що розпізнає модифікації цукру, виявлені на сімействі, що містять SDR повтори білків, заякорених у клітинній стінці. Антитіло gD є людським IgG₁ і негативним контролем, що не розпізнає *S. aureus*. Незважаючи на те, що загальний рівень зв'язування з антитілом gD значно нижче, ніж спостережуваний для антитіла S4497 (за оцінкою, щонайменше, в 30 разів менше, за даними аналізу FACS, Фіг. 11B), обмежена ефективність, спостережувана для gD-AAC, свідчить про те, що навіть низький рівень зв'язування AAC на MRSA *in vivo* достатній для досягнення ефективності, еквівалентної зниженню КУО у випадку ванкоміцину.

Наведені вище дані явно демонструють, що AAC може вбивати внутрішньоклітинні MRSA і що S4497-рірBOR і S4497 диметил-рірBOR AAC ефективні для обмеження інфекції MRSA як *in vitro*, так й *in vivo*. AAC даного винаходу діє, знищуючи бактерії всередині клітин ссавців, і, тим самим, є унікальним терапевтичним агентом, більш ефективним для знищення популяцій бактерій, стійких до лікування ванкоміцином.

На Фіг. 20 показано, що попередня обробка 50 мг/кг вільного антитіла не ефективна в моделі внутрішньовенної інфекції. Мишам Balb/c давали однократну дозу носія як контроль (PBS) або 50 мг/кг антитіла шляхом внутрішньовенної ін'єкції за 30 хвилин до інфекції 2×10^7 КУО USA300. Групи порівняння включали обробку контрольним антитілом з тим же самим ізотипом, що не зв'язується з *S. aureus* (gD), антитілом, спрямованим проти бета модифікації тейхоевої кислоти клітинної стінки (4497), або антитілом, спрямованим проти альфа модифікації тейхоевої кислоти клітинної стінки (7578). Контрольним мишам два рази на день шляхом внутрішньочеревинної ін'єкції вводили 110 мг/кг ванкоміцину (Vanco). Всіх мишей умертвляли на 4 день після інфекції та визначали загальну кількість бактерій, що вижили, у нирках (2 об'єднані нирки), роблячи посіви. Незважаючи на те, що попередня обробка ванкоміцином призводила до елімінації

інфекції у всіх мишей у цьому дослідженні, попередня обробка антитілом проти клітинної стінки *S. aureus* не впливала на бактеріальне навантаження.

На Фіг. 21 і 22 показано, що AAC, спрямовані проти бета модифікації тейхоевої кислоти клітинної стінки, або проти альфа модифікації тейхоевої кислоти клітинної стінки, ефективні в моделі внутрішньовенної інфекції на мишах, у яких створений нормальний рівень людських IgG. У мишей CB17.SCID створювали рівень людських IgG, використовуючи режим дозування, оптимізований для досягнення постійного рівня людських IgG у сироватці крові, що становить, щонайменше, 10 мг/мл, і інфікували їх 2×10^7 КУО USA300 шляхом внутрішньовенної ін'єкції. Через 1 день після інфекції здійснювали обробку тільки буфером як контроль (PBS), 60 мг/кг бета-WTA AAC (136 AAC) або 60 мг/кг альфа-WTA AAC (155 AAC). Мишей умертвляли на 4 день після інфекції та визначали загальну кількість бактерій, що вижили, в нирках (2 об'єднані нирки, Фіг. 21) і серце (Фіг. 22), роблячи посіви. Обробка бета-WTA AAC призводила до зниження бактеріального навантаження в 100000 разів у нирках у порівнянні з обробкою мишей носієм як контроль. Обробка альфа-WTA AAC призводила до середнього зниження бактеріального навантаження в 9000 разів у нирках.

На сьогодні залишається неясним, чому існуючі доступні антибіотики часто виявляються неефективними для знищення внутрішньоклітинних пулів бактерій. Антибіотики можуть бути неефективними, оскільки їхня концентрація всередині клітин не досягає достатнього рівня, або тому що антибіотики не проникають у фаголізосомальний компартмент, де зберігаються пули внутрішньоклітинних бактерій, або тому що антибіотики можуть видалятися з клітин ссавців за рахунок активності насосів, що викидають. Антибіотики можуть руйнуватися в жорстких умовах, таких як умови всередині фаголізосом, що включають низький pH, наявність агентів, що відновлюють, і агентів, що окисляють, які вивільняються спеціально для знищення фагоцитованої бактерії. Альтернативно, антибіотики можуть бути неефективними, тому що бактерії підсилюють свої захисні механізми або не діляться всередині фаголізосом та тому тимчасово стають нечутливими до антибіотиків. Відносна важливість цих механізмів стійкості до антибіотиків буде різною для різних патогенів і для кожного антибіотика. Компоненти антибіотики розробленого AAC, *pipBOR* і диметил-*pipBOR*, дійсно є могутнішими, ніж рифампіцин, відносно знищення внутрішньоклітинних MRSA при тестуванні вільних антибіотиків. Зв'язування цих антибіотиків з антитілом забезпечує реальне дозозалежне збільшення ефективності, спостережуване *in vivo* (Фіг. 9C). У цьому випадку поліпшена ефективність AAC у порівнянні з антибіотиком як таким, імовірно, пояснюється сполученням його здатності опсонізувати бактерії з поліпшеною фармакокінетикою AAC. Більшість вільних антибіотиків швидко виводяться *in vivo* і вимагають повторного дозування з більш високою концентрацією антибіотика для підтримки достатньої концентрації антибіотика в сироватці крові. На противагу цьому AAC має тривалий період напівжиття в сироватці крові через наявність у молекул частини антитіла. Оскільки AAC вивільняє антибіотик тільки після зв'язування з *S. aureus* і спільного транспортування бактерією в обмежений простір фаголізосом, невеликі дози антибіотика концентруються в ніші, де більшість антибіотиків не діють. Таким чином, на додаток до того, що AAC діють у захищених резервуарах внутрішньоклітинних бактерій, AAC можуть полегшувати використання могутніших антибіотиків, які можуть виявитись занадто токсичними для використання як одиночний агент, обмежуючи вивільнення антибіотика місцем, де це необхідно.

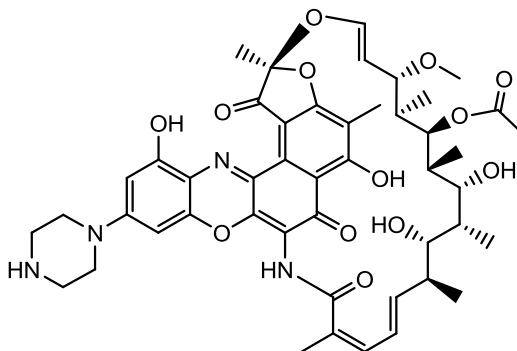
На Фіг. 35 і 36 наведені результати аналізу тіо-S6078 AAC з макрофагами *in vitro*. *S. aureus* (USA300 NRS384) інкубували з некон'югованим антитілом S6078 у концентрації 50 мкг/мл і з AAC у концентрації 50 мкг/мл, 5 мкг/мл, 0,5 мкг/мл або 0,05 мкг/мл протягом 1 години, щоб відбулося зв'язування антитіла з бактеріями. Отримані опсонізовані бактерії додавали до мишачих макрофагів та інкубували при 37 °C, щоб пройшов фагоцитоз. Через 2 години суміш для інфікування видаляли та заміщали на нормальне середовище для росту з додаванням 50 мкг/мл гентаміцину для знищення будь-яких позаклітинних бактерій, що залишились. Загальну кількість внутрішньоклітинних бактерій, що вижили, визначали через 2 дні після посіву серійних розведень лізатів макрофагів на чашки з триптичним соєвим агаром. Як показано на Фіг. 35, тіо-S6078.v4.HC-WT, LC-Cys-MC-vc-PAB-(диметилpipBOR) AAC був ефективний для знищення внутрішньоклітинних бактерій у дозах 0,5 мкг/мл і вище при навантаженні антибіотика диметилpipBOR (LA-54), що становить 2,0 (AAC-173) або 3,9 (AAC-171) на тіо-S6078 антитіло. Як показано на Фіг. 36, тіо-S6078.v4.HC-WT, LC-Cys-MC-vc-PAB-(піперазBOR) був ефективний для знищення внутрішньоклітинних бактерій у дозах 0,5 мкг/мл і вище при навантаженні антибіотика піперазBOR (LA-65), що становить 1,8 (AAC-174) або 3,9 (AAC-172) на тіо-S6078 антитіло.

На Фіг. 37 і 38 наведені результати аналізу ефективності тіо-S6078 AAC у мишачій моделі

внутрішньовенної інфекції *in vivo*. У мишей CB17.SCID створювали рівень людських IgG, використовуючи режим дозування, оптимізований для досягнення постійного рівня, що становить, щонайменше, 10 мг/мл людських IgG у сироватці крові. Мишей інфікували USA300 й обробляли носієм як контроль (PBS), тіо-S6078.v4.HC-WT, LC-Cys-MC-vc-PAB-(диметилпірBOR) AAC з навантаженням антибіотика диметилпірBOR (LA-54), що становить 2,0 (AAC-173) або 3,9 (AAC-171) на тіо-S6078 антитіло (Фіг. 37), і тіо-S6078.v4.HC-WT, LC-Cys-MC-vc-PAB-(піперазBOR) з навантаженням антибіотика піперазBOR (LA-65), що становить 1,8 (AAC-174) або 3,9 (AAC-172) на тіо-S6078 антитіло (Фіг. 38). Мишам давали однократну дозу AAC в 1 день після інфекції шляхом внутрішньовенної ін'єкції й умертвляли їх на 4 день після інфекції. Загальну кількість бактерій, що вижили, в 2 нирках визначали, роблячи посіви. Обробка AAC з більш низьким навантаженням антибіотика призводила до зниження кількості бактерій приблизно в 1000 разів, і обробка AAC з більш високим навантаженням антибіотика призводила до зниження кількості бактерій приблизно в 10000 разів.

РОЗЩЕПЛЮВАНІ СТАФОПАЇНОМ В ЛІНКЕРИ ДЛЯ КОН'ЮГАТИВ АНТИТИЛО-АНТИБІОТИК

Лінкер, розщеплюваний протеазою, як описано в даному документі, розщеплюється стафопаїном В, ендopeптидазою, секретованою *S. aureus*. Щоб сконструювати лінкер, що буде специфічно розщеплюватись бактерією *Staphylococcus aureus*, протеазну активність супернатанту клітинної культури *S. aureus* характеризували з використанням FRET пептидної бібліотеки. За результатами цього скринінгу була ідентифікована унікальна субстратна специфічність. З використанням цього субстрату з супернатанту культури клітин був очищений фермент, що має цю активність, ідентифікований як стафопаїн В. Ґрунтуючись на цій ідентифікації, був створений лінкер, оптимізований для розщеплення стафопаїном В, і зв'язаний з піперазино-рифаміцином:



Піперазино-рифаміцин є потужним рифалазил-подібним антибіотиком. Продemonстрована ефективність отриманого AAC у моделях інфекції MRSA *in vitro* й *in vivo*, що припускає новий механізм спрямованої дії на інфекції MRSA. Стафопаїн В являє собою секретовану цистеїнову протеазу з ендopeптидаз сімейства папаїну (реєстраційний номер CAS 347841-89-8, Sigma-Aldrich #S3951, Filipek et al (2005) J. Biol. Chem. 280 (15): 14669–74), що має унікальну субстратну специфічність у відношенні об'ємних ароматичних бічних ланцюгів у положенні P2. Експресія стафопаїну В контролюється геном *agr* (або допоміжним геном-регулятором) системи дистанційних мікроб-мікробних взаємодій (системи quorum sensing) (Janzon, L. and S. Arvidson (1990) The EMBO journal 9(5): 1391-1399) як частина стафілококового протеолітичного каскаду (SCP). Agr модулює експресію секретованих протеаз та інших факторів вірулентності *S. aureus*, у тому числі ауринолізину, V8 і стафопаїну А (Shaw, L., E. Golonka, et al. (2004) Microbiology 150(Pt 1): 217-228). Стафопаїн В є потужним чинником вірулентності через його здатність руйнувати сполучні тканини хазяїна, а також збільшувати активність деяких білків імунної системи (Imamura, T., S. Tanase, et al. (2005) Journal of experimental medicine 201(10): 1669-1676; Potempa, J., A. Dubin, et al. (1988) Journal of biological chemistry 263(6): 2664-2667; Ohbayashi, T., A. Irie, et al. (2011) Microbiology 157(Pt 3): 786-792; Smagur, J., K. Guzik, et al. (2009); Biological chemistry 390(4): 361-371; Smagur, J., K. Guzik, et al. (2009); Journal of innate immunity 1(2): 98-108; Kulig, P., B. A. Zabel, et al. (2007); Journal of immunology 178(6): 3713-3720). Роль, яку стафопаїн В грає як важливий фактор вірулентності, робить його привабливою мішенню для опосередкованого протеазою вивільнення антибіотика.

Ідентифікація субстратів розщеплюваних протеазами *Staphylococcus aureus*.

Для ідентифікації субстратів, легко розщеплюваних ендopeптидазами *S. aureus*, супернатант від нічної культури штаму *S. aureus* Wood46 інкубували з комерційно доступною FRET пептидною бібліотекою. Штам Wood46 містить конститутивно активний локус *agr*, таким чином, штам Wood46 має підвищену експресію протеази у порівнянні з диким типом. FRET пептидна бібліотека, Rapid Endopeptidase Profiling Library або PepSets™ REPLi (Mimotopes,

Victoria, Australia), складається з 512 лунок з 8 флуорогенними пептидами з внутрішньомолекулярним гасінням флуоресценції на ямку в 96-ямкових планшетах. Пептиди флуоресціюють при розщепленні, що дозволяє контролювати протеолітичну активність у реальному часі. Кожен пептид має варіабельну корову частину, що включає три амінокислотних залишки, фланковану залишками гліцину з обох боків, і додаткові два залишки лізину на С-кінці для забезпечення розчинності. Супернатант від культури Wood46 додавали до бібліотеки, і планшети інкубували протягом ночі при 37 °C. Ямки, для яких спостерігалось збільшення флуоресценції в 15 разів і більше (всього 12 з 512 ямок), аналізували за допомогою LC-MS (Agilent Q-TOF) для визначення продуктів розщеплення. Сайти розщеплення були ранжовані на основі частоти (Таблиця 4). Серед найбільш часто розщеплюваних сайтів, був виявлений патерн субстратної специфічності, зокрема, перевага об'ємних гідрофобних бічних ланцюгів Phe і Tyr у положенні P2.

Таблиця 4

Переважаючі амінокислоти у послідовностях REPLi, розщеплюваних протеазами, синтезованими Wood46. Зазначена частота в кожному положенні (%)

Залишки	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'
G	71,4	50,0	0,0	28,6	35,7	100,0
I/L	21,4	7,1	0,0	0,0	7,1	0,0
A/V	0,0	14,3	0,0	50,0	28,6	0,0
N/Q	7,1	7,1	0,0	0,0	7,1	0,0
S/T	0,0	14,3	0,0	14,3	0,0	0,0
F/Y	0,0	0,0	100,0	0,0	21,4	0,0
K/R	0,0	7,1	0,0	7,1	0,0	0,0

Частота амінокислотних залишків для кожного положення у FRET пептидах у ямках, для яких спостерігалось найбільше збільшення флуоресценції. Пептиди REPLi містять послідовність MCA-Gly-Gly-Gly-Xaa-Yaa-Zaa-Gly-Gly-DPA-Lys-Lys (SEQ ID NO: 132), де Xaa, Yaa і Zaa варіюють. Залишки гліцину, представлені в таблиці, являють собою залишки Gly, які фланкують варіабельну корову частину. Хоча залишки Gly найбільш часто зустрічаються в деяких положеннях, вони мало говорять про субстратну специфічність. При розробці лінкерів переваги віддавалися амінокислотам з варіабельною коровою частиною. Амінокислоти, які не були найбільш часто зустрічаючимися, були виключені з таблиці.

Розробка та кон'югування FRET субстрату, розщеплюваного протеазою MRSA *in vitro*.

Пептид конструювали та синтезували, використовуючи залишки, що найбільш часто зустрічаються, в розщеплюваних пептидах за даними скринінгу REPLi з врахуванням інформації про специфічність для P1, P2 і P3. Пептид мав послідовність GGAFAGGG (SEQ ID NO: 126) і повинен був розщеплюватись між GGAF (SEQ ID NO: 131) і GGG. Пептид синтезували, використовуючи метод твердофазного синтезу з включенням флуоресцентних барвників, тетраметилпродаміну (TAMRA) і флуоресцеїну в якості FRET пари (Фіг. 26), на N-кінець пептиду для кон'югації з залишками цистеїну антитіла додавали малеїмідо-пропіонову кислоту. Отриманий mal-FRET-пептид, малеїмідо-пропіонова кислота (MP)-Lys(TAMRA)-Gly-Gly-Ala-Phe-Ala-Gly-Gly-Gly-Lys(флуоресцеїн) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 125) кон'югували з ThioMab антитілом з введеним методом генної інженерії цистеїном, tio-S4497. mal-FRET-пептид також кон'югували з анти-Her2 ThioMab трастузумабом з введеним методом генної інженерії цистеїном як незв'язуючий контроль.

Tio-S4497-MP-K(Tamra)GGAFAGGGK(флуоресцеїн) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 125) FRET кон'югат і несполучний контрольний FRET кон'югат, Tio-трастузумаб-MP-K(Tamra)GGAFAGGGK(флуоресцеїн) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 125), інкубували з культурами Wood46 (Фіг. 28) і USA300 дикого типу (Фіг. 29) у логарифмічній фазі росту при щільності клітин 10^8 клітин/мл і 10^7 клітин/мл у триптичному соєвому бульйоні (TSB). Кінцева концентрація MP-Lys(TAMRA)-Gly-Gly-Ala-Phe-Ala-Gly-Gly-Gly-Lys(флуоресцеїн) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 125) у всіх ямках була 2 мкМ. Флуоресценцію реєстрували в часі при 37 °C, екстинкція $\lambda 495$ нм/ емісія $\lambda 518$ нм. Збільшення інтенсивності флуоресценції спостерігали у випадку 4497-mal-FRET-пептид кон'югату як для Wood46, так і для USA300, що свідчить про те, що FRET пептид розщеплювався протеазою *S. aureus*, і протеаза була присутня в обох штаммах. Лінкерна частина MP-K(Tamra)GGAFAGGGK(флуоресцеїн)

(«коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 125) розщеплювалася як у випадку Wood46, так й у випадку USA300, коли була кон'югована з антитілом, що зв'язується з *S. aureus*. Було важливо підтвердити розщеплення цієї моделі лінкера в USA300, оскільки USA300 відноситься до клінічно значимого штаму MRSA, мішені для потенційного терапевтичного агента кон'югат антитіло-антибіотик (AAC). Для FRET кон'югату тіо-S4497-MP-K(Тамра)GGAFFAGGGK(флуоресцеїн) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 125) показали збільшення флуоресценції в обох штаммах, що свідчить про те, що лінкер розщеплюється протеазою *S. aureus*, і протеаза є присутньою у клінічно значимому штамі MRSA, USA300. Щільність клітин впливає на розщеплення, розщеплення відбувається швидше в культурах з більш високою щільністю клітин. Для не зв'язуючого контролю, кон'югату тіо-трастузумаб-MP-K(Тамра)GGAFFAGGGK (флуоресцеїн) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 125), не було показано збільшення флуоресценції в жодній з тестованих умов.

На основі розщеплюваного субстрату, ідентифікованого в клітинних аналізах, був отриманий інтермедіат лінкер-антибіотик LA-59 (Таблиця 2), який кон'югували з антитілами з утворенням анти-MRSA з важким ланцюгом, у який методом генної інженерії введений цистеїн, тіо-S 4497 (AAC-113) і тіо-S 4462 (AAC-114), і анти-HER2 з легким ланцюгом тіо-трастузумабу (AAC-115), наведених у Таблиці 3. Для GGAFFAGGG (SEQ ID NO: 126), зв'язаного з AAC, продемонстровані більш високі швидкості розщеплення у порівнянні з FRET-пептидом при інкубації з концентрованим супернатантом з нічної культури Wood46, що свідчить про те, що лінкер-антибіотик є кращим субстратом для невідомої досліджуваної протеази. Розщеплення відбувалося в очікуваному сайті між аланіном і гліцином у зв'язаному з AAC (AAC-113, AAC-114, AAC-115) GGAFFAGGG («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 126). Цей лінкер-антибіотик (LA-59) не є оптимізованою системою доставки для антибіотика, оскільки при розщепленні вивільняється GGG-рифаміцин, а не вільний рифаміцин. Хоча терапевтичний потенціал цього інтермедіату лінкер-антибіотик може бути невизначеним, його здатність ефективно розщеплюватись протеазою робить його корисним інструментом для ідентифікації фракцій, що містять активну представляючу інтерес протеазу. Інтермедіат лінкер-антибіотик LA-59 кон'югували з Fab частиною антитіла тіо-S4497 (Scheer, J. M., W. Sandoval, et al. (2012). Plo one 7(12): e51817). Антитіла Fab з введеним методом генної інженерії цистеїном, "thioFAB", мають один реакційноздатний цистеїн, що дозволяє провести сайт-специфічну кон'югацію однієї сполуки з реакційноздатним тіолом. ThioFAB S-4497 реагував з 3-кратним молярним надлишком LA-59 відносно thioFAB протягом 1 години на 50 мМ Трис із рН 7,5, 150мМ NaCl при кімнатній температурі. Надлишок LA-59 видаляли від AAC діалізацією у PBS. Отриманий кон'югат, thioFAB S4497-MC-GGAFFAGGG-(pBpBOR) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 126) (Фіг. 27) використовували як інструмент для ідентифікації активних фракцій, де розщеплення лінкера виявляли за допомогою LC-MS аналізу.

Оптимізація лінкерів для ефективного розщеплення стафопаїном B.

В інтермедіаті лінкер-антибіотик LA-59 MC-GGAFFAGGG-(pBpBOR) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 126) залишки субстрату оптимізовані у положеннях P1, P2 і P3. Використовуючи результати скринінгу REPLi, були розроблені та синтезовані два нових лінкери з включенням кращого залишку для P4 (Фіг. 30). малеїмідо-пропіонат-Leu-Ala-Phe-Ala-Ala («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 136) і малеїмідо-пропіонат-Leu-Ala-Phe-Gly-Ala («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 135) були синтезовані методом твердофазного синтезу. При скринінгу REPLi виявилось, що найбільш частими залишками у P4 були ізолейцин і лейцин (не з огляду на гліцин). Для обмеження кількості синтезованих лінкерів був вибраний тільки один залишок, лейцин. Ala і Gly чергували у положенні P1, щоб досліджувати їхній вплив на розщеплюваність. Також був включений залишок Ala у P1'. Як сурогатна заміна антибіотика до C-кінця обох лінкерів додавали QSY®7 (ксантиліум, 9-[2-[[4-[[[(2,5-діоксо-1-піролідиніл)окси]карбоніл]-1-піперидиніл]сульфоніл]феніл]-3,6-біс(метилфеніламіно)-NHS ефір, хлорид, реєстраційний номер CAS 304014-12-8, Life Technologies) (Фіг. 30). Включення QSY®7 дозволяло оцінювати розщеплюваність цих лінкерів без використання дорогих і важкосинтезованих антибіотиків.

Експериментальні лінкери мал-пептид-QSY7 кон'югували з thioFAB S4497 для оцінки розщеплюваності цих лінкерів. Кон'югування проводили, як описано раніше. Оцінювали розщеплюваність отриманих кон'югатів thioFAB S4497 лінкер-QSY7 стафопаїном B, стафопаїном A і людським катепсином B при рН 7,2 (Таблиця 5). Як і стафопаїн B, стафопаїн A являє собою секретовану цистеїнову протеазу *S. aureus* із протеаз сімейства папаїну. Стафопаїн A структурно аналогічний стафопаїну B, але має більш широку субстратну специфічність (Filipek, R., M. Rzychon, et al. (2003). The Journal of biological chemistry 278(42): 40959-40966). Катепсин B, цистеїнова лізосомальна протеаза ссавців, також є представником

ендопептидаз сімейства папаїну. Вважається, що катепсин В розщеплює лінкер валін-цитрулін, що використовується в інших лінкерах AAC, описаних у цьому патенті.

Таблиця 5

Розщеплення оптимізованих лінкерів стафопаїнами
і людським катепсином В

		Стафопаїн А	Стафопаїн В	Катепсин В
MP-LAFGA-QSY7 («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 135) (Фіг. 30)	Відсоток розщеплення рН 7,2	38	100	100
	Продукт розщеплення	A-QSY7	A-QSY7	A-QSY7
MP-LAFAA-QSY7 («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 136) (Фіг. 30)	Відсоток розщеплення рН 7,2	23	100	100
	Продукт розщеплення	A-QSY7	A-QSY7	A-QSY7, QSY7
MP-LAFG-PABC- (піперазиноBOR) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 128) LA-104	Відсоток розщеплення рН 5	100	100	100
	Відсоток розщеплення рН 7,2	46	100	64
	Продукт розщеплення	піперазино- рифаміцин	піперазино- рифаміцин	

5 У Таблиці 5 наведені дані аналізів розщеплення оптимізованих лінкерів, кон'югованих з thioFAB, під дією стафопаїну А, стафопаїну В і катепсину В. Отриманий лінкер-антибіотик, MP-LAFG-піперазино-рифаміцин («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 128), ефективно розщеплюється всіма трьома протеазами. Розщеплення стафопаїнами призводить до вивільнення вільного рифаміцину. Розщеплення катепсином В призводить до вивільнення Phe-Gly-піперазино-рифаміцину (Приклад 26).

10 Розробка та кон'югування лінкера, розщеплення якого стафопаїном В призводить до вивільнення вільного антибіотика.

За результатами аналізів розщеплення тестованих експериментальних лінкерів для приєднання антибіотика був вибраний mal-LAFGA («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 135). Потрібна була подальша оптимізація цього лінкера, щоб при протеолітичному розщепленні лінкера вивільнявся вільний антибіотик. Щоб досягти цього, Ala у P1' заміщали на п-амінобензил (PAB) або п-амінобензилоксикарбоніл (PABC). Для одержання інтермедіатів лінкер-антибіотик LA-88, MC-LAFG-PAB-(диметиламіно-3-піролоBOR) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 128), і LA-104, MP-LAFG-PABC-(піперазиноBOR) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 128), до С-кінця цього лінкера додавали піперазино-рифаміцин. При розщепленні після Gly у положенні P1 групи PAB і PABC піддаються саморозщепленню, вивільняючи вільний антибіотик. LA-88 кон'югували з утворенням тіо-S4497-v8-LCV205C-MC-LAFG-PAB-(диметиламіно-3-піролоBOR) AAC-163 («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 128) (Таблиця 3). LA-104 кон'югували з утворенням AAC-193, AAC-215 і AAC-222. Аналізи розщеплення AAC 193 стафопаїном А, стафопаїном В і катепсином В проводили при рН 7,2 і рН 5. Ці значення рН були вибрані, оскільки вони рівні рН у плазмі (рН 7,2) або в середовищі фаголізосоми (рН 5). Стафопаїн В демонстрував 100% розщеплення як при рН 5, так і при 7,2. Стафопаїн А демонстрував 100% розщеплення при рН 5 і 64% розщеплення при рН 7,2.

25 Заміна Ala на PABC у групі P1' призводила до зміни сайту розщеплення лінкера катепсином В. При розщепленні катепсином В вивільнявся Phe-Gly-PABC-(піперазиноBOR). При застосуванні як терапевтичний агент, потенційне розщеплення цього лінкера катепсином В з більшою ймовірністю буде відбуватися в лізосомальному компартменті макрофагів. У цих умовах інші протеази, у тому числі стафопаїн В, можуть далі процесувати FG-PABC-піперазино-

рифаміцин з вивільненням вільного антибіотика.

Інтермедіат лінкер-антибіотик MP-LAFG-PABC-(піперазиноBOR) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 128) LA-104 кон'югували з ThioMab S4497 для оцінки ефективності отриманих AAC-193, AAC-215, AAC-222 *in vitro* й *in vivo*. Також кон'югацією LA-104 з ThioMab анти-Her2 і ThioMab анти-gD, де обидва антитіла являють собою контролі з тим же самим ізотипом, були отримані два контрольних кон'югати. Для кон'югату за легким ланцюгом ThioMab 4497 MP-LAFG-PABC-піперазино-рифаміцин («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 128) AAC-215 співвідношення лікарський засіб/ антитіло (DAR) становило 1,6, як і для контрольного кон'югату ThioMab анти-gD. Для кон'югату ThioMab анти-Her2 mal-LAFG-PABC-піперазино-рифаміцин («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 128) співвідношення DAR становило 1,5.

Для ідентифікації субстратів, легко розщеплюваних секретованими протеазами, супернатант клітинної культури *S. aureus* скринували з використанням FRET пептидної бібліотеки. Результати цього скринінгу показали, що у переважній більшості випадків вимірювана протеаза активність може бути приписана одній секретованій цистеїновій протеазі *S. aureus*, стафопаїну B. Пептидні лінкери, сконструйовані для розщеплення стафопаїном B, були оптимізовані, і був ідентифікований субстрат, ефективно розщеплюваний з вивільненням вільного антибіотика. Отриманий лінкер також розщеплюється протеазою стафопаїном A *S. aureus* і людською протеазою катепсином B, що є цистеїновими протеазами.

При кон'югації з антитілом, що зв'язується з *S. aureus*, отриманий AAC має ефективність як *in vitro*, так і *in vivo*. Ендогенні енопептидази MRSA забезпечують механізм для спрямованої дії на інфекції MRSA і вивільнення антибіотика залежним безпосередньо від захворювання способом. Здатність цього лінкера розщеплюватись протеазами, секретованими *S. aureus*, забезпечує можливість спрямованої дії на MRSA, що перебувають у людських нейтрофілах, а також позаклітинно у плазмі/ тканині хазяїна. Ця подвійна дія забезпечує вивільнення високих концентрацій антибіотика як у внутрішньоклітинному, так і у позаклітинному місці інфекції.

Експресія стафопаїну A і B підвищена в людських нейтрофілах і вважається важливим фактором вірулентності (Burlak, C., et al. (2007) Cellular microbiology 9(5):1172-1190), роблячи їх привабливими мішенями для опосередкованого протеазами вивільнення антибіотиків. Людський катепсин B також розщеплює лінкер, представляючи альтернативний шлях вивільнення. Спостережувана ефективність AAC, імовірно, є результатом активності множини протеаз, як протеаз *S. aureus*, так і протеаз хазяїна, що беруть участь у вивільненні антибіотика або фрагмента антибіотика. Стабільний у сироватці крові лінкер, розщеплюваний набором протеаз, забезпечує механізм вивільнення, що дозволить обійти стійкість бактерії.

СПОСОБИ ЛІКУВАННЯ ТА ЗАПОБІГАННЯ ІНФЕКЦІЙ КОН'ЮГАТАМИ АНТИТІЛО-АНТИБІОТИК

AAC даного винаходу використовуються як антимікробні агенти, ефективні проти ряду грампозитивних бактерій людини та тварин, у тому числі, проти *Staphylococci*, наприклад, *S. aureus*, *S. saprophyticus* і *S. simulans*; *Listeria*, наприклад, *Listeria monocytogenes*; *Enterococci*, наприклад, *E. faecalis*; *Streptococci*, наприклад, *S. pneumoniae*; *Clostridium*, наприклад, *C. difficile*.

Персистуюча бактеріємія може бути результатом інтерналізації бактерій у клітині-хазяїні. За допомогою механізмів, які дотепер залишаються не до кінця зрозумілими, інтерналізовані патогени можуть уникати імунного розпізнавання та виживати всередині клітин-хазяїнів. Такі організми включають *S. aureus*, *Salmonella* (наприклад, *S. typhi*, *S. choleraesuis* і *S. enteritidis*), *Legionella* (наприклад, *L. pneumophila*), *Listeria* (наприклад, *L. monocytogenes*), *Brucella* (наприклад, *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*), *Chlamydia* (*C. pneumoniae*, *C. trachomatis*), *Rickettsia* spp., *Shigella* (наприклад, *S. flexneri*) і *mycobacteria*.

Після проникнення в кров'яне русло *S. aureus* може викликати метастатичні інфекції по суті у будь-якому органі. Вторинні інфекції виникають приблизно в одній третині всіх випадків до початку терапії (Fowler et al., (2003) Arch. Intern. Med. 163:2066-2072) і навіть у 10% пацієнтів після початку терапії (Khatib et al., (2006) Scand. J. Infect. Dis., 38:7-14). Особливостями інфекцій є більші скупчення гною, руйнування тканини й утворення абсцесів (у всіх випадках виявляються більші кількості нейтрофілів). Тільки приблизно у 5% пацієнтів розвиваються ускладнення, якщо бактеріємія проходить протягом 48 годин, але цей рівень зростає до 40%, якщо бактеріємія триває три дні.

Незважаючи на те, що *S. aureus* зазвичай вважаються позаклітинним патогеном, що секретує токсини, існують дані про те, що він може виживати всередині ендотеліальних клітин, кератиноцитів, фібробластів й остеокластів (Alexander et al, (2001) Appl. Microbiol. Biotechnol. 56:361-366; Garzoni et al, (2009) Trends Microbiol. 17:59-65). Нейтрофіли та макрофаги є ключовими компонентами вродженої імунної відповіді хазяїна на бактеріальну інфекцію. Ці клітини інтерналізують *S. aureus* шляхом фагоцитозу, що може бути посилений за рахунок

антитіл, комплементу або лектинів хазяїна, таких як маноза-зв'язуючий білок, які можуть зв'язуватись одночасно з патогеном і нейтрофілами, макрофагами та іншими професійними фагоцитами. Як згадувалося раніше, *S. aureus* не тільки виживає в лізосомальному оточенні, але в дійсності може використовувати це як механізм персистенції в хазяїні.

Кон'югати антитіло-антибіотик (AAC) даного винаходу мають значні терапевтичні переваги для лікування внутрішньоклітинних патогенів, у тому числі тих, які перебувають у фаголізосомах. В одному з варіантів втілення, патоген інтерналізований у клітини лейкоцитів, і внутрішньоклітинним компонентом є фаголізосома. В інтактному AAC варіабельна область антитіла зв'язується з антигеном клітинної поверхні бактерій (опсонізація). Не бажаючи бути зв'язаними якою-небудь теорією, автори думають, що, згідно з одним із механізмів, зв'язування антитіла AAC з клітинною поверхнею бактерій залучає фагоцити до бактерій. Частина Fc антитіла зв'язується з Fc рецептором на фагоциті, полегшуючи фагоцитоз. Після того як відбувся фагоцитоз комплексу AAC-бактерія, при злитті з лізосомою лінкер AAC розщеплюється під дією фаголізосомальних ферментів, що призводить до вивільнення активного антибіотика. Через обмежений простір і щодо високої локальної концентрації Abx (приблизно 10^4 на бактерію) фаголізосома більше не підтримує виживання внутрішньоклітинного патогену (Fig. 5). Оскільки AAC по суті являє собою неактивні проліки, терапевтичний індекс антибіотика може бути збільшений у порівнянні з вільною (некон'югованою формою). Антитіло забезпечує патоген-специфічну спрямовану дію, у той час розщеплюваний лінкер розщеплюється в умовах, характерних для внутрішньоклітинної локалізації збудника. Дія може бути вчинена безпосередньо на опсонізований патоген, а також на інші патогени, які спільно локалізовані у фаголізосомах. У певному аспекті, патогеном є *S. aureus*.

Толерантність до антибіотика являє собою здатність патогена, що викликає захворювання, бути стійким до знищення антибіотиками та іншими антимікробними агентами, і за механізмом вона відрізняється від множинної лікарської стійкості (Lewis K (2007). "Persist cells, dormancy and infectious disease". *Nature Reviews Microbiology* 5 (1): 48–56. doi:10.1038/nrmicro1557). Швидше за все, ця форма толерантності обумовлена невеликою субпопуляцією мікробних клітин, що називають персистуючими (Bigger JW (14 October 1944). "Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilization". *Lancet* 244 (6320): 497–500). Ці клітини не мають множинну лікарську стійкість у класичному змісті, але, скоріше, є дрімаючими клітинами, які толерантні до лікування антибіотиками, що знищують їх генетично ідентичні родинні клітини. Ця толерантність до антибіотиків обумовлена фізіологічним станом, при якому відсутній розподіл, або він відбувається надзвичайно повільно. Коли антимікробне лікування не призводить до знищення персистуючих клітин, вони стають джерелом повторюваних хронічних інфекцій. Кон'югати антитіло-антибіотик даного винаходу мають унікальну властивість знищувати ці персистуючі клітини та придушувати появу бактеріальних популяцій з множинною лікарською стійкістю.

В іншому варіанті втілення, AAC даного винаходу може використовуватись для лікування інфекції незалежно від внутрішньоклітинного компартмента, в якому патоген виживає.

В іншому варіанті втілення, AAC також може використовуватись для спрямованої дії на бактерії у плаваючій формі або у вигляді плівок (наприклад: *S. aureus*, *K. pneumonia*, *E. coli*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* і *Enterobacteriaceae*) за рахунок опосередкованої антитілами опсонізації, що призводить до інтерналізації бактерій професійними фагоцитами. Коли фагосома зіллється з лізосомою, у кислому або протеолітичному середовищі фаголізосоми з AAC будуть виділятися досить високі концентрації вільного антибіотика для знищення фагоцитованого патогена.

Способи лікування інфекцій кон'югатами антитіло-антибіотик (AAC) даного винаходу включають лікування бактеріальних легневих інфекцій, таких як пневмонія, викликана *S. aureus*, або туберкульоз, бактеріальних інфекцій очей, таких як трахома та кон'юнктивіт, інфекцій серця, головного мозку або шкіри, інфекцій шлунково-кишкового тракту, таких як діарея мандрівників, остеомієліт, виразковий коліт, синдром роздратованого кишечника (СРК), хвороба Крона та ЗЗК (запальне захворювання кишечника) загалом, бактеріальних менінгітів й абсцесів у будь-якому органі, такому як м'язи, печінка, оболонки головного мозку або легені. Бактеріальні інфекції можуть бути в інших частинах тіла, таких як сечовивідні шляхи, кров'яне русло, рана або місце встановлення катетера. AAC даного винаходу корисні для лікування інфекцій, що погано піддаються лікуванню, які включають біоплівки, імпланти або недоступні місця (наприклад, остеомієліт й інфекції протезних зв'язок), і інфекції з високою смертністю, такі як внутрішньолікарняна пневмонія та бактеріємія. Уразливі групи пацієнтів, яких можна лікувати для запобігання інфекції, викликаній *Staphylococcal aureus*, включають пацієнтів після гемодіалізу, пацієнтів з ослабленим імунітетом, пацієнтів у відділеннях інтенсивної терапії та

деяких пацієнтів, які перенесли хірургічне втручання. В іншому аспекті, даний винахід передбачає спосіб знищення, лікування або запобігання мікробної інфекції у тварин, переважно, у ссавців, і, ще переважніше, у людини, який включає введення тварині ААС або фармацевтичної композиції ААС даного винаходу. Даний винахід також підходить для лікування або запобігання захворювань, пов'язаних з мікробними інфекціями, або є результатом таких мікробних інфекцій. Такі способи лікування або запобігання можуть включати пероральне, місцеве, внутрішньовенне, внутрішньом'язове або підшкірне введення композиції даного винаходу. Наприклад, до хірургічного втручання або встановлювання внутрішньовенного катетера, у випадку знаходження у відділенні інтенсивної терапії, при трансплантації, у процесі або після хіміотерапії раку або у випадку інших ситуацій, пов'язаних з високим ризиком інфекції, ААС даного винаходу можуть бути введені для запобігання початку або поширення інфекції.

Бактеріальна інфекція може бути викликана бактерією в активній і неактивній формі, і ААС вводять у кількості та протягом періоду часу, які достатні для лікування як активної, так і неактивної, латентної форми бактеріальної інфекції, тривалість лікування якої довше, ніж необхідно для лікування активної форми бактеріальної інфекції.

У результаті аналізу різних грам-позитивних бактерій виявлено, що WTA бета експресуються на всіх *S. aureus*, у тому числі штамми MRSA і MSSA, а також на штаммах, що не відносяться до *Staph aureus*, таких як *S. saprophyticus* і *S. simulans*. WTA альфа (альфа-GLcNAc рибіт WTA) присутні на більшості, але не на всіх *S. aureus*, і також присутні на *Listeria monocytogenes*. WTA відсутні у грам-негативних бактерій. Таким чином, один аспект даного винаходу являє собою спосіб лікування пацієнта, інфікованого *S. aureus*, або *S. saprophyticus*, або *S. simulans*, шляхом введення терапевтично ефективної кількості анти-WTA бета-ААС даного винаходу. Інший аспект даного винаходу являє собою спосіб лікування пацієнта, інфікованого *S. aureus* або *Listeria monocytogenes*, шляхом введення терапевтично ефективної кількості анти-WTA альфа-ААС даного винаходу. Даний винахід також включає спосіб запобігання інфекції, викликаних *S. aureus*, або *S. saprophyticus*, або *S. simulans*, шляхом введення терапевтично ефективної кількості анти-WTA бета-ААС даного винаходу в умовах лікарні, наприклад, при хірургічному втручанні, у випадку опікового хворого та при трансплантації органів.

У пацієнта, якому потрібне лікування від бактеріальної інфекції, що визначає лікар-фахівець у даній області, також необов'язково може бути визначений вид бактерії, яким він інфікований. Оскільки стан пацієнта з бактеріальною інфекцією може погіршитися дуже швидко, протягом годин, при надходженні в лікарню йому можуть бути введені анти-WTA-ААС даного винаходу поряд із одним або декількома стандартами лікування антибіотиками, такими як ванкоміцин. Коли діагностичні результати стають відомі та вказують на наявність, наприклад, інфекції *S. aureus*, можна продовжувати лікування пацієнта анти-WTA ААС. Таким чином, в одному з варіантів втілення способу лікування бактеріальної інфекції або, зокрема, інфекції *S. aureus*, пацієнту вводять терапевтично ефективну кількість анти-WTA бета ААС. У способах лікування або запобігання даного винаходу ААС даного винаходу можуть бути введені як єдиний терапевтичний агент або разом із іншими агентами, такими як агенти, які описані нижче. Як показано в доклінічних моделях, ААС даного винаходу перевершує ванкоміцин для лікування MRSA. Порівняння ААС з СОС можна здійснити, наприклад, за зниженням рівня смертності. У пацієнта, що піддається лікуванню, варто оцінювати чутливість до лікування ААС за допомогою різних факторів. Приклади ознак і симптомів, які лікарі можуть використовувати для оцінки поліпшень у пацієнтів, включають наступні ознаки й симптоми: нормалізація рівня лейкоцитів у крові, якщо він був підвищений на момент постановки діагнозу, нормалізація температури тіла, якщо вона була підвищена (лихоманка) на момент постановки діагнозу, кліренс посівів крові, візуальні поліпшення стану ран, у тому числі зменшення еритеми та дренажу гною, зниження потреби в штучній вентиляції легенів, наприклад, пацієнту, що перебуває на штучній вентиляції легенів, потрібно менше кисню або менша швидкість вентилявання, більше не потрібна вентиляція легенів, якщо пацієнт перебував на штучній вентиляції легенів на момент постановки діагнозу, потрібне застосування меншої кількості лікарських засобів для підтримки стабільного кров'яного тиску, якщо ці лікарські засоби були необхідні на момент постановки діагнозу, нормалізація відхилень у лабораторних аналізах, які припускають органну недостатність, таких як підвищений креатинін або тести функціонування нирок, якщо вони були не нормальними на момент постановки діагнозу, і поліпшення рентгенівської візуалізації (наприклад, рентгена грудної клітки, якщо раніше передбачалася пневмонія). У пацієнта у відділенні інтенсивної терапії ці фактори варто вимірювати, щонайменше, щодня. Лихоманку можна контролювати за рівнем лейкоцитів у крові, включаючи абсолютну кількість нейтрофілів у крові, а також за тим, що більше не спостерігається "зрушення вліво" (поява бластних клітин,

що вказує на збільшення продукції нейтрофілів у відповідь на активну інфекцію).

В контексті способів лікування даного винаходу пацієнт із бактеріальною інфекцією піддається лікуванню, якщо за оцінкою лікаря спостерігається значне вимірне поліпшення, щонайменше, двох або декількох згаданих вище факторів у порівнянні із значеннями, ознаками або симптомами до або на початку лікування, або в момент постановки діагнозу. У деяких варіантах втілення, спостерігається вимірне поліпшення 3, 4, 5, 6 або більше згаданих вище факторів. У деяких варіантах втілення, вимірне поліпшення факторів становить, щонайменше, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% або 100% у порівнянні із значеннями до лікування. Як правило, пацієнт може вважатися повністю вилікованим від бактеріальної інфекції (наприклад, інфекції, викликаной *S. aureus*), якщо вимірні поліпшення у пацієнта включають наступне: i) відсутність росту раніше ідентифікованих бактерій при повторних посівах крові або в культурах тканини (зазвичай декількох); ii) нормалізацію лихоманки; iii) нормалізацію рівня WBC; i iv) свідчення повного, або часткового відновлення функціонування органів (легені, печінка, нирки, судинний колапс), з огляду на існуючі раніше у пацієнта супутні захворювання.

Дозування

У будь-якому з наведених вище аспектів, доза AAC для лікування інфікованого пацієнта становить зазвичай від приблизно 0,001 до 1000 мг/кг/день. В одному з варіантів втілення, пацієнта з бактеріальною інфекцією лікують дозою AAC у діапазоні від приблизно 1 мг/кг до приблизно 100 мг/кг, як правило, від приблизно 5 мг/кг до приблизно 90 мг/кг, конкретніше, від 10 мг/кг до 50 мг/кг. AAC можна давати щодня (наприклад, однократна доза від 5 до 50 мг/кг/день) або рідше (наприклад, однократна доза 5, 12,5 або 25 мг/кг/тиждень). Одна доза може бути розділена на 2 дні, наприклад, 25 мг/кг в один день та 25 мг/кг наступного дня. Пацієнту може вводитись доза кожні 3 дні (q3D), один раз на тиждень через кожні два тижні (qOW) протягом 1-8 тижнів. В одному з варіантів втілення, пацієнту вводять AAC даного винаходу шляхом внутрішньовенного введення один раз на тиждень протягом 2-6 тижнів із стандартом лікування (SOC) для лікування бактеріальної інфекції, такої як інфекція, викликана *Staph A*. Тривалість лікування буде залежати від стану пацієнта або ступеня інфекції, наприклад, тривалість становить 2 тижні для неускладненої бактеріємії або 6 тижнів для бактеріємії з ендокардитом.

В одному з варіантів втілення, AAC вводять у початковій дозі від 2,5 до 100 мг/кг протягом одного-семи послідовних днів, після чого вводять підтримуючу дозу, яка складається від 0,005 до 10 мг/кг один раз кожні один-сім днів протягом одного місяця.

Спосіб введення

Для лікування бактеріальних інфекцій AAC даного винаходу можуть бути введені у будь-якій із зазначених вище доз внутрішньовенно (i.v.) або підшкірно. В одному з варіантів втілення, WTA-AAC вводять внутрішньовенно. У певному варіанті втілення, WTA-AAC, що вводять i.v. шляхом, являє собою WTA-бета AAC, конкретніше, WTA-бета AAC, у якому WTA-бета антитіло вибрано з групи антитіл з амінокислотними послідовностями, розкритими на Фіг. 14, Фіг. 15A, Фіг. 15B, Фіг. 16A і Фіг. 16B.

Комбінована терапія

Якщо буде потреба, як це визначено лікарем пацієнта, AAC може бути введений разом із одним або декількома додатковими терапевтичними або профілактичними агентами, наприклад, другим додатковим терапевтичним або профілактичним агентом.

В одному з варіантів втілення, другий антибіотик, що вводять у комбінації зі сполукою кон'югатом антитіло-антибіотик даного винаходу, вибраний з антибіотиків, що належать до наступних структурних класів: (i) аміноглікозиди; (ii) бета-лактами; (iii) макроліди/циклічні пептиди; (iv) тетрацикліни; (v) фторхіноліни/фторхінолони й (vi) оксазолідинони. Дивіться Shaw, K. and Barbachyn, M. (2011) Ann. N.Y. Acad. Sci. 1241:48-70; Sutcliffe, J. (2011) Ann. N.Y. Acad. Sci. 1241:122-152.

В одному з варіантів втілення, другий антибіотик, що вводять у комбінації зі сполукою кон'югатом антитіло-антибіотик даного винаходу, вибраний з кліндаміцину, новобіоцину, ретапамуліну, даптоміцину, GSK-2140944, CG-400549, ситафлоксацину, тейкопланіну, триклозану, нафтиридону, радезоліду, доксорубіцину, ампіциліну, ванкомицину, іміпенему, дорипенему, гемцитабіну, далбаванцину й азитроміцину.

Додатковими прикладами зазначених додаткових терапевтичних або профілактичних агентів є протизапальні агенти (наприклад, нестероїдні протизапальні лікарські засоби (НПЗЗ; наприклад, кетопрофен *detoprofen*, диклофенак, дифлунізал, етодолак, фенопрофен, флурбіпрофен, ібупрофен, індометацин, кетопрофен, меклофенамат, мефенамова кислота, мелоксикам, набумеон, напроксен натрію, оксапрозин, піроксикам, суліндак, толметин, целекоксиб, рофекоксиб, аспірин, холін саліцилат, салсалат і саліцилат натрію та магнію) і

стероїди (наприклад, кортизон, дексаметазон, гідрокортизон, метилпреднізолон, преднізолон, преднізон, триамцинолон)), антибактеріальні агенти (наприклад, азитроміцин, кларитроміцин, еритроміцин, гатифлоксацин, левофлоксацин, амоксицилін, метронідазол, пеніцилін G, пеніцилін V, метицилін, оксацилін, клоксацилін, диклоксацилін, нафцилін, ампіцилін, карбеніцилін, тикарцилін, мезлоцилін, піперацилін, азлоцилін, темоцилін, цефалотин, цефепір, цефрадин, цефалоридин, цефазолін, цефамандол, цефутоксим, цефалексин, цефпрозил, цефаклор, лоракарбефу, цефокситин, цефметазол, цефотаксим, цефтизоксим, цефтриаксон, цефоперазон, цефтазидим, цефиксим, цефподоксим, цефтибутену, цефдинір, цефпіром, цефепім, BAL5788, BAL9141, іміпенем, ертапенем, меропенем, азтреонам, клавуланат, сульбактам, тазобактам, стрептоміцин, неоміцин, канаміцин, пароміцин, гентаміцин, тобраміцин, амікацин, нетилміцин, спектиноміцин, сизоміцин, дибекалін, ізепаміцин, тетрациклін, хлортетрациклін, демеклоциклін, міноциклін, окситетрациклін, метациклін, доксициклін, телітроміцин, АВТ-773, лінкоміцин, кліндаміцин, ванкоміцин, оритаванцин, далбаванцин, тейкопланін, хінупристин і дальфопристин, сульфаніламід, п-амінобензойна кислота, сульфадіазин, сульфізоксазол, сульфаметоксазол, сульфаталідин, лінезолід, налідиксова кислота, оксолінова кислота, норфлоксацин, перфлоксацин, еноксацин, офлоксацин, цiproфлоксацин, темафлоксацин, ломефлоксацин, флероксацин, грепафлоксацин, спарфлоксацин, тровафлоксацин, клінафлоксацин, моксифлоксацин, геміфлоксацин, ситафлоксацин, даптоміцин гареноксацин, рамопланін, фаропенем, поліміксин, тигециклін, AZD2563 або триметоприм), антибактеріальні антитіла, включаючи антитіла до того ж самого або іншого антигена, до якого спрямований AAC, Ag, інгібітори агрегації тромбоцитів (наприклад, абциксимаб, аспірин, цилостазол, клопідогрел, дипіридамо, ептіфібатид, тиклопідин або тирофібан), антикоагулянти (наприклад, дальтепарин, данапароїдом, еноксапарин, гепарини, тинзапарин або варфарин), жарознижуючі (наприклад, ацетамінофен) або гіполіпідемічні агенти (наприклад, холестирамін, коlestипол, нікотинова кислота, гемфіброзил, пробукол, езетиміб, або статини, такі як аторвастатин, розувастатин, ловастатин, симвастатин, правастатин, церивастатин і флувастатин). В одному з варіантів втілення, AAC даного винаходу вводять у комбінації з стандартом лікування (SOC) для *S. aureus* (включаючи метицилін-стійкі та метицилін-чутливі штами). MSSA зазвичай лікують нафциліном або оксациліном, і MRSA зазвичай лікують ванкоміцином або цефалозиним.

Ці додаткові агенти можуть бути введені протягом 14 днів, 7 днів, 1 дня, 12 годин або 1 години після введення AAC, або одночасно з ним. Додаткові терапевтичні агенти можуть перебувати в тій же самій або в іншій фармацевтичній композиції, що й AAC. Якщо вони перебувають в інших фармацевтичних композиціях, то можуть бути використані різні способи введення. Наприклад, AAC може бути введений внутрішньовенно або підшкірно, тоді як другий агент може бути введений пероральним шляхом.

ФАРМАЦЕВТИЧНІ ЛІКАРСЬКІ ФОРМИ

Даний винахід також передбачає фармацевтичні композиції, що містять AAC, і способи лікування бактеріальної інфекції з використанням фармацевтичних композицій, що містять AAC. Такі композиції можуть також включати підходящі ексципієнти, такі як фармацевтично прийнятні ексципієнти (носії), у тому числі буфери, кислоти, основи, цукри, розріджувачі, гліданти, консерванти тощо, добре відомі в даній області техніки й описані в даному документі. Дані способи та композиції можуть бути використані як такі або в комбінації з іншими загальноприйнятими способами й/або агентами для лікування інфекційних захворювань. В одному з аспектів, даний винахід також передбачає фармацевтичні лікарські форми, що включають, щонайменше, одне антитіло даного винаходу й/або, щонайменше, один його кон'югат антитіло-антибіотик (AAC). У деяких варіантах втілення, фармацевтична лікарська форма включає 1) антитіло даного винаходу й/або його AAC і 2) фармацевтично прийнятний носій. У деяких варіантах втілення, фармацевтична лікарська форма включає 1) антитіло даного винаходу й/або його AAC та, необов'язково, 2) щонайменше, один додатковий терапевтичний агент.

Фармацевтичні композиції, що включають антитіло або AAC даного винаходу, одержують для зберігання шляхом змішування антитіла або AAC, що має бажаний ступінь чистоти, з фізіологічно прийнятними носіями, ексципієнтами або стабілізаторами (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) у формі водних розчинів або у вигляді ліофілізованих або сухих лікарських форм. Прийнятні носії, ексципієнти або стабілізатори є нетоксичними для реципієнтів у застосовуваних дозах і концентраціях, і включають буфери, такі як фосфатний, цитратний, гістидиновий буфер та інші буфери на основі органічних кислот; антиоксиданти, у тому числі аскорбінову кислоту та метіонін; консерванти (такі як октадецилдиметилбензиламоній хлорид; хлорид гексаметонію; хлорид бензалконію, хлорид

бензетонію); фенол, бутиловий або бензиловий спирт; алкілпарабени, такі як метил- або пропілпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; і м-крезол); низькомолекулярні (приблизно менше 10 залишків) поліпептиди; білки, такі як альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди та інші вуглеводи, у тому числі глюкозу, манозу або декстрини; хелатуючі агенти, такі як ЕДТА; цукри, такі як сахароза, маніт, трегалоза або сорбіт; солеутворюючі протиіони, такі як натрій; комплекси металів (наприклад, комплекси Zn-білок); і/або неіонні сурфактанти, такі як TWEEN[®], PLURONICS[®] або поліетиленгліколь (PEG). Фармацевтичні лікарські форми, що використовуються для введення *in vivo*, зазвичай є стерильними, що легко досягається шляхом фільтрації через стерильні фільтраційні мембрани.

Активні інгредієнти також можуть бути укладені в мікрокапсули, отримані, наприклад, методом коацервації або шляхом міжфазної полімеризації, наприклад, гідроксиметилцелюлозні або желатинові мікрокапсули та полі-(метилметакрилатні) мікрокапсули, відповідно, у колоїдні системи доставки лікарських засобів (наприклад, ліпосоми, альбумінові мікросфери, мікроемульсії, наночастинки та нанокапсули) або в макроемульсії. Такі методи розкриті в *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Можуть бути отримані препарати з вповільненим вивільненням. Підходящі приклади препаратів з вповільненим вивільненням включають напівпроникні матрикси з твердих гідрофобних полімерів, що містять антитіло або ААС даного винаходу, де матрикси перебувають у вигляді формованих виробів, наприклад, плівки або мікрокапсули. Приклади матриксів з вповільненим вивільненням включають поліефіри, гідрогелі (наприклад, з полі(2-гідроксietил-метакрилату) або з полі(вінілового спирту)), полілактиди (патент США номер 3,773,919), співполімери L-глутамінової кислоти та γ -етил-L-глутамату, що не розщеплює етиленвінілацетат, що розщеплюють співполімери молочної кислоти та гліколевої кислоти, такі як LUPRON DEPOT[™] (ін'єктовані мікросфери, що складаються з співполімеру молочної кислоти та гліколевої кислоти й ацетату лейпроліду) і полі-D-(-)-3-гідроксимасляну кислоту. Тоді як полімери, такі як етиленвінілацетат і співполімер молочної кислоти та гліколевої кислоти можуть вивільняти молекули протягом 100 днів, деякі гідрогелі вивільняють білки протягом більш коротких періодів часу. Коли інкапсулювання антитіла або ААС залишаються в тілі протягом тривалих періодів часу, вони можуть денатурувати або агрегувати у результаті впливу вологи при 37 °C, що призводить до втрати біологічної активності та можливих змін імуногенності. Можуть бути розроблені раціональні стратегії для стабілізації залежно від залученого механізму. Наприклад, якщо виявлено, що агрегація відбувається за механізмом, що полягає в утворенні міжмолекулярного S-S зв'язку в результаті тіол-дисульфідного обміну, стабілізацію можна здійснити за рахунок модифікування сульфгідрильних залишків, ліофілізації з кислих розчинів, контролю вмісту вологи, використання відповідних добавок і розробки спеціальних полімерних матриксних композицій.

Антитіло може бути складене у вигляді будь-якої підходящої лікарської форми для доставки в цільову клітину/ тканину. Наприклад, антитіла можуть бути складені у види ліпосом, невеликих везикул, що складаються з різних типів ліпідів, фосфоліпідів і/або сурфактантів, що використовуються для доставки лікарського засобу ссавцеві. Компоненти ліпосом зазвичай організовані у вигляді бішару, аналогічно організації ліпідів у біологічних мембранах. Ліпосоми, що містять антитіла, одержують способами, відомими в даній області техніки, такими як способи, описані в Epstein et al., (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688; Hwang et al., (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4030; US 4485045; US 4544545; WO 97/38731; US 5013556.

Особливо корисні ліпосоми можуть бути отримані способом зворотньо-фазового випарювання ліпідної композиції, що включає фосфатидилхолін, холестерин і PEG-дериватизований фосфатидилетаноламін (PEG-PE). Ліпосоми продавлюють через фільтри з певним розміром пор для одержання ліпосом з бажаним діаметром. Фрагменти Fab' антитіла даного винаходу можуть бути кон'юговані з ліпосомами, як описано в Martin et al., (1982) *J. Biol. Chem.* 257:286-288, за допомогою реакції дисульфідного обміну. У ліпосомі необов'язково міститься хіміотерапевтичний агент (Gabizon et al., (1989) *J. National Cancer Inst.* 81(19):1484).

СПОСОБИ ТА КОМПОЗИЦІЇ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ТА ВИЯВЛЕННЯ

У деяких варіантах втілення, будь-які передбачені в даному документі антитіла використовують для виявлення наявності MRSA у біологічному зразку. Використовуваний у даному документі термін "виявлення" включає кількісне або якісне виявлення. "Біологічний зразок" включає, наприклад, кров, сироватку, плазму, тканину, мокротиння, аспірат, мазок і тому подібне.

В одному з варіантів втілення, передбачене анти-WTA антитіло для застосування в способі

діагностики або виявлення. В іншому аспекті передбачений спосіб виявлення наявності WTA у біологічному зразку. У деяких варіантах втілення, спосіб включає приведення в контакт біологічного зразка з анти-WTA антитілом, як описано в даному документі, в умовах, що підходять для зв'язування анти-WTA антитіла з WTA, і виявлення того, чи утворюється

5 комплекс між анти-WTA антитілом і WTA у біологічному зразку. Такий спосіб може являти собою спосіб *in vitro* або *in vivo*. В одному з варіантів втілення, анти-MRSA антитіло використовують для вибору суб'єктів, яким підходить терапія анти-MRSA антитілом, наприклад, якщо MRSA є біомаркером для вибору пацієнтів.

В одному з варіантів втілення, наведених як приклад, анти-WTA антитіло використовують

10 для виявлення MRSA-позитивної інфекції в суб'єкта *in vivo*, наприклад, за допомогою візуалізації *in vivo*, наприклад, для цілей діагностики, прогнозування або здійснення лікування інфекції, визначення підходящого курсу терапії або моніторингу відповіді інфекції на терапію. Один із способів виявлення *in vivo*, відомих у даній області техніки, являє собою імунно-позитронну емісійну томографію (імунно-ПЕТ), як описано, наприклад, van Dongen et al., (2007)

15 The Oncologist 12:1379-1389 й Verel et al., (2003) J. Nucl. Med. 44:1271-1281. У таких варіантах втілення спосіб передбачений для виявлення Staph-позитивної інфекції в суб'єкта, де спосіб включає введення міченого анти-Staph антитіла суб'єкту, що має Staph-позитивну інфекцію, або в якого підозрюють Staph-позитивну інфекцію, і виявлення міченого анти-Staph антитіла в суб'єкта, при цьому виявлення міченого анти-Staph антитіла вказує на Staph-позитивну інфекцію

20 в цього пацієнта. У деяких таких варіантах втілення, мічене анти-Staph антитіло включає анти-Staph антитіло, кон'юговане з випромінювачем позитронів, таким як ^{68}Ga , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{86}Y , ^{76}Br , ^{89}Zr і ^{124}I . У конкретному варіанті втілення, випромінювачем позитронів є ^{89}Zr .

В інших варіантах втілення, спосіб діагностики або виявлення включає контакт першого анти-Staph антитіла, імобілізованого на субстраті, з біологічним зразком, що тестують на наявність Staph, вплив на субстрат другого анти-Staph антитіла та виявлення того, чи зв'язалося друге анти-Staph антитіло з комплексом, утвореним між першим анти-Staph антитілом і Staph у біологічному зразку. Субстрат може являти собою будь-яке підтримуюче середовище, наприклад, скло, метал, кераміку, полімерні кульки, пластинки, чипи й інші субстрати. У деяких варіантах втілення, біологічний зразок включає клітину або тканину

30 (наприклад, біопсійний матеріал, у тому числі ракову тканину або тканину з підозрою на колоректальний рак, рак ендометрію, рак підшлункової залози або рак яєчників). У деяких варіантах втілення, перше й друге анти-Staph антитіло являють собою будь-які антитіла, описані в даному документі. У таких варіантах втілення, друге анти-WTA антитіло може являти собою анти-WTA антитіла S4497, S4462, S6978, S4487 або антитіла, отримані з них, як описано

35 в даному документі.

Приклади розладів, які можуть бути діагностовані або виявлені відповідно до будь-якого з наведених вище варіантів втілення з використанням таких тестів як імуногістохімія (ІГХ) або гібридизація *in situ* (ISH), включають MRSA-позитивну інфекцію. У деяких варіантах втілення, Staph-позитивна інфекція являє собою інфекцію, при якій спостерігається експресія Staph

40 відповідно до виявлення мПНК Staph при ПЛР аналізі зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). У деяких варіантах втілення, ЗТ-ПЛР являє собою кількісну ЗТ-ПЛР (Francois P and Schrenzel J (2008). "Rapid Diagnosis and Typing of Staphylococcus aureus". *Staphylococcus: Molecular Genetics*. Caister Academic Press; Mackay IM, ed. (2007)) і ПЛР у реальному часі ("Real-Time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization. Caister Academic Press).

У деяких варіантах втілення, передбачені мічені антитіла проти тейхоєвих кислот клітинної стінки (WTA). Мітки включають, без обмеження, мітки та фрагменти, що виявляють прямо (такі як флуоресцентні, хромофорні, електронношільні, хемілюмінесцентні та радіоактивні мітки), а також фрагменти, такі як ферменти або ліганди, які виявляють побічно, наприклад, за допомогою ферментативної реакції або молекулярної взаємодії. Приклади міток включають,

50 але не обмежуються ними, радіоізотопи ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H і ^{131}I , флуорофори, такі як хелати рідкоземельних металів або флуоресцеїн і його похідні, родамін і його похідні, дансил, умбеліферон, люциферази, наприклад, люцифераза світлячків і бактеріальну люциферазу (US 4737456), люциферин, 2,3-дигідрофалазиндіон, пероксидазу хрону (HRP), лужну фосфатазу, β -галактозидазу, глюкоамілазу, лізоцим, оксидази цукрів, наприклад, глюкооксидазу, галактозооксидазу та глюкозо-6-фосфат дегідрогеназу, оксидази гетероциклів, такі як уриказа та ксантиноксидаза, зв'язані з ферментом, що використовує перекис водню для окислювання попередника барвника, таким як HRP, лактопероксидаза або мікропероксидаза, біотин/ авідин, спінові мітки, мітки бактеріофаги, стабільні вільні радикали і тому подібне. В іншому варіанті втілення мітка являє собою випромінювач позитронів. Випромінювачі позитронів включають

60 ^{68}Ga , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{86}Y , ^{76}Br , ^{89}Zr й ^{124}I , але не обмежуються ними. У конкретному варіанті втілення,

випромінювач позитронів являє собою ^{89}Zr .

Клінічно, симптоми інфекцій, викликаних MRSA, аналогічні тим, які викликані метицилін-стійким *Staphylococcus aureus* (MSSA), і включають абсцеси та флегмони. Часто абсцес супроводжується областями центрального некрозу. Фурункули являють собою звичайне явище, особливо у випадку спалаху MRSA. Ураження також можуть бути неправильно діагностовані як укуси павука через загальне почервоніння, що поширюється від некротичного центра. Додатково, інфекції можуть виявитись як імпетиго, фолікуліт, глибокосидячий абсцес, піоміозит, остеомієліт, некротизуючий фасцит, стафілококовий інфекційно-токсичний шок, пневмонія та сепсис. Серйозні системні інфекції більш поширені в осіб, що мають в анамнезі внутрішньовенне введення наркотиків, діабет або інші стани, що послабляють імунітет.

Стандартні підходи до лікування інфекцій MRSA включають консервативні, механічні види лікування, такі як (i) теплі ванночки та компреси, (ii) розріз і дренаж, і (iii) видалення чужорідного пристрою (наприклад, катетера), що викликає інфекцію. Для більш серйозних інфекцій, особливо тих, при яких спостерігається флегмона, прописують антибіотики (Abx). Для легких або помірних інфекцій, антибіотики включають триметоприм-сульфаметоксазол (TMP-SMX), кліндаміцин, доксициклін, міноциклін, тетрациклін, рифампіцин, ванкоміцин, лінезолід. Як правило, режим лікування включає 5-10 днів з періодичними перевірками й оцінками у процесі та після періоду лікування.

Додаткові види лікування включають деколонізацію, особливо в ситуації, коли у пацієнта спостерігаються повторювані інфекції, або коли пацієнт перебуває в місці, де виник спалах MRSA. Деколонізація являє собою процедуру, при якій видаляється флора, що населяє ніздрі пацієнта. Це здійснюється шляхом місцевого застосування 2% мазі мупіроцину, у великій кількості нанесеній в обидві ніздрі протягом 5-10 днів, і місцевого промивання 4% розчином хлоргексидин глюконату протягом 5 днів.

ВИРОБИ

В іншому аспекті даного винаходу передбачений виріб, що містить матеріали, які використовуються для лікування, запобігання та/або діагностики розладів, описаних вище. Виріб включає контейнер та етикетку або вкладиш в упакуванні, закріплені на контейнері або зв'язані з ним. Підходящі контейнери включають, наприклад, пляшки, флакони, шприци, мішки з розчинами для внутрішньовенного введення і тому подібне. Контейнери можуть бути виготовлені з різних матеріалів, таких як скло або пластик. Контейнер містить композицію, яка як така або в комбінації з іншою композицією є ефективною для лікування, запобігання та/або діагностики розладу, і може мати стерильний вхідний отвір (наприклад, контейнер може являти собою мішок з розчином для внутрішньовенного введення або флакон із пробкою, яку проколюють голкою для підшкірної ін'єкції). Щонайменше, один активний агент у композиції являє собою антитіло або імунокон'югат даного винаходу. На етикетці або вкладиші в упакуванні зазначено, що композиція використовується для лікування вибраного стану. Більш того, виріб може включати (а) перший контейнер з композицією, яка міститься в ньому, що включає антитіло або імунокон'югат даного винаходу; і (b) другий контейнер з композицією, яка міститься в ньому, що містить додатковий цитотоксичний або інший терапевтичний агент. Виріб у цьому варіанті втілення даного винаходу також може включати вкладиш в упакуванні, на якому зазначено, що композиції можуть бути використані для лікування конкретного стану. Альтернативно або додатково, виріб може також включати другий (або третій) контейнер, що містить фармацевтично прийнятний буфер, такий як бактеріостатична вода для ін'єкцій (BWF), фосфатно-сольовий буферний розчин, розчин Рінгера або розчин декстрази. Він може також включати інші матеріали, бажані з комерційної точки зору або для користувача, у тому числі інші буфери, розріджувачі, наповнювачі, голки та шприци.

ПРИКЛАДИ

Нижче наведені приклади способів і композицій даного винаходу. Зрозуміло, що з урахуванням загального опису, наведеного вище, можуть бути реалізовані різні інші варіанти втілення.

Приклад 1. MC-vc-PAB-pipBOR 51.

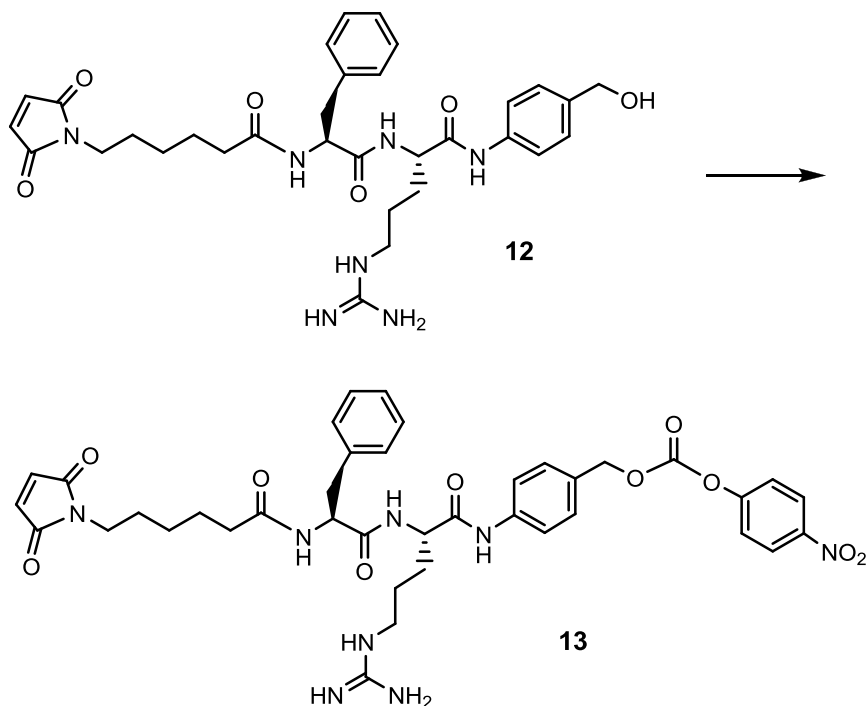
2-нітробензол-1,3-діол 1 гідрували газоподібним воднем над паладієвим каталізатором на вуглецевому носії в етанолі з утворенням 2-амінобензол-1,3-діолу 2, виділеного у вигляді хлористоводневої солі (Фіг. 23A і 23B). Захист однієї з груп 2, що здійснюється за допомогою трет-бутилдиметилсилілу хлориду та триетиламіну в дихлорметані/тетрагідрофурані, призводив до утворення 2-аміно-3-(трет-бутилдиметилсилілокси)фенолу 3. Рифаміцин S (ChemShuttle Inc., Fremont, CA, US 7342011; US 7271165; US 7547692) вводили в реакцію з 3 у реакції окисної конденсації з двоокисом марганцю або газоподібним киснем у толуолі при кімнатній температурі з утворенням TBS-заміщеного бензоксазинорифаміцину 4. Реакція 4 з піперидин-4-аміном і

двоокисом марганцю призводила до утворення піперидил бензоксазинорифаміцину (pipBOR) 5.

Піперидил бензоксазинорифаміцин (pipBOR) 5 (0,02 ммоль) і 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанамідо)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)бензил 4-нітрофеніл карбонат 6 (0,02 ммоль) змішували в DMF (0,4 мл) при кімнатній температурі (RT). До цієї суміші додавали 2,5 еквіваленти N,N'-діізопропілетиламіну. Розчин перемішували протягом від однієї до приблизно 12 годин і контролювали утворення продукту за допомогою LC/MS. По закінченні реакції розчин розбавляли DMF, піддавали ВЕРХ й очищали в кислих умовах з одержанням MC-vc-PAB-pipBOR 51. M/Z = 1498,9. Вихід 40%.

Приклад 2. MC-fk-PAB-pipBOR 52.

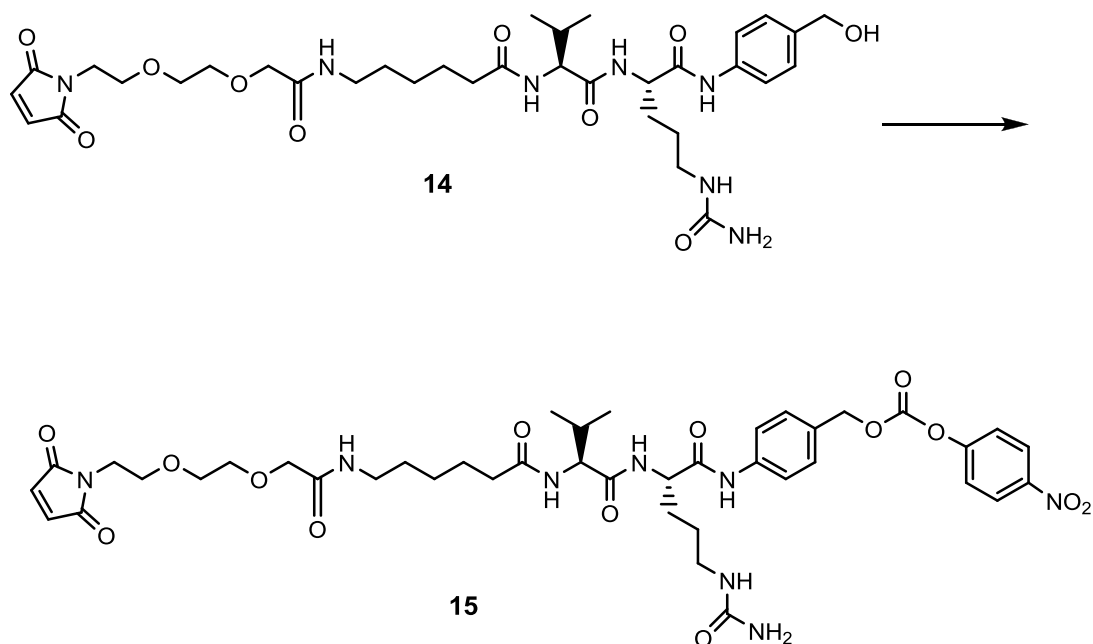
Після закінчення процедури, описаної у Прикладі 1, 6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)-N-((S)-1-((S)-5-гуанідино-1-(4-(гідроксиметил)феніламіно)-1-оксопентан-2-іламіно)-1-оксо-3-фенілпропан-2-іл)гексанамід 12 перетворювали в 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанамідо)-3-фенілпропанамідо)-5-гуанідинопентанамідо)бензил 4-нітрофеніл карбонат 13.



Піперидил бензоксазинорифаміцин (pipBOR) 5 (0,02 ммоль) і 13 (0,02 ммоль) змішували в DMF (0,4 мл) при кімнатній температурі (RT). До цієї суміші додавали 2,5 еквіваленти N,N'-діізопропілетиламіну. Розчин перемішували протягом від однієї до приблизно 12 годин і контролювали утворення продукту за допомогою LC/MS. Після закінчення реакції розчин розбавляли DMF, піддавали ВЕРХ й очищали в кислих умовах з одержанням MC-fk-PAB-pipBOR 52. M/Z = 1545,8. Вихід 32%.

Приклад 3. MP-vc-PAB-pipBOR 53.

Після закінчення процедури, описаної у Прикладі 1, 6-(2-(2-(2-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)етоксі)етоксі)ацетамідо)-N-((S)-1-((S)-1-(4-(гідроксиметил)феніламіно)-1-оксо-5-уреїдопентан-2-іламіно)-3-метил-1-оксобутан-2-іл)гексанамід 14 перетворювали в 4-((17S,20S)-1-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)-17-ізопропіл-8,15,18-триоксо-20-(3-уреїдопропіл)-3,6-діокса-9,16,19-триазагенойкозанамідо)бензил 4-нітрофеніл карбонат 15.



Піперидил бензоксазинорифаміцин (pipBOR) 5 (0,02 ммоль) і 15 (0,02 ммоль) змішували в DMF (0,4 мл) при кімнатній температурі (RT). До цієї суміші додавали 2,5 еквіваленти N,N'-діізопропілетиламіну. Розчин перемішували протягом від однієї до приблизно 12 годин і контролювали утворення продукту за допомогою LC/MS. Після закінчення реакції розчин розбавляли DMF, піддавали ВЕРХ й очищали в кислих умовах з одержанням MP-vc-PAB-pipBOR 53. M/Z = 1644,8. Вихід 57%.

Приклад 4. MC-vc-PAB-диметилpipBOR 54.

Реакція N,N-диметилпіперидин-4-аміну з TBS-заміщеним бензоксазинорифаміцином 4 давала диметилпіперидил бензоксазинорифаміцин (диметил pipBOR) 7 (Фіг. 24).

Альтернативно, (5-фтор-2-нітро-1,3-фенілен)біс(окси)біс(метилен)дибензол 9 гідрували газоподібним воднем над паладієвим каталізатором на вуглецевому носії в тетрагідрофурани/метанолі для видалення бензильних груп з утворенням 2-аміно-5-фторбензол-1,3-діолу 10. Комерційно доступний рифаміцин S або натрієва сіль рифаміцину SV (ChemShuttle Inc., Fremont, CA) реагували з 2-аміно-5-фторбензол-1,3-діолом 10 у реакції окисної конденсації на повітрі або у фероціаніді калію в етилацетаті при 60 °C з утворенням фторбензоксазинорифаміцину 11. Заміна фтору на N,N-диметилпіперидин-4-амін призводила до утворення диметил pipBOR 7 (Фіг. 25A і 25B).

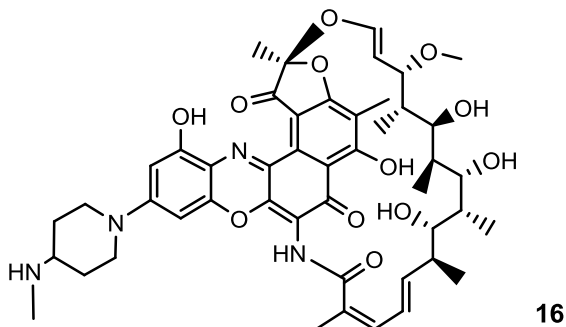
6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)-N-((S)-1-((S)-1-(4-(гідроксиметил) феніламіно)-1-оксо-5-уреїдопентан-2-іламіно)-3-метил-1-оксобутан-2-іл)гексанамід 8, отриманий відповідно до методик, описаних у WO 2012113847; US 7659241; US 7498298; US 20090111756; US 20090018086; US 6214345; Dubowchik et al (2002) Bioconjugate Chem. 13(4):855-869 (1,009 г, 1,762 ммоль, 1,000, 1009 мг) змішували з N,N-диметилформамідом (6 мл, 77 ммоль, 44, 5700 мг). До цієї суміші додавали розчин тіонілхлориду (1,1 еквіваленту, 1,938 ммоль, 1,100, 231 мг) у дихлорметані (DCM) (1 мл, 15,44 ммоль, 8,765, 1325 мг) по краплям (1/2 додавали протягом 1 години, розчин перемішували протягом однієї години при кімнатній температурі (RT) і половину, що залишилася, далі додавали протягом однієї години). У розчину зберігався жовтий колір. Далі по краплям обережно додавали 0,6 еквіваленту тіонілхлориду у вигляді розчину в 0,5 мл DCM. Колір реакційної суміші залишався жовтим, і її перемішували в закритому стані протягом ночі при RT. Утворення продукту реакції бензилхлориду 9 контролювали за допомогою LC/MS (до виходу 88%). Далі по краплям обережно додавали 0,22 еквіваленту тіонілхлориду в 0,3 мл DCM. Коли вихід бензилхлориду 9 досягав 92%, реакційну суміш барботували N₂. Речовину концентрували з 0,3 М до 0,6 М. Продукт N-((S)-1-((S)-1-(4-(хлорметил)феніламіно)-1-оксо-5-уреїдопентан-2-іламіно)-3-метил-1-оксобутан-2-іл)-6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанамід 9 зберігали в холодильнику у вигляді 0,6 М розчину та використовували в такому вигляді. M/Z 591,3, вихід 92%.

У посуді N-((S)-1-((S)-1-(4-(хлорметил)феніламіно)-1-оксо-5-уреїдопентан-2-іламіно)-3-метил-1-оксобутан-2-іл)-6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанамід 9 (0,9 ммоль) охолоджували до 0 °C і додавали диметилпіперидил бензоксазинорифаміцин (диметил pipBOR)

7 (0,75 г, 0,81 ммоль, 0,46, 750 мг). Суміш розбавляли 1,5 мл DMF для одержання концентрації 0,3 М. Суміш перемішували на повітрі протягом 30 хвилин. Додавали N,N-діізопропілетиламін (3,5 ммоль, 3,5 ммоль, 2,0, 460 мг) і реакційну суміш перемішували протягом ночі у відкритому для доступу повітря стані. Протягом 4 днів до реакційної суміші при постійному перемішуванні з доступом повітря 4 рази додавали 0,2 еквіваленти основи N,N-діізопропілетиламін до припинення розвитку реакції. Реакційну суміш розбавляли DMF й очищали за допомогою ВЕРХ (20-60% ACN/FA·H₂O) декількома порціями з одержанням MC-vc-PAB-диметилріпBOR 54. M/Z=1482,8, вихід: 32%.

Приклад 5. MC-vc-PAB-монометилріп, деацетилBOR 55.

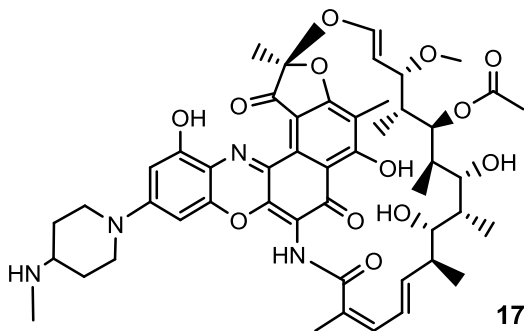
Після закінчення процедури, описаної у Прикладі 1, N-метилпіперидин-4-амін і TBS-заміщений деацетил, бензоксазинорифаміцин вводили в реакцію з двоокисом марганцю з утворенням монометилпіперидил бензоксазинорифаміцину (ріпBOR) 16.



4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанамідо)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)бензил 4-нітрофеніл карбонат 6 і 16 реагували з утворенням MC-vc-PAB-монометилріпBOR 55 з виходом 26% (M/Z = 1456,5).

Приклад 6. MC-vc-PAB-монометилріпBOR 56.

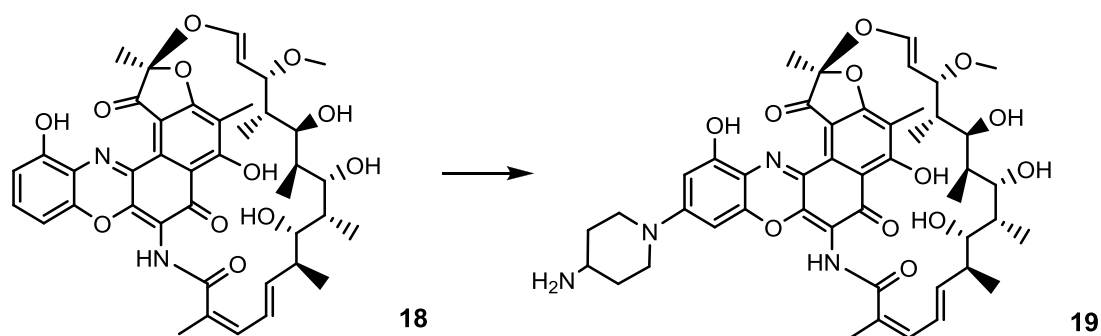
Після закінчення процедури, описаної у Прикладі 1, N-метилпіперидин-4-амін і TBS-заміщений бензоксазинорифаміцин 4 вводили в реакцію з двоокисом марганцю з утворенням монометилпіперидил бензоксазинорифаміцину (ріпBOR) 17.



4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанамідо)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)бензил 4-нітрофеніл карбонат 6 і 17 реагували з утворенням MC-vc-PAB-монометилріпBOR 56 з виходом 25% (M/Z = 1471,0).

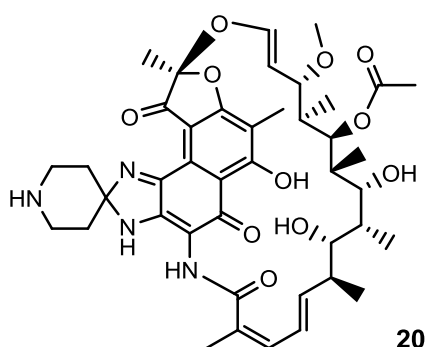
Приклад 7. MC-vc-PAB-ріп, деацетилBOR 57.

Після закінчення процедури, описаної у Прикладі 1, піперидин-4-амін і TBS-заміщений деацетилбензоксазинорифаміцин 18 вводили в реакцію з двоокисом марганцю з утворенням піперидил, десацетилбензоксазинорифаміцину (ріп деацетил BOR) 19.



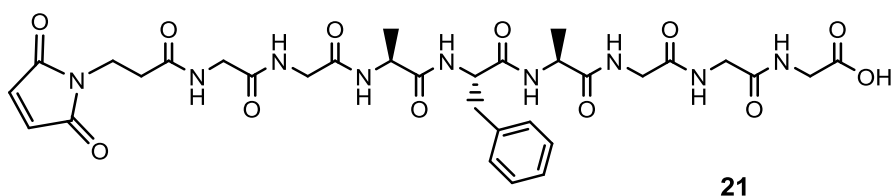
Піперидил, десацетилбензоксазинорифаміцин 19 (0,02 ммоль) і 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанамідо)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)бензил 4-нітрофеніл карбонат 6 (0,02 ммоль) реагували з утворенням MC-vc-PAB-pip, десацетилBOR 57. M/Z = 1456,6. Вихід 13%.

Приклад 8. MC-vc-PAB-рифабутин 58.



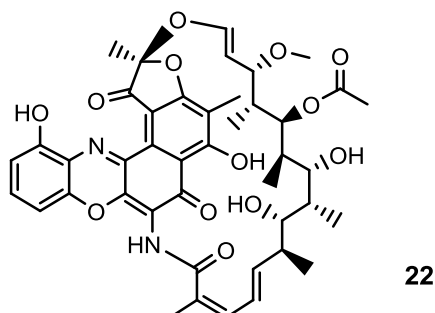
Після закінчення процедури, описаної у Прикладі 1, дез-ізобутил рифабутин 20 (0,02 ммоль) і 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанамідо)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)бензил 4-нітрофеніл карбонат 6 (0,02 ммоль) реагували з утворенням MC-vc-PAB-рифабутину 58. M/Z=1389,6. Вихід 21%.

Приклад 9. MC-GGAFAGGG-pipBOR («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 126) 59.



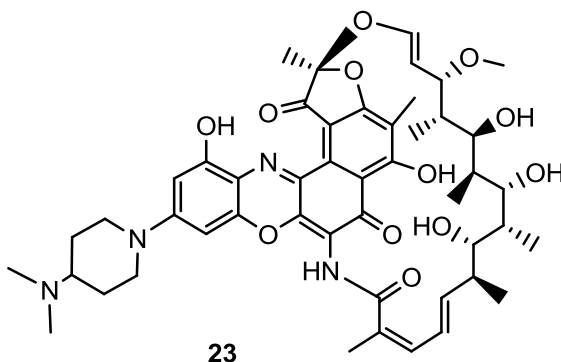
Після закінчення процедури, описаної у Прикладі 1, малеїмід пептид 21 кон'югували з піперидил бензоксазинорифаміцином (pipBOR) 5 у стандартних для формування амідного зв'язку умовах з утворенням MC-GGAFAGGG-pipBOR («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 126) 59. M/Z=1626,0. Вихід 13%.

Приклад 10. MC-vc-PAB-rif 60.



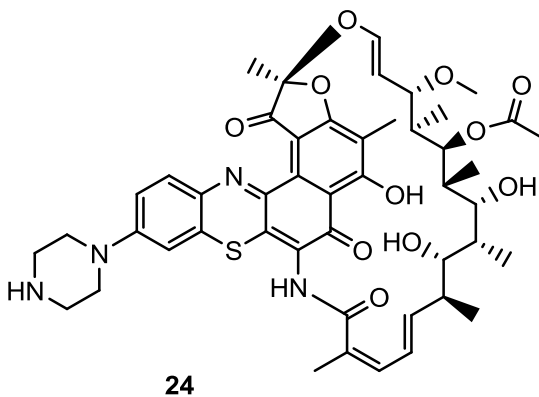
У невеликому флаконі 0,05 мл 0,6М розчину N-((S)-1-((S)-1-(4-(хлорметил) феніламіно)-1-оксо-5-уреїдопентан-2-іламіно)-3-метил-1-оксобутан-2-іл)-6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанаміду 9, отриманого відповідно до процедури, описаної у Прикладі 4, охолоджували до 0 °С і додавали 1 еквівалент бензоксазинорифаміцину 22, після чого суміш перемішували протягом 5 хвилин. До цього розчину при 0 °С додавали K₂CO₃ (15 еквівалентів) і стінки флакона промивали 0,05 мл DMF. Реакційну суміш перемішували у відкритому для доступу повітря стані при кімнатній температурі протягом 1-4 годин. Коли 9 повністю вступало в реакцію, тверді речовини відфільтровували, і зібраний фільтрат розбавляли DMF. Після очищення за допомогою ВЕРХ одержували MC-vc-PAB-rif 60 з виходом 11% (M/Z = 1356,9).

Приклад 11. MC-vc-PAB-диметилрір, деацетилBOR 61.



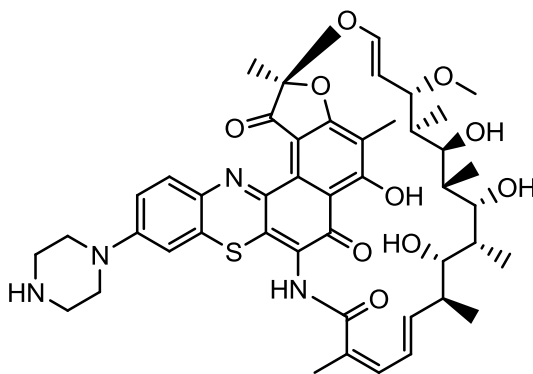
Після закінчення процедури, описаної у Прикладі 4, N-((S)-1-((S)-1-(4-(хлорметил)феніламіно)-1-оксо-5-уреїдопентан-2-іламіно)-3-метил-1-оксобутан-2-іл)-6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанамід 9 вводили в реакцію з диметилпіперидил, деацетилбензоксазинорифаміцином (диметил, деацетил рірBOR) 23 з утворенням MC-vc-PAB-диметилрір, деацетилBOR 61. M/Z = 1440,66.

Приклад 12. MC-vc-PAB-піперазBTR 62.



Після закінчення процедури, описаної у Прикладі 1, 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанамідо)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)бензил 4-нітрофеніл карбонат 6 вводили в реакцію з піперазино бензтіазинорифаміцином (піперазBTR) 24 з утворенням MC-vc-PAB-піперазBTR 62. M/Z = 1483,7.

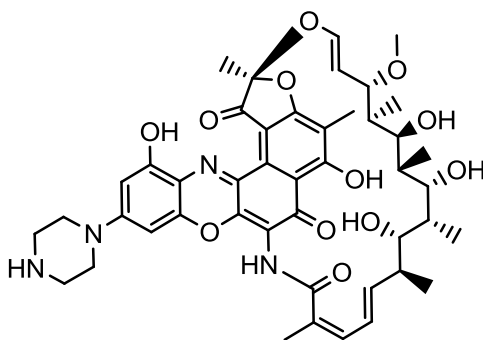
Приклад 13. MC-vc-PAB-піпераз, деацетилBTR 63.



25

Після закінчення процедури, описаної у Прикладі 1, 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1Н-пірол-1-іл)гексанамідо)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)бензил 4-нітрофеніл карбонат 6 вводили в реакцію з піперазино, деацетилбензтіазинорифаміцином (рірBTR) 25 з утворенням MC-vc-PAВ-піпераз, деацетилBTR 63. M/Z = 1441,6.

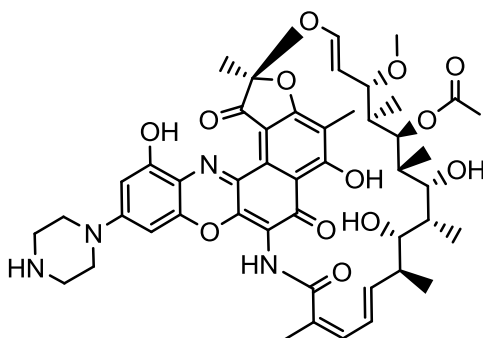
Приклад 14. MC-vc-PAВ-піпераз, деацетилBOR 64.



26

Після закінчення процедури, описаної у Прикладі 1, 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1Н-пірол-1-іл)гексанамідо)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)бензил 4-нітрофеніл карбонат 6 вводили в реакцію з піперазил, деацетилбензоксазинорифаміцином (деацетил рірBOR) 26 з утворенням MC-vc-PAВ-піпераз, деацетилBOR 64. M/Z = 1441,6.

Приклад 15. MC-vc-PAВ-піперазBOR 65.



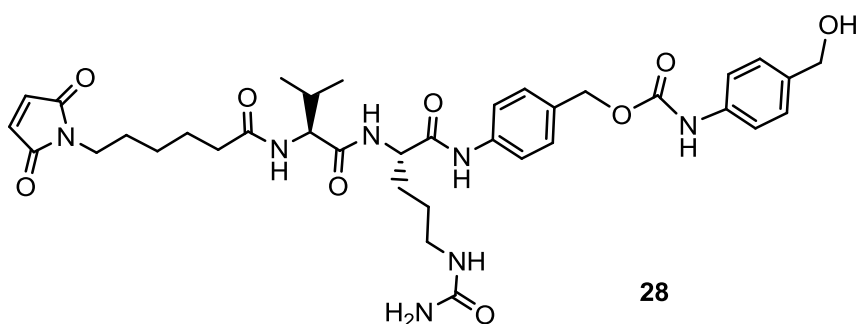
27

Після закінчення процедури, описаної у Прикладі 1, 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1Н-пірол-1-іл)гексанамідо)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)бензил 4-нітрофеніл карбонат 6 вводили в реакцію з піперазил бензоксазинорифаміцином (піперазилBOR) 27 з утворенням MC-vc-PAВ-піперазBOR 65. M/Z = 1482,7.

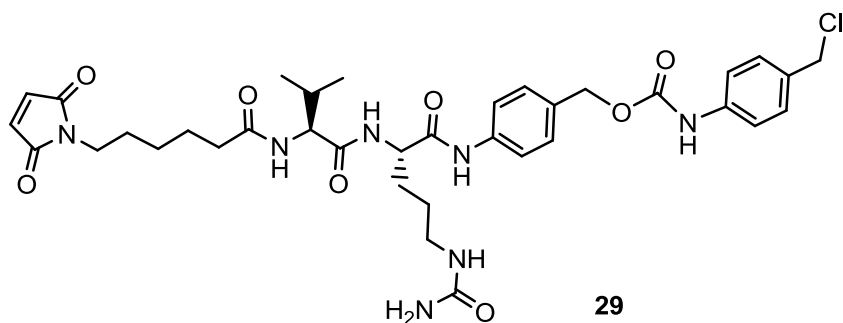
Приклад 16. MC-vc-бісPAВ-диметилрірBOR 66.

У флаконі 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1Н-пірол-1-іл)гексанамідо)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)бензил 4-нітрофеніл карбонат 6 (1,56 г, 2,11 ммоль,

100% за масою) змішували з DMF (55 еквівалентів, 116 ммоль, 55,0, 8,5 г) і перемішували при RT. До цієї мутної жовтої суміші додавали (4-амінофеніл)метанол (PAB, 1,1 еквівалента, 2,33 ммоль, 1,10, 286 мг) і 1-гідроксибензотриазол (0,37 еквівалента, 0,782 ммоль, 0,370, 106 мг) з наступним додаванням N,N'-діізопропілетиламіну (1 еквівалента, 2,11 ммоль, 1,00, 276 мг). Реакційну суміш перемішували протягом 2 годин, утворення продукту реакції контролювали за допомогою LC/MS. Додатково додавали 1 еквівалент N,N'-діізопропілетиламіну (основа Хуніга) і 100 мг (4-амінофеніл)метанолу. Реакційну суміш перемішували протягом ночі при RT у закритому стані. Щоб преципітувати продукт, по краплях додавали приблизно 0,5 л діетилового ефіру. Ефір декантували, тверду речовину розчиняли в DMF і прямо очищали за допомогою ВЕРХ декількома порціями з утворенням 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанамідо)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)бензил 4-(гідроксиметил)фенілкарбамату 28 (0,435 г) з загальним практичним виходом 28% (M/Z: 722,5), що має структуру:

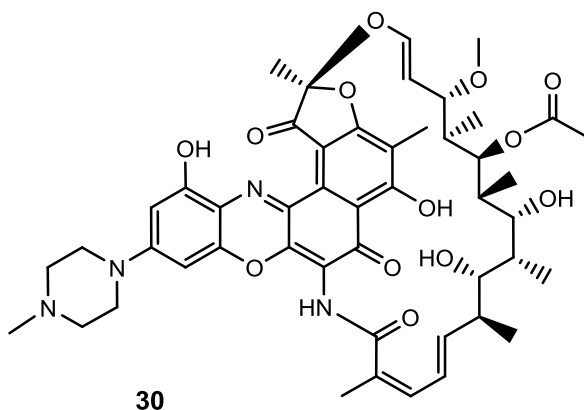


Після процедури, описаної у Прикладі 4, 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанамідо)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)бензил 4-(гідроксиметил)фенілкарбамат 28 вводили в реакцію з тіонілхлоридом з утворенням 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанамідо)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)бензил 4-(хлорметил)фенілкарбамату 29 з практичним виходом 47% (M/Z: 740,4), що має структуру:



Після процедури, описаної у Прикладі 4, 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанамідо)-3-метилбутанамідо)-5-уреїдопентанамідо)бензил 4-(хлорметил)фенілкарбамат 29 вводили в реакцію з диметилпіперидил бензоксазинорифамцином (диметил pіpBOR) 7 з утворенням MC-vc-бісPAB-диметилpіpBOR 66 з виходом 5% (M/Z: 1632,1).

Приклад 17. MC-vc-PAB-метилпіпераз BOR 67.



Після процедури, описаної у Прикладі 4, N-((S)-1-((S)-1-(4-(хлорметил)феніламіно)-1-оксо-5-уреїдопентан-2-іламіно)-3-метил-1-оксобутан-2-іл)-6-(2,5-діоксо-2,5-дигідро-1H-пірол-1-іл)гексанамід 9 вводили в реакцію з метилпіперазино бензоксазинорифаміцином (метил піперазBOR) 30 з утворенням MC-vc-PAB-метилпіпераз BOR 67. M/Z = 1454,68.

Приклад 18 . Внутрішньоклітинні MRSA захищені від антибіотиків.

Цей приклад доводить, що MRSA можуть виживати всередині клітин *in vivo*. При інфекції внутрішньоклітинні MRSA можуть виживати та захищені від лікування антибіотиками (такими як SOC ванкоміцин), що дозволяє інфекції передаватись від однієї клітини до іншої.

Визначення MIC для позаклітинних бактерій. MIC для позаклітинних бактерій визначали, роблячи серійні розведення антибіотиків в 2 рази в триптичному соєвому бульйоні. Розведення антибіотиків робили в чотирьох повторях в 96 ямкових планшетах для культивування. MRSA (NRS384 штаб USA300) брали з експоненціально зростаючої культури та розбавляли до 1×10^4 КУО/мл. Бактерії культивували у присутності антибіотика протягом 18-24 годин з перемішуванням при 37 °C, і ріст бактерій визначали за показниками оптичної щільності (OD) при 630 нм. MIC визначали як дозу антибіотика, що інгібує ріст бактерій на >90%.

Визначення MIC для внутрішньоклітинних бактерій. Внутрішньоклітинну MIC визначали на бактеріях, поглинутих мишачими перитонеальними макрофагами. Макрофаги вирощували в 24 ямкових планшетах для культивування до щільності 4×10^5 клітин/мл та інфікували MRSA (NRS384 штаб USA300) у співвідношенні 10-20 бактерій на макрофаг. Культури макрофагів підтримували в середовищі для росту з додаванням 50 мкг/мл гентаміцину для інгібування росту позаклітинних бактерій, і тестовані антибіотики додавали в середовище для росту через 1 день після інфекції. Виживання внутрішньоклітинних бактерій оцінювали через 24 години після додавання антибіотиків. Макрофаги лізували у буферному сольовому розчині Хенкса з додаванням 0,1% бичачого сироваткового альбуміну і 0,1% Triton-X, і робили серійні розведення лізату у фосфатно-сольовому буферному розчині, що містить 0,05% Tween-20. Кількість внутрішньоклітинних бактерій, що вижили, визначали, роблячи посіви на чашках із триптичним соєвим агаром з додаванням 5% дефібринованої овечої крові.

Виділення перитонеальних макрофагів. Перитонеальні макрофаги виділяли з черевної порожнини мишей Balb/c у віці 6-8 тижнів (Charles River Laboratories, Hollister, CA). Для підвищення виходу макрофагів мишам попередньо робили внутрішньочеревинну ін'єкцію 1 мл тіогліколевого середовища (Becton Dickinson). Тіогліколеве середовище готували в концентрації 4% у воді, стерилізували автоклавуванням і використовували через 20 днів – 6 місяців. Перитонеальні макрофаги збирали через 4 дні після введення тіогліколяту, промиваючи перитонеальну порожнину холодним фосфатно-сольовим розчином. Макрофаги вирощували на середовищі Ігла, модифікованому за способом Дульбекко, (DMEM) з додаванням 10% фетальної телячої сироватки і 10 mM HEPES, без антибіотиків, до щільності 4×10^5 клітин/ямку в 24-ямкових чашках для культивування. Макрофаги культивували протягом ночі, щоб вони прикріпилися до чашки. Цей аналіз також використовували для тестування внутрішньоклітинного знищення в нефагоцитарних типах клітин. Лінії клітин MG63 (CRL-1427) і A549 (CCL185) одержували з ATCC і підтримували в середовищі для культивування тканин RPMI 1640 з додаванням 10 mM Hepes і 10 % фетальної телячої сироватки (RPMI-10). Клітини HUVEC одержували від Lonza і підтримували у повному середовищі для культивування ендотеліальних клітин EGM (Lonza, Walkersville, MD).

Інфікування макрофагів опсонізованими MRSA. Штаб MRSA USA300 (NRS384) одержували з репозиторію NARSA (Chantilly, Virginia). У деяких експериментах використовували штаб *S. aureus* Newman (ATCC25904). У всіх експериментах бактерії культивували в триптичному

соевому бульйоні. Для оцінки внутрішньоклітинного знищення, опосередкованого AAC, USA300 брали з експоненціально зростаючої культури та промивали в HB (збалансований сольовий розчин Хенкса з додаванням 10 мМ HEPES і 0,1% бичачого сироваткового альбуміну). AAC або антитіла розбавляли в HB та інкубували з бактеріями протягом 1 години, щоб відбулося зв'язування антитіл з бактеріями (опсонізація), і опсонізовані бактерії використовували для інфікування макрофагів при співвідношенні 10-20 бактерій на макрофаг (4×10^6 бактерій в 250 мкл HB на ямку). Безпосередньо перед інфікуванням макрофаги попередньо промивали безсироватковою середовищем DMEM та інфікували, проводячи інкубацію при 37 °C у зволожуючому інкубаторі для культивування тканин з 5% CO₂, щоб пройшов фагоцитоз бактерій. Через 2 години суміш для інфікування видаляли та заміняли нормальним середовищем для росту (DMEM з додаванням 10% фетальної телячої сироватки, 10 мМ HEPES), і додавали гентаміцин у концентрації 50 мкг/мл для запобігання росту позаклітинних бактерій. Наприкінці періоду інкубації макрофаги промивали безсироватковою середовищем і клітини лізували в HB з додаванням 0,1% Triton-X (лізис макрофагів без ушкодження внутрішньоклітинних бактерій). У деяких експериментах життєздатність макрофагів оцінювали наприкінці періоду культивування, детектуючи вивільнення цитоплазматичної лактатдегідрогенази (LDH) у супернатант клітинної культури з використанням набору LDH Cytotoxicity Detection Kit (Product 11644793001, Roche Diagnostics Corp, Indianapolis, IN). Супернатанти збирали й аналізували відразу відповідно до інструкцій виробників. Серійні розведення лізату робили у фосфатно-сольовому буферному розчині з додаванням 0,05% Tween-20 (для руйнування агрегатів бактерій), і загальну кількість бактерій, що вижили, визначали, роблячи посіви на триптичний соєвий агар з 5% дефібринованою овечою кров'ю.

Отримання інфікованих MRSA перитонеальних клітин. 6-8 тижневих самок мишей A/J (JAX™ Mice, Jackson Laboratories) інфікували 1×10^8 КУО штаму USA300 NRS384 шляхом перитонеальної ін'єкції. Перитонеальні змиви збирали через 1 день після інфекції та інфіковані перитонеальні клітини обробляли 50 мкг/мл лізостафіну, розведеного у буфері Hepes з додаванням 0,1% BCA (буфер HB), протягом 30 хвилин при 37 °C. Перитонеальні клітини далі промивали 2х крижаним буфером HB. Перитонеальні клітини розбавляли до 1×10^6 клітин/мл у середовищі для культивування тканин RPMI 1640 з додаванням 10 мМ Hepes, 10 % фетальної телячої сироватки та 5 мкг/мл ванкоміцину. Вільні MRSA з первинної інфекції зберігали протягом ночі при 4 °C у фосфатно-сольовому буферному розчині як контроль для позаклітинних бактерій, які не піддавалися знищенню нейтрофілами.

Перенесення інфекції з перитонеальних клітин в остеобласти. Лінію клітин остеобластів MG63 одержували з ATCC (CRL-1427) і підтримували в середовищі для культивування тканин RPMI 1640 з додаванням 10 мМ Hepes і 10 % фетальної телячої сироватки (RPMI-10). Остеобласти вирощували в 24-ямкових планшетах для культивування та культивували до одержання безперервного шару клітин. У день експерименту остеобласти промивали один раз RPMI (без добавок). MRSA або інфіковані перитонеальні клітини розбавляли у повній RPMI-10, і безпосередньо перед інфікуванням до них додавали ванкоміцин до 5 мкг/мл. Перитонеальні клітини додавали до остеобластів у концентрації 1×10^6 перитонеальних клітин/мл. Зразок клітин лізували 0,1% Triton-x для визначення фактичної концентрації живих внутрішньоклітинних бактерій під час інфекції. Фактичний титр для всіх інфекцій визначали, роблячи посіви серійних розведень бактерій на триптичний соєвий агар з 5% дефібринованою овечою кров'ю.

Остеобласти MG63 вирощували в 4-ямкових скляних слайдах-камерах і культивували в середовищі для культивування тканин RPMI 1640 з додаванням 10 мМ Hepes і 10 % фетальної телячої сироватки (RPMI-10) до одержання безперервного шару клітин. У день інфекції ямки промивали безсироватковою середовищем та інфікували суспензією інфікованих перитонеальних клітин або штамом USA300 MRSA, розведеними у повній RPMI-10 з додаванням 5 мкг/мл ванкоміцину. Через день після інфекції клітини промивали фосфатно-сольовим буфером (PBS) і фіксували протягом 30 хвилин при кімнатній температурі у PBS з 2% параформальдегідом. Клітини 3х промивали PBS і пермеабілізували у PBS з 0,1% сапоніном протягом 30 хвилин при кімнатній температурі.

Імунофлуоресценція. MRSA ідентифікували фарбуванням за допомогою 20 мкг/мл кролячого анти-Staph 20920 (abcam, Cambridge, MA) з наступним фарбуванням антитілами проти антитіл кролика, міченими родаміном (Jackson ImmunoResearch, 711-026-152). Клітинні мембрани перитонеальних клітин офарблювали комплексом бета субодиниця холеротоксину-біотин (Invitrogen, Carlsbad, CA) з наступним фарбуванням стрептавідином Cy5 (BD Biosciences San Jose, CA). Зв'язування холеротоксину з перитонеальними клітинами підтверджували спільним фарбуванням анти-CD11b Alexa 488 клон M1/70 (BD biosciences). Предметні стекла покривали гістологічним середовищем Prolong Gold з DAPI (Invitrogen, Carlsbad CA). Предметні

стекла візуалізували з використанням конфокального мікроскопа Leica SPE. Зображення одержували у вигляді серій зрізів за віссю Z і поєднували для одержання максимально об'ємних зображень.

Виживання *S. aureus* всередині клітин ссавців забезпечує життєздатну нішу, що дозволяє розвинути персистуючій інфекції при антибіотикотерапії. *S. aureus* можуть інфікувати деякі типи клітин ссавців і виживати всередині них, включаючи такі клітини як нейтрофіли, макрофаги, остеобласти й епітеліальні клітини (Garzoni, C. and W. L. Kelley (2009) *Trends Microbiol* 17(2): 59-65). Для того, щоб прямо протестувати, чи захищені внутрішньоклітинні MRSA від дії антибіотиків, автори порівнювали здатність ряду клінічно схвалених антибіотиків знищувати позаклітинні MRSA, які культивуються в стандартному середовищі для росту бактерій, з їхньою здатністю знищувати внутрішньоклітинні MRSA, що перебувають всередині мишачих макрофагів (Таблиця 1). Для цього аналізу вибрали мишачі перитонеальні макрофаги, оскільки ці клітини являють собою генетично нормальні первинні клітини, що є природним компонентом вродженої імунної відповіді на *S. aureus*. Аналіз підтвердив, що ці клітини легко інфікуються та культивуються *in vitro*. MRSA можуть виживати всередині клітин до шести днів після інфекції макрофагів (Kubica, M., K. Guzik, et al. (2008) *PLoS One* 3(1): e1409). Для тестування внутрішньоклітинної дії антибіотиків макрофаги інфікували MRSA та культивували у присутності гентаміцину, антибіотика, про який відомо, що він неактивний у фаголізосомах через низький рівень клітинного захоплення цього антибіотика (Vaudaux, P. and F. A. Waldvogel (1979) *Antimicrob Agents Chemother* 16(6): 743-749). Тестовані антибіотики додавали до культурального середовища (на додаток до гентаміцину) через один день після інфекції в діапазоні доз, вибраних таким чином, щоб включати клінічно досяжні рівні в сироватці крові (показані у вигляді Стах у сироватці крові в Таблиці 1). Цей аналіз показав, що хоча позаклітинні MRSA дуже чутливі інгібуванню росту низькими дозами ванкоміцину, даптоміцину, лінезоліду або рифампіцину в рідкій культурі, всі чотири види антибіотиків не знищували той же самий штам внутрішньоклітинних MRSA, що перебувають всередині макрофагів. Примітно, що, навіть використовуючи рифампіцин, що вважається одним із кращих антибіотиків для лікування внутрішньоклітинних інфекцій, таких як туберкульоз, вдалося досягти мінімального знищення внутрішньоклітинних MRSA за увесь час експерименту та з усіма режимами дозування.

Таблиця 1

Мінімальні інгібуючі концентрації (MIC) для деяких антибіотиків

Антибіотики (Abx)	Позаклітинні MRSA MIC (мкг/мл)	Внутрішньоклітинні MRSA MIC (мкг/мл)	Стах у сироватці крові (мкг/мл)
Ванкоміцин	1	>100	10-40
Даптоміцин	4	>100	80
Лінезолід	0,3	>20	10
Рифампіцин	0,004	>20	20

Наведені вище дані підтверджують, що внутрішньоклітинні бактерії захищені від антибіотиків у той час, коли вони перебувають всередині клітин. Проте, MRSA не вважаються дійсними внутрішньоклітинними патогенами, у тому розумінні, що вони не можуть інфікувати сусідні клітини прямо за рахунок переносу з клітини в клітину, і більшість інфікованих клітин будуть лізуватись, вивільняючи при цьому внутрішньоклітинні бактерії. Таким чином, зберігається можливість того, що внутрішньоклітинний пул після вивільнення неминуче буде піддаватися впливу позаклітинних антибіотиків, щонайменше, тимчасово, навіть якщо бактерії були негайно захоплені сусідніми клітинами. Поглинання вільних MRSA макрофагами триває від 15 до 90 хвилин (дані не показані), що припускає, що якщо бактерії змогли протистояти короткому впливу антибіотика, вони можуть залишатися захищеними у внутрішньоклітинній ніші, послідовно переміщаючись від однієї вмираючої клітини до нової клітини-хазяїна. Щоб визначити, чи досить короткого впливу антибіотиків, щоб знищити MRSA, автори тестували ванкоміцин, сучасний стандарт лікування MRSA інфекцій, і рифампін. MRSA брали з активно зростаючої культури та розбавляли до 1×10^6 бактерій/мл у нормальному середовищі для росту. Антибіотики додавали у двох дозах, що перебувають між значеннями $2 \times$ і $10 \times$ очікуваної мінімальної інгібуючої концентрації (MIC). Проби відбирали в різний час між 30 хвилинами і 5

години, і антибіотик видаляли центрифугуванням і розведенням. Загальну кількість бактерій, що вижили, у культурі визначали, роблячи посіви на чашки з агаром.

На Фіг. 1 показане порівняння часу знищення MRSA, що активно діляться, для ванкоміцину (vanco) і рифампіцину (Rifa). MRSA культивували протягом 5 годин у середовищі TSB у присутності антибіотиків. У зазначені моменти часу відбирали проби культури та видаляли антибіотик центрифугуванням. Загальну кількість бактерій, що вижили, визначали в кожний момент часу, роблячи посіви. Ванкоміцин тестували в концентраціях 2 мкг/мл (білий квадрат) і 20 мкг/мл (чорний квадрат). Рифампін тестували в концентрації 0,02 мкг/мл (білий трикутник) і 0,2 мкг/мл (чорний трикутник). Ці дані (Фіг. 1) показали, що хоча обидва антибіотики ефективно інгібували ріст бактерій, і через 5 годин кількість життєздатних бактерій зменшилася в 100 разів, знищення бактерій відбувалося поступово протягом 5 годин спостережень, і 90% бактерій, що залишалися життєздатними протягом перших двох годин обробки антибіотиком, потенційно могли бути поглинені клітинами-хазяїнами.

Автори аналізували перенесення інфекції внутрішньоклітинних пулів MRSA у пермісивні внутрішньоклітинні ніші у присутності ванкоміцину. *S. aureus* може виживати всередині остеобластів, і внутрішньоклітинні пули *S. aureus* спостерігали у пацієнтів з остеомієлітом, станом, при якому хронічна інфекція *S. aureus*, як відомо, не піддається лікуванню антибіотиками (Thwaites and Gant, (2011) Nature Reviews Microbiology 9:215-222; Ellington et al., (2006) J. Orthopedic Research 24(1): 87-93; Bosse et al., (2005) J. Bone and Joint Surgery, 87(6): 1343-1347). Був розроблений аналіз *in vitro* з використанням лінії клітин остеобластів MG63, оскільки ця лінія клітин, як повідомлялося, може містити внутрішньоклітинні *S. aureus* (Garzoni and Kelly, (2008) Trends in Microbiology). Цей аналіз підтвердив, що MRSA можуть інфікувати клітини MG63, і життєздатні внутрішньоклітинні бактерії можуть бути виділені з інфікованих клітин MG63 протягом періоду часу до 6 днів *in vitro*. Для одержання пулу внутрішньоклітинних *S. aureus* перитонеальні клітини збирали з мишей, які були інфіковані шляхом внутрішньочеревинної ін'єкції MRSA (Фіг. 2).

На Фіг. 2 показане перенесення інфекції з інфікованих перитонеальних клітин в остеобласти у присутності ванкоміцину. Для одержання пулу внутрішньоклітинного *S. aureus* мишей A/J інфікували MRSA, і інфіковані перитонеальні клітини брали через 1 день після інфекції. Аналогічним чином отримані клітини, як повідомлялося, містять життєздатні внутрішньоклітинні бактерії, які можуть переносити інфекцію в моделі інфекції *in vivo* (Gresham et al J Immunol 2000; 164:3713-3722). Інфіковані перитонеальні клітини, складаються, в основному, з суміші нейтрофілів і макрофагів, і приблизно 10% клітин містять внутрішньоклітинні бактерії. Клітини обробляли лізостафіном для видалення позаклітинних бактерій і суспендували в середовищі для росту з додаванням 5 мкг/мл ванкоміцину. Зразок перитонеальних клітин, що використовують для інфекції, лізували для визначення точної дози життєздатних внутрішньоклітинних MRSA у момент інфікування, і різні дози вільних внутрішньоклітинних MRSA також розбавляли в середовищі з ванкоміцином для порівняння. Перитонеальні клітини (внутрішньоклітинні MRSA) або вільні бактерії (позаклітинні MRSA) далі додавали до моношару остеобластів MG63 і культивували протягом 4 годин (білі стовпчики) або 1 дня (чорні стовпчики). Загальну кількість внутрішньоклітинних бактерій, що вижили, у кожній ямці визначали, роблячи посіви лізатів на планшети з агаром. Внутрішньоклітинні MRSA були захищені від ванкоміцину на відміну від позаклітинних MRSA контролів. Ямки інфікували 3×10^4 внутрішньоклітинних бактерій, кількість яких досягла 8750 (приблизно 1 третина інфекційної дози) через 1 день після інфекції, тоді як позаклітинні бактерії ефективно знищувались, так що аналогічна доза вільних MRSA дала тільки 375 внутрішньоклітинних бактерій через 1 день після інфекції.

За допомогою імуофлуоресцентної мікроскопії також було продемонстроване перенесення інфекції з перитонеальних клітин в остеобласти MG63. Перитонеальні клітини збирали з мишей через 1 день після інфікування MRSA й обробляли лізостафіном для знищення будь-яких забруднюючих бактерій (внутрішньоклітинна інфекція). Вільні MRSA брали з активно зростаючої культури й промивали у PBS (позаклітинна інфекція). Загальну кількість життєздатних бактерій у зразках внутрішньоклітинної та позаклітинної інфекції підтверджували, роблячи посіви на чашки з агаром, і обидва зразки суспендували в середовищі з додаванням 5 мкг/мл ванкоміцину безпосередньо перед додаванням до безперервного шару остеобластів MG63, культивованих у слайдах-камерах. Через один день після інфекції клітини MG63 промивали для видалення позаклітинних бактерій, пермеабілізували й офарблювали анти-*S. aureus* антитілом для ідентифікації внутрішньоклітинних MRSA і холеротоксином, що переважно зв'язується з клітинними мембранами перитонеальних клітин. Всі клітинні ядра також офарблювали DAPI для підтвердження того, що моношар MG63 був інтактним. Слайд-камери досліджували за

допомогою конфокальної мікроскопії.

Ямки, інфіковані перитонеальними клітинами, містили безперервний моношар клітин MG63, і перитонеальні макрофаги були добре видні у верхній частині шару MG63. Багато макрофагів очевидно були інфіковані MRSA, які були видні у вигляді кластерів червоних бактерій на

одноколірному зображенні або у вигляді білих частинок на графічному накладеному зображенні. На додаток до інфікованих макрофагів були отримані чіткі приклади бактерій, асоційованих тільки з клітинами MG63. Інфіковані клітини MG63 також видні в ямках, інфікованих вільними MRSA. Інфекція вільними MRSA вимагає більше інокуляту для досягнення аналогічного рівня інфекції в клітинах MG63.

Наведені вище результати свідчать про те, що як вільні, так і внутрішньоклітинні MRSA можуть виживати та інфікувати клітини MG63 у присутності ванкоміцину. Бактерії з внутрішньоклітинної інфекції виживали значно краще після лікування ванкоміцином, ніж вільні бактерії в цих же умовах. Інфекція 3×10^4 КУО внутрішньоклітинних бактерій давала $8,7 \times 10^3$ КУО внутрішньоклітинних бактерій через 1 день після інфекції. Інфекція аналогічною дозою вільних бактерій давала тільки 375 внутрішньоклітинних бактерій через 1 день після інфекції, що свідчить про те, що внутрішньоклітинні бактерії можуть виживати до 20 разів краще, ніж вільні бактерії. Для всіх інфекційних доз вдавалося виділяти більше внутрішньоклітинних бактерій (в 1,5 - 6 разів) через 1 день після інфекції у порівнянні з 4 годинами після інфекції. Оскільки ванкоміцин після додавання до вільних MRSA повністю інгібує їхній ріст (Фіг. 1), ці дані припускають, що MRSA повинні відтворюватись шляхом внутрішньоклітинного розподілу в якийсь момент незважаючи на вплив ванкоміцину в культуральному середовищі. Хоча MRSA значно не діляться всередині мишачих макрофагів (неопубліковані спостереження авторів), існує важливе свідчення того, що *S. aureus* може уникати фаголізосом та відтворюватись шляхом клітинного розподілу в цитоплазмі нефагоцитарних клітин (Jarry, T. M., G. Memmi, et al. (2008) *Cell Microbiol* 10(9): 1801-1814). Взяті разом, наведені вище спостереження дають можливість припустити, що навіть при постійному впливі ванкоміцину вільні MRSA можуть інфікувати клітини, і внутрішньоклітинні MRSA можуть переходити з однієї клітини в іншу. Ці механізми виявляють потенційний механізм для підтримки та навіть поширення інфекції при здійсненні постійної антибіотикотерапії.

Приклад 19. Моделі інфекцій *in vivo*.

Модель перитоніту. 7-тижневих самок мишей A/J (Jackson Laboratories) інфікували шляхом перитонеальної ін'єкції 5×10^7 КУО USA300. Мишей умертвляли через 2 дні після інфекції та черевну порожнину промивали 5 мл холодного фосфатно-сольового буферного розчину (PBS). Нирки гомогенізували у 5 мл PBS, як описано нижче для моделі внутрішньовенної інфекції. Перитонеальні змиви центрифугували протягом 5 хвилин при 1000 об/хв при 4 °C у настільній центрифугі. Супернатант збирали як джерело позаклітинних бактерій, а осад клітин (дебрис), що містить перитонеальні клітини, збирали в якості внутрішньоклітинної фракції. Клітини обробляли 50 мкг/мл лізостафіну протягом 20 хвилин при 37 °C для знищення забруднюючих позаклітинних бактерій. Перитонеальні клітини промивали 3х у крижаному PBS для видалення лізостафіну до аналізу. Для підрахунку кількості внутрішньоклітинних КУО перитонеальні клітини лізували в НВ (збалансований сольовий розчин Хенкса з додаванням 10 мМ HEPES і 0,1% бичачого сироваткового альбуміну) з 0,1% Triton-X, і серійні розведення лізату робили у PBS з 0,05% Tween-20.

Модель внутрішньовенної інфекції. 7 тижневих самок мишей використовували для всіх експериментів *in vivo* та інфікування здійснювали шляхом внутрішньовенної ін'єкції у хвостову вену. Мишей A/J (Jackson Lab) інфікували дозою 2×10^6 КУО. Мишей Balb/c (Charles River Laboratories, Hollister, CA) інфікували дозою 2×10^7 КУО. Для вивчення ролі конкуруючих людських IgG (модель SCID IVIG) мишам CB17.SCID (Charles River Laboratories, Hollister, CA) вводили імуноглобулін GammaGard S/D IGIV (ASD Healthcare, Brooks KY), використовуючи режим дозування, оптимізований для досягнення постійного рівня людських IgG у сироватці крові >10 мг/мл. IGIV вводили у початковій внутрішньовенній дозі 30 мг на мишу з наступним введенням другої дози 15 мг/мишу шляхом внутрішньочеревинної ін'єкції через 6 годин, і далі IGIV вводили щодня в дозі 15 мг на мишу шляхом внутрішньочеревинної ін'єкції протягом 3 послідовних днів. Через 4 години після першої дози IGIV мишей інфікували 2×10^7 КУО MRSA, розведеними у фосфатно-сольовому буфері, шляхом внутрішньовенної ін'єкції. Мишам, що одержували ванкоміцин, два рази на день робили внутрішньочеревинні ін'єкції 100 мг/кг ванкоміцину, починаючи між 6 і 24 годинами після інфекції, і далі протягом всього дослідження. Експериментальні терапевтичні агенти (AAC, анти-MRSA антитіла або вільний антибіотик диметил-ріпBOR) розбавляли у фосфатно-сольовому буферному розчині та вводили шляхом однократної внутрішньовенної ін'єкції через 30 хвилин – 24 години після інфекції. Всіх мишей

умертвляли на 4 день після інфекції та нирки збирали у 5 мл фосфатно-сольовий буфер. Зразки тканини гомогенізували з використанням GentleMACS Dissociator™ (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Загальну кількість виділених бактерій на мишу (2 нирки) визначали, роблячи посіви серійних розведень гомогенатів тканини у PBS з 0,05% Tween на триптичному соєвому агарі з 5% дефібринованою овечою кров'ю.

Приклад 20. Аналіз вивільнення з катепсином/ каспазою.

Для кількісної оцінки кількості активного антибіотика, що вивільняється з AAC після обробки катепсином В, AAC розбавляли до 200 мкг/мл у буфері для катепсину (20 мМ ацетат натрію, 1 мМ ЕДТА, 5 мМ L-цистеїн). Див. сторінку 863 в Dubowchik et al (2002) Bioconj. Chem. 13:855-869, де документ включений сюди за допомогою посилання для цілей опису цього аналізу. Катепсин В (з бичачої селезінки, SIGMA C7800) додавали в концентрації 10 мкг/мл і зразки інкубували протягом 1 години при 37 °С. Як контроль AAC інкубували тільки у буфері. Реакцію зупиняли додаванням 10 об'ємів середовища для росту бактерій, триптичного соєвого бульйону з рН 7,4 (TSB). Для оцінки загального вивільнення активного антибіотика робили серійні розведення реакційної суміші в чотирьох повторях в TSB в 96-ямкових планшетах і додавали штам USA300 *S. aureus* у кожну ямку до кінцевої щільності 2×10^3 КУО/мл. Культури інкубували протягом ночі при 3 °С з перемішуванням, і ріст бактерій оцінювали, вимірюючи поглинання при 630 нм, використовуючи планшетний спектрофотометр.

Приклад 21. Одержання анти-WTA антитіл.

Одержання, скринінг і вибір антитіл.

Скорочення: MRSA (метицилін-стійкий *S. aureus*); MSSA (метицилін-чутливий *S. aureus*); VISA (стійкий до інтермедіату ванкоміцину *S. aureus*); LTA (ліпотейхоєва кислота); TSB (триптичний соєвий бульйон); CWP (препарат клітинної стінки).

Людські антитіла IgG клонували з периферичних В клітин, отриманих з пацієнтів після інфекції *S. aureus*, використовуючи технологію Symplex™ (Symphogen, Lyngby, Denmark), при якій зберігається пара між відповідними важкими та легкими ланцюгами антитіла, як описано в US 8,283,294: "Method for cloning cognate antibodies"; Meijer PJ et al. Journal of Molecular Biology 358:764-772 (2006); і Lantto J et al. J Virol. 85(4):1820-33 (Feb 2011). Плазмобласти та клітини пам'яті використовували як генетичне джерело репертуару рекомбінантних повнорозмірних IgG. Індивідуальні клони антитіл експресували шляхом трансфекції клітин ссавців, як описано в Meijer PJ, et al. Methods in Molecular Biology 525: 261-277, xiv. (2009). Супернатанти, що містять повнорозмірні антитіла IgG1, збирали через сім днів і використовували для скринінгу на зв'язування з антигеном за допомогою непрямого ELISA у первинному скринінгу. Одержували бібліотеку моноклональних антитіл, які при проведенні ELISA демонстрували позитивне зв'язування з препаратами клітинних стінок із штамів USA300 або Wood46 *S. aureus*. Антитіла далі продукували із застосуванням 200-мл часових трансфекцій та очищали за допомогою хроматографії на білку А (MabSelect SuRe, GE Life Sciences, Piscataway, NJ) для подальшого тестування. Для великомасштабного одержання антитіл антитіла продукували в клітинах CHO. Клітини CHO трансфікували векторами, кодуєчими VL і VH, і IgG очищали з культурального середовища за допомогою афінної хроматографії на білку А.

Таблиця 7

Список антигенів, використаних для виділення антитіл.

Ag	Опис	Постачальник/ джерело	Покриття
WTA	Тейхоєва кислота клітинної стінки (WTA) з Staph A. Номер за каталогом R84500 (2 мг/флакон), номер партії 5E14909.	Meridian Life Sciences	2 мкг/мл
PGN	Пептидоглікан з <i>Staphylococcus aureus</i> ; номер за каталогом 77140, номер партії 1396845	Sigma	2 мкг/мл
CW #1	CW USA300, RPMI, не містить залізо. Стаціонарна фаза	Genentech, 100x	
CW #3	CW USA300, TSB. Стаціонарна фаза	Genentech, 500X	
CW #4	CW Wood46, TSB. Стаціонарна фаза	Genentech, 500X	

CW#1 і CW#3 завжди змішували при одержанні покриття для ELISA.

На Фіг. 6 підсумовані дані первинного скринінгу антитіл за допомогою ELISA. Всі антитіла (за

винятком 4569) були виділені при скринінгу з сумішшю препаратів клітинної стінки USA300 (препарат, який не містить залізо : TSB у співвідношенні 96:4). Всі моноклональні антитіла до GlcNAc бета (за винятком 6259), SDR і PGN (4479) демонстрували позитивне зв'язування з PGN і WTA при первинному скринінгу. Всі антитіла до GlcNAc альфа були виявлені тільки при скринінгу на зв'язування з сумішшю USA300 CW. 4569 (специфічний до LTA) був виявлений при скринінгу з Wood46 CWP.

Вибір анти-WTA моноклонального антитіла з бібліотеки з використанням проточної цитометрії *ex vivo*

Кожне моноклональне антитіло в цій бібліотеці оцінювали з погляду трьох критеріїв добору: (1) відносна інтенсивність зв'язування моноклонального антитіла з поверхнею MRSA як показник високої експресії відповідного розпізнаного антигена, що буде сприяти доставці антибіотика на високому рівні; (2) стабільність зв'язування моноклональних антитіл з MRSA, виділеними з великої розмаїтості інфікованих тканин, як показник стабільної експресії розпізнаного антигена на клітинній поверхні MRSA *in vivo* у ході інфекцій; і (3) здатність моноклональних антитіл зв'язуватись з панеллю клінічно значимих штамів *S. aureus* як показник збереження експресії розпізнаного антигена клітинної поверхні. З цією метою для тестування реактивності всіх цих попередньо вибраних культуральних супернатантів моноклональних антитіл до *S. aureus* з різних інфікованих тканин і з різних штамів *S. aureus* була використана проточна цитометрія.

Для всіх моноклональних антитіл у бібліотеці аналізували їхню здатність зв'язуватись з MRSA з інфікованих нирок, селезінки, печінки та легенів мишей, які були інфіковані MRSA USA300; і з серця або нирок кроликів, які були інфіковані USA300 COL у моделі ендокартиту на кролику. Здатність антитіла розпізнавати *S. aureus* з різних інфікованих тканин збільшує ймовірність терапевтичного антитіла бути активним відносно великої розмаїтості різних клінічних інфекцій *S. aureus*. Бактерії аналізували відразу після збору органів, тобто без субкультивування, для запобігання фенотипових змін, викликаних умовами культивування *in vitro*. Раніше ми спостерігали, що деякі антигени клітинної поверхні *S. aureus*, експресовані при культивуванні *in vitro*, перестають експресуватись в інфікованих тканинах. Антитіла, спрямовані проти таких антигенів, навряд чи будуть корисні для лікування інфекцій. У ході аналізу цієї бібліотеки моноклональних антитіл на різних інфікованих тканинах це спостереження підтвердилось для значної кількості антитіл, які демонструють значне зв'язування з бактеріями *S. aureus* з культури, і відсутність зв'язування з бактеріями з всіх тестованих тканин. Деякі антитіла зв'язувались з бактеріями з деяких, але не з всіх тестованих інфікованих тканин. Тому в даному винаході ми проводили пошук антитіл, які могли розпізнавати бактерії у всіх тестованих інфекційних умовах. Оцінювані параметри були наступними: (1) відносна інтенсивність флуоресценції як показник представленості антигена; (2) кількість органів, що офарблюються позитивно, як показник стабільності експресії антигена; і (3) здатність моноклональних антитіл зв'язуватись з панеллю клінічно значимих штамів *S. aureus* як показник збереження експресії розпізнаного антигена клітинної поверхні. Інтенсивність флуоресценції тестованих антитіл визначали щодо контрольного антитіла з тим же самим ізотипом, спрямованого проти неспорідненого антигена, наприклад, моноклонального антитіла IgG1 проти вірусу герпесу gD:5237 (посилання нижче). Моноклональні антитіла проти WTA-бета не тільки демонструють найбільшу представленість антигена, але також демонструють найбільш стабільне зв'язування з MRSA з всіх тестованих інфікованих тканин, зазначених вище.

Додатково, ми тестували здатність цих моноклональних антитіл зв'язуватись з наступними штамми *S. aureus*, які культивували *in vitro* в TSB: USA300 (MRSA), USA400 (MRSA), COL (MRSA), MRSA252 (MRSA), Wood46 (MSSA), Rosenbach (MSSA), Newman (MSSA) і Mu50 (VISA). Було виявлено, що анти-WTA бета моноклональні антитіла, але не анти-WTA альфа моноклональні антитіла реагують з усіма цими штамми. Аналіз зв'язування з різними штамми свідчить про те, що WTA бета більш консервативні, ніж WTA альфа й тому більше підходять для AAC.

Приклад 22. Характеристика антитіл, що мають специфічність проти тейхоевих кислот клітинної стінки *S. aureus*.

i) Підтвердження специфічності антитіл до WTA.

Препарати клітинної стінки (CWP) з штамів *S. aureus* дикого типу (WT) і мутантного штамів *S. aureus*, в якого відсутній WTA (Δ TagO; штам WTA-null), одержували інкубацією 40 мг осаду штамів *S. aureus* з 1 мл 10 mM Трис-HCl (pH 7,4) з додаванням 30% рафінози, 100 мкг/мл лізостафіну (Cell Sciences, Canton, MA) і коктейлю інгібіторів протеаз без ЕДТА (Roche, Pleasanton, CA) протягом 30 хв при 37 °C. Лізати центрифугували при 11600 x g протягом 5 хв і збирали супернатанти, що містять компоненти клітинної стінки. Для імуноблотингу білки

розділяли в 4-12% Трис-гліциновому гелі та переносили на нітроцелюлозну мембрану (Invitrogen, Carlsbad, CA), потім проводили блотинг із зазначеними тестованими антитілами проти WTA або з контрольними антитілами проти PGN і LTA.

Імуноблотинг показав, що антитіла проти WTA зв'язуються з препаратами WT клітинної стінки з *S. aureus* WT, але не з препаратами клітинної стінки з штаму ΔTagO, в якого відсутні WTA. Контрольні антитіла проти пептидоглікану (анти-PGN) і ліпотейхоєвої кислоти (анти-LTA) добре зв'язуються з обома препаратами клітинної стінки. Ці дані свідчать про специфічність тестованих антитіл проти WTA.

ii) Проточна цитометрія для визначення ступеня зв'язування моноклонального антитіла з поверхнею MRSA.

Експресію антигена клітинної поверхні на цілій бактерії з інфікованих тканин аналізували за допомогою проточної цитометрії, використовуючи наступний протокол. Для фарбування антитілами бактерій з інфікованих мишачих тканин 6-8 тижневим самкам мишей C57Bl/6 (Charles River, Wilmington, MA) внутрішньовенно вводили 10^8 КУО, що перебувають у логарифмічній фазі росту USA300 у PBS. Органи мишей збирали через два дні після інфекції. Інфекційний ендокардит у кроликів (IE) викликали, як описано раніше в Tattevin P. et al. Antimicrobial agents and chemotherapy 54: 610-613 (2010). Кроликам внутрішньовенно вводили 5×10^7 КУО MRSA штаму COL у стаціонарній фазі росту та вегетації на серці збирали через вісімнадцять днів. Обробку 30 мг/кг ванкоміцину здійснювали шляхом внутрішньовенного введення два рази на день через 18 годин після інфекції 7×10^7 КУО в стаціонарній фазі.

Для лізису мишачих і кролячих клітин тканини гомогенізували в спеціальних флаконах M tubes (Miltenyi, Auburn, CA), використовуючи клітинний дисоціатор gentleMACS (Miltenyi), з наступною інкубацією протягом 10 хв при RT у PBS, що містить 0,1% Triton-X100 (Thermo), 10 мкг/мл ДНКазу I (Roche) і коктейль інгібіторів протеаз Complete Mini (Roche). Суспензії пропускали через фільтр 40 мікронів (BD) і промивали HBSS без фенолового червоного з додаванням 0,1% БСА без IgG (Sigma) і 10 mM Hepes, pH 7,4 (буфер HB). Суспензії бактерій далі інкубували з 300 мкг/мл кролячих IgG (Sigma) у буфері HB протягом 1 години при кімнатній температурі (RT) для блокування неспецифічного зв'язування IgG. Бактерії офарблювали 2 мкг/мл первинних антитіл, включаючи моноклональне антитіло rF1 або контрольне антитіло IgG1 з тим же самим ізотипом проти вірусу герпесу gD:5237 (Nakamura GR et al., J Virol 67: 6179-6191 (1993)), і далі флуоресцентними вторинними антитілами проти людських IgG (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Щоб диференціювати бактерії від дебрису мишачих і кролячих органів, проводили подвійне фарбування, використовуючи 20 мкг/мл мишачого моноклонального антитіла 702 проти пептидоглікану *S. aureus* (Abcam, Cambridge, MA) і флуоресцентно-мічене вторинне антитіло проти IgG миші (Jackson ImmunoResearch). Бактерії промивали й аналізували, використовуючи FACSCalibur (BD). У процесі проточної цитометрії бактерії визначали як позитивно забарвлені моноклональним антитілом 702 на графіках із флуоресценцією у двох каналах.

iii) Вимірювання афінності зв'язування з *S. aureus* й антигенної щільності на MRSA.

У Таблиці 8 наведені результати аналізу рівноважного зв'язування антитіл до MRSA з штамом Newman-ΔSPA й антигенної щільності на бактерії.

Таблиця 8

Антитіло до MRSA	Специфічність	Середня K_D , нМ (n=2)	Антигенна щільність, середня кількість сайтів/ бактерію
4497	b-WTA	2,5	50000
4462	b-WTA	3,1	43000
6263	b-WTA	1,4	22000
6297	b-WTA	1,1	21000
7578	a-WTA	0,4	16000
rF1	SDR-glyco	0,3	1600

Значення K_D й антигенної щільності були отримані з використанням клітинного аналізу зв'язування з радіоактивним лігандом у наступних умовах аналізу: DMEM + буфер для зв'язування з 2,5% мишачою сироваткою крові; зв'язування протягом 2 годин при кімнатній температурі (RT); 400000 бактерій/ямку.

Антитіло 6263 аналогічно 6078, оскільки їхні послідовності дуже схожі. За винятком другого залишку (R у порівнянні з G) в CDR H3 всі інші залишки послідовностей CDR L і H ланцюгів

ідентичні.

Приклад 23. Створення мутантних WTA антитіл.

Коротко, для експресії антитіл у вигляді IgG1 область VH кожного анти-WTA бета антитіла клонували та зв'язували з константною областю людського H ланцюга гамма1, і VL зв'язували з константною областю каппа. У деяких випадках, послідовності дикого типу були змінені в деяких положеннях для поліпшення стабільності антитіла, як описано нижче. Далі були отримані антитіла з введеним методом генної інженерії цистеїном (ThioMabs).

i. Зв'язування варіабельних областей з константними областями.

Області VH WTA бета антитіл, ідентифіковані з бібліотеки людських антитіл, як описано вище, зв'язували з людськими константними областями $\gamma 1$ для одержання повнорозмірних антитіл IgG1. L ланцюги являли собою L ланцюги каппа.

ii. Одержання стабільних варіантів

WTA антитіла, показані на Фіг. 14 (дивіться, зокрема, Фіг. 15A, 15B, 16A, 16B), були генетично змінені для поліпшення деяких властивостей (наприклад, щоб уникнути деамінування, ізомеризації аспарагінової кислоти, окислювання або N-глікозилювання) і протестовані на зв'язування антигена, а також хімічну стабільність після введення амінокислотних замін. Одноланцюгова ДНК клонів, що кодують важкий або легкий ланцюги, була очищена з фагових частинок M13KO7, що ростуть у клітинах *E. coli* CJ236, з використанням набору QIAprep Spin M13 (Qiagen). 5'- Фосфорильовані синтетичні олігонуклеотиди, що мають послідовності:

5'- CCCAGACTGCACCAGCTGGATCTCTGAATGTACTCCAGTTGC- 3' (SEQ ID NO: 152)

5'- CCAGACTGCACCAGCTGCACCTCTGAATGTACTCCAGTTGC- 3' (SEQ ID NO: 153)

5'CCAGGGTTCCCTGGCCCCAWTMGTCAAGTCCASCWKACCTCTTGCACAGTAATAGACAGC- 3' (SEQ ID NO: 154); і

5'- CCTGGCCCCAGTCGTCAAGTCCTCCTTACCTCTTGCACAGTAATAGACAGC- 3' (SEQ ID NO: 155) (коди IUPAC)

були використані для одержання мутантних клонів, що кодують антитіла, за допомогою сайт-спрямованого мутагенезу, спрямованого олігонуклеотидами, відповідно до методики, описаної в Kunkel, T.A. (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 82(2): 488–492. Мутовану ДНК використовували для трансформації клітин *E. coli* XL1-Blue (Agilent Technologies), які висіювали на планшети з Luria Broth, що містять 50 мкг/мл карбеніциліну. Колонії збирали індивідуально та росли в рідкому середовищі Luria Broth, що містить 50 мкг/мл карбеніциліну. Виділений препарат ДНК секвенували для підтвердження присутності мутацій.

В антитілі 6078 друга амінокислота у VH, Met (met-2), піддана окислюванню. Тому Met-2 заміняли шляхом мутації на Ile або Val, щоб уникнути окислювання залишку. Оскільки зміна Met-2 може впливати на афінність зв'язування, здатність мутантів зв'язуватися з Staph CWP тестували за допомогою ELISA.

Було виявлено, що мотиви "DG" або "DD" в CDR H3 піддані трансформації в ізоаспарагінову кислоту. Антитіло Ab 4497 містить DG у положеннях 96 і 97 CDR H3 (дивіться Фіг. 18B) і було змінено для збільшення стабільності. CDR H3 зазвичай дуже важливий для зв'язування антигена, тому деякі мутанти тестували на зв'язування з антигеном і хімічною стабільністю (дивіться Фіг. 18A). Мутант D96E (v8) зберігає зв'язування з антигеном, так само як і антитіло дикого типу 4497 (Фіг. 18A; Фіг. 18B), і є стабільним і не утворює ізоаспарагінової кислоти.

ELISA з Staph CWP

Для аналізу мутантів антитіла 6078 препарати клітинної стінки *S. aureus* USA300 Δ SPA (WT), оброблені лізоафінном, що містять 1×10^9 бактерій/мл розбавляли, 1/100 в 0,05 карбонаті натрію з pH 9,6 і покривали ними 384- ямкові планшети для ELISA (Nunc; Neptune, NJ) при інкубації протягом ночі при 4 °C. Планшети промивали PBS з 0,05% Tween-20 і блокували інкубацією протягом 2 годин з PBS плюс 0,5% бичачого сироваткового альбуміну (BCA). Ці та всі наступні інкубації проводили при кімнатній температурі з обережним перемішуванням. Зразки антитіл розбавляли у буфері для розведення зразка/ стандарту (PBS, 0,5% BCA, 0,05% Tween 20, 0,25% CHAPS, 5 мМ ЕДТА, 0,35M NaCl, 15 мільйонних частин прокліну (pH 7,4)) додавали до промитих планшетів та інкубували протягом 1,5 – 2 годин. Зв'язавшись з планшетом анти-*S. aureus* антитіла виявляли 1-годинною інкубацією з кон'югованим з пероксидазою F(ab')₂ фрагментом козячого антитіла проти IgG(Fc γ) людини (Jackson ImmunoResearch; WestGrove, PA), розведеним до 40 нг/мл у буфері для аналізу (PBS, 0,5% BCA, 15 мільйонних частин прокліну, 0,05% Tween 20). Після кінцевого промивання додавали тетраметилбензидин (KPL, Gaithersburg, MD), фарбування розвивалося протягом 5-10 хвилин, і реакцію зупиняли 1 М фосфорною кислотою. Планшети аналізували при 450 нм із контрольним вимірюванням при 620

нм, використовуючи мікропланшетний спектрофотометр.

iii. Одержання мутантів, у які методами генної інженерії введений Cys (ThioMabs).

Повнорозмірні ThioMab продукували шляхом введення цистеїну в Н ланцюг (в CH1) або L ланцюг (Ск) у заздалегідь певне положення, як вказувалося раніше й описано нижче, щоб забезпечити кон'югацію антитіла з інтермедіатом лінкер-антибіотик. Н і L ланцюги далі клонували в окремі плазміди та кодуєчі Н і L ланцюги плазмідами трансфікували клітини 293, в яких вони експресувались і збирались в інтактні антитіла. Обидва ланцюги також можуть бути клоновані в одну експресуючу плазміду. За рахунок експресії бажаної комбінації Cys-мутантних ланцюгів і ланцюгів дикого типу були отримані IgG1, що мають 2 Cys, введених методами генної інженерії, по одному в кожному з Н ланцюгів, або 2 Cys, введених методами генної інженерії, по одному в кожному з L ланцюгів, або комбінацію 2 Н і 2 L ланцюгів з Cys, введеними методами генної інженерії (HCLCCys).

На Фіг. 15A і 15B наведені антитіла 6078 WT і мутанти з комбінацією HC Cys і LC Cys. Також тестували здатність мутанту 6078 зв'язуватись з USA300 Staph A, дефіцитним за білком А, з нічної культури. За результатами аналізу FACS, як показано на Фіг. 19, мутантні антитіла зв'язувались з USA300 так само, як антитіло 6078 WT (незмінене); амінокислотні зміни в мутантах не впливали на зв'язування з Staph A. g є неспецифічним негативним контрольним антитілом.

Приклад 24. Препарат кон'югату анти-WTA антитіло-антибіотик.

Кон'югати антитіла проти тейхоевих кислот клітинної стінки з антибіотиком (AAC) з Таблиці 3 одержували кон'югацією анти-WTA антитіла з інтермедіатом лінкер-антибіотик, включаючи інтермедіати з Таблиці 2. Перед кон'югацією анти-WTA антитіла частково відновлювали TCEP, використовуючи стандартні способи, відповідно до методики, описаної у WO 2004/010957, розкриття якої включено в даний документ за допомогою посилання для цієї мети. Частково відновлені антитіла кон'югували з інтермедіатом лінкер-антибіотик, використовуючи стандартні способи, відповідно до методики, описаної, наприклад, в Doronina et al. (2003) *Nat. Biotechnol.* 21:778-784 і US 2005/0238649 A1. Коротко, частково відновлені антитіла комбінували з інтермедіатом лінкер-антибіотик, щоб можна було кон'югувати інтермедіат лінкер-антибіотик з відновленими залишками цистеїну антитіла. Реакції кон'югації зупиняли й AAC очищали. Визначали навантаження антибіотика (середня кількість фрагментів антибіотика на антитіло) для кожного AAC, і вона становила приблизно між 1 і 2 для антитіл проти тейхоевих кислот клітинної стінки з одним мутантним сайтом цистеїну, введеним методами генної інженерії.

Відновлення/окислення ThioMab для кон'югації. Повнорозмірні моноклональні антитіла з введеним методом генної інженерії цистеїном (ThioMab - Junutula, et al., 2008b *Nature Biotech.*, 26(8):925-932; Dornan et al (2009) *Blood* 114(13):2721-2729; US 7521541; US 7723485; WO2009/052249, Shen et al (2012) *Nature Biotech.*, 30(2):184-191; Junutula et al (2008) *Jour of Immun. Methods* 332:41-52), експресовані в клітинах CHO, відновлювали приблизно 20-40 кратним надлишком TCEP (трис(2-карбоксietил) фосфін гідрохлориду) або DTT (дитіотреїтол) в 50 mM Трис із pH 7,5 і 2 mM ЕДТА протягом 3 годин при 37 °C або протягом ночі при кімнатній температурі. (Getz et al (1999) *Anal. Biochem.* Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA). Відновлене ThioMab розбавляли та наносили на колонку HiTrap S в 10 mM ацетаті натрію, pH 5, і елюювали PBS, що містить 0,3 M хлорид натрію. Альтернативно, антитіло закисляли додаванням 1/20 об'єму 10 % оцтової кислоти, розведеної 10 mM сукцинатом з pH 5, наносили на колонку і далі промивали 10 об'ємами колонки сукцинатного буфера. Елюцію з колонки здійснювали 50 mM Трис, pH 7,5, 2 mM ЕДТА.

Елюйоване відновлене ThioMab обробляли 15 кратним молярним надлишком DHAA (дегідроаскорбінової кислоти) або 200 nM водним розчином сульфату міді (CuSO₄). Окислювання міжланцюгових дисульфідних зв'язків завершувалось приблизно через три години або пізніше. Окислювання атмосферним повітрям також було ефективним. Повторно окислене антитіло діалізували в 20 mM сукцинаті натрію з pH 5, 150 mM NaCl, 2 mM ЕДТА та зберігали замороженими при -20 °C.

Кон'югація ThioMab з інтермедіатами лінкер-антибіотик.

Деблоковані повторно окислені тіо-антитіла (ThioMab) вводили в реакцію з 6-8 молярним надлишком інтермедіату лінкер-антибіотик з Таблиці 2 (з концентрованого розчину в DMSO у концентрації 20 mM) в 50 mM Трис, pH 8, до завершення реакції (16-24 годин), що визначали за допомогою LC-MS аналізу реакційної суміші.

Неочищені кон'югати антитіло-антибіотик (AAC) далі наносили на катіонообмінну колонку після розведення 20 mM сукцинатом натрію, pH 5. Колонку промивали, щонайменше, 10 об'ємами колонки 20 mM сукцинату натрію, pH 5, і антитіло елюювали PBS. AAC переводили в 20 mM His/ацетат, pH 5, з 240 mM сахарози з використанням колонок для гель-фільтрації. AAC

були охарактеризовані за допомогою УФ-спектроскопії для визначення концентрації білка, аналітичної SEC (ексклюзійна хроматографія) для аналізу агрегації і LC-MS до та після обробки лізин C-ендопептидазою.

Ексклюзійну хроматографію проводили, використовуючи колонку Shodex KW802.5 в 0,2М фосфаті калію, рН 6,2, з 0,25 мМ хлоридом калію та 15% IPA при швидкості потоку 0,75 мл/хв. Ступінь агрегації AAC визначали інтегруванням площі елюйованого піка в спектрі поглинання при 280 нм.

LC-MS аналіз проводили, використовуючи прилад Agilent QTOF 6520 ESI. Як приклад, AAC, отриманий таким хімічним чином, обробляли 1:500 вага/вага ендopeптидазою Lys C (Promega) у Трис, рН 7,5, протягом 30 хв при 37 °С. Отримані фрагменти розщеплення наносили на колонку PLRP-S, 1000A, 8 мкм, нагрівали до 80 °С та елюювали градієнтом від 30% В до 40% В протягом 5 хвилин. Рухома фаза А: H₂O з 0,05% ТФО. Рухома фаза В: ацетонітрил з 0,04% ТФО. Швидкість потоку: 0,5 мл/хв. Елюцію білка контролювали за УФ-поглинанням при 280 нм перед електророзпилювальною іонізацією та MS аналізом. Зазвичай досягали хроматографічного дозволу некон'югованого фрагмента Fc, некон'югованого Fab, що залишився, і антибіотик-Fab. Отримані спектри m/z деконволюювали, використовуючи програмне забезпечення Mass Hunter™ (Agilent Technologies) для розрахунку маси фрагментів антитіла.

Приклад 25. Ідентифікація й очищення стафопайну В як протеази, що здійснює розщеплення.

Супернатант із 3 літрів нічної культури Wood46 піддавали концентруванню та заміні буфера на 50 мМ фосфат натрію, рН 7, з використанням TFF (10 кДа). Зразок наносили на колонку з Q Сефарози FF і білки розділяли хроматографічно, використовуючи градієнт 0-300 мМ NaCl в 50 мМ фосфаті натрію, рН 7. Активні фракції ідентифікували інкубацією з thioFAB S4497-MC-GGAFAGGG-(pipBOR) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 126), показаним на Фіг. 27, і за допомогою LC-MS аналізу оцінювали розщеплення лінкера в очікуваному сайті. Активні фракції поєднували та додавали сульфат амонію до концентрації 2 М. Білки далі очищали за допомогою хроматографії гідрофобних взаємодій на фенілсефарозі з використанням градієнта 2-0 М сульфату амонію в 50 мМ Трис із рН 7,5. Знову ідентифікували активні фракції, використовуючи для цього зазначену сполуку. Ці фракції поєднували й далі очищали на колонці з Моно Q в 50 мМ ацетаті натрію з рН 5,5, використовуючи градієнт солі 0-1 М NaCl. Активні фракції з цього хроматографічного етапу ідентифікували, як і раніше, поєднували та піддавали ексклюзійній хроматографії у PBS. Ідентифікували активні фракції та за допомогою SDS-PAGE визначали, що вони містять один білок, що цікавить.

Збагачені активні фракції після очищення на Q Сефарозі були охарактеризовані, щоб визначити клас протеази, відповідальної за активність. Було виявлено, що протеаза інгібується N-етилmaleїмідом, що вказує на те, що, імовірно, фермент є цистеїновою протеазою. Після розгляду відомих секретованих цистеїнових протеаз *Staphylococcus aureus*, було визначено, що стафопайн В має субстратну специфічність, аналогічну тій, яку спостерігали при скринінгу REPLi (Kalinska, M., T. Kantyka, et al. (2012). *Biochimie* 94(2): 318). Очищений стафопайн В одержували від Sigma-Aldrich та інкубували з thioFAB S4497-MC-GGAFAGGG-(pipBOR) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 126), показаний на Фіг. 27. Було виявлено, що стафопайн В розщеплює лінкер у тому ж самому сайті, що й активна протеаза, очищена з супернатанта Wood46. Стафопайн В й активну протеазу, очищену з супернатанта культури клітин, інкубували з Alexa Fluor® 488 C₅ maleїмідом (Invitrogen, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc.), щоб здійснити мічення цистеїнів активних сайтів. Зразки аналізували за допомогою SDS-PAGE, що призвело до ідентифікації протеази як стафопайн В. Активні фракції після очищення SEC також піддавали аналізу SDS-PAGE разом із очищеним стафопайном В, у присутності Alexa Fluor 488 і без нього.

Збагачені активні фракції для очищення на Q Сефарозі також аналізували за допомогою протеомної мас-спектрометрії. Десять мікрограмів активних фракцій B11, B12 і C02, десять мікрограмів активних фракцій 1, 2, 3 і десять мікрограмів неактивної фракції піддавали SDS-PAGE. Смуги вирізали з гелів і піддавали трипсинолізу протягом ночі. Оброблені трипсином зразки аналізували за допомогою LC-MS/MS, і результати тандемної мас-спектрометрії підтверджували пошуком за базою даних, використовуючи алгоритм пошуку Mascot. Стафопайн В був найбільш представленою цистеїновою протеазою в активних фракціях. Аутолізин, що також є цистеїновою протеазою, також був високо представлений, але найбільша представленість унікальними пептидами була в неактивній фракції, негативному контролі, тому аутолізин був виключений з розгляду. Мас-спектрометричний протеомний аналіз активних фракцій після очищення на Q Сефарозі показав високу перевагу стафопайну В. Дані

фільтрували за білками *S. aureus* і ранжували за числом пептидів в активній фракції 1.

Активну протеазу очищали з супернатанта культури клітин Wood46 *S. aureus*. Клітини росли протягом ночі при 37 °C в 3 літрах TSB. Клітини видаляли центрифугуванням при 10000 x g протягом 10 хв. Культуральний супернатант пропускали через два 0,22 мкм фільтри. Далі, проводили концентрування та здійснювали заміну буфера на 50 мМ фосфат натрію з рН 7 з використанням TFF з мембраною 10 кДа. Зразки концентрували в десять разів до об'єму 300 мл. Зразок наносили на Q Сефарозу FF (GE Healthcare Biosciences AB) і білки розділяли хроматографічно, використовуючи градієнт 0-300 мМ NaCl в 50 мМ фосфату натрію, рН 7. Активні фракції поєднували та додавали сульфат амонію до концентрації 2 М. Білки далі очищували за допомогою хроматографії гідрофобних взаємодій на Фенілсефарозі (GE Healthcare Biosciences AB) з використанням градієнта 2-0 М сульфату амонію в 50 мМ Трис із рН 7,5. Активні фракції поєднували й далі очищали на Mono Q (GE Healthcare Biosciences AB) в 50 мМ ацетаті натрію, рН 5,5, використовуючи градієнт солі 0-1 М NaCl. Активні фракції з цього хроматографічного етапу ідентифікували, як і раніше, поєднували та піддавали ексклюзійній хроматографії (Zenix-150, Sepax Technologies) у PBS.

Для ідентифікації фракцій, що містять цікавлячу нас активну протеазу, 100 мкл кожної фракції переносили в 96-ямковий планшет, де їх інкубували з 25 мкг thioFAB 4497 mal-GGAFAGGG-DNA31 («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 126). Після кожного хроматографічного етапу аналізували активність фракцій, і використовували 100 мкл фракції поза залежністю від концентрації білка. Зразки інкубували протягом ночі при 37 °C і далі аналізували за допомогою LC-MS для ідентифікації фракцій, де відбулося розщеплення протеазою інтермедиату лінкер-антибіотик. Об'єднані активні фракції після хроматографії на Q Сефарозі FF мали концентрацію загального білка 14 мг/мл. 200 мкг пулу розбавляли до 2 мг/мл у PBS та інкубували з N-етилmaleїмідом (NEM, Sigma) у кінцевій концентрації 0,1 мМ і без нього. Зразки інкубували при кімнатній температурі протягом 1 години. 25 мкг thioFAB 4497 mal-GGAFAGGG-DNA31 («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 126) додавали до всіх зразків і суміш інкубували при 37 °C протягом 2 годин. Через 2 години зразки аналізували за допомогою LC-MS для визначення, чи відбулося розщеплення протеазою інтермедиату лінкер-антибіотик. Приблизно 50 мкл активних фракцій після SEC інкубували з 0,1 мМ Alexa Fluor 488 C₅ maleїмід (Invitrogen) протягом 1 години поза залежністю від концентрації білка для здійснення мічення. Аналіз розщеплення з очищеними протеазами проводили шляхом інкубації 5 мкМ кон'югату thioFAB з 50 нМ протеази в кінцевому об'ємі 100 мкл. Аналізи проводили або у PBS з рН 7,2, 4 мМ L-Cys, 2,5 мМ EDTA, або в 100 мМ цитрату натрію з рН 5, 100 мМ NaCl, 4 мМ L-Cys, 2,5 мМ EDTA. Зразки інкубували протягом 2 годин при 37 °C. Через 2 години реакцію розщеплення зупиняли розведенням 1:1 1% ТФО. Зразки далі аналізували за допомогою LC-MS для визначення відсотка розщеплення лінкера. Відсоток розщеплення лінкера визначали інтегруванням піків хроматограм A₂₈₀ розщеплених та інтактних сполук. Фрагменти антибіотика або хромофору, додані на С-кінець лінкерів, надавали значну гідрофобність, так що піки thioFAB з інтактними лінкерами та thioFAB з розщепленими лінкерами дозволяються на рівні базової лінії.

Для протеомного аналізу збагачених фракцій десять мікрограмів збагачених активних фракцій після очищення на Q Sepharose® (GE Healthcare Life Sciences) наносили в 4-12% Біс-Трис гель (Life Technologies). Гелеві доріжки вирізали цілком і розрізали зверху вниз на 11 смуг. Від фарбування смуг гелю позбувалися в 50% ацетонітрилі/ 50 мМ бікарбонаті амонію, білки відновлювали дитіотреїтолом (кінцева концентрація 50 мМ) протягом 30 хвилин при 50 °C й алкілювали йодацетамідом (кінцева концентрація 50 мМ) при кімнатній температурі в темряві протягом 30 хвилин. Зразки далі піддавали розщепленню 0,02 мкг/мл трипсину (Promega) в 50 мМ бікарбонаті амонію при 37 °C протягом ночі. Зразки після обробки трипсином наносили на капілярну колонку з внутрішнім діаметром 100 мкм (колонка NanoAcquity CBEPX, 100 мкм x 100 мм, 1,7 мкм, BEH130 C18, Waters Corp) і розділяли за допомогою капілярної зверненої-фазової хроматографії, використовуючи систему CBEPX NanoAcquity (Waters Corp). Зразки наносили в 0,1% трифтороцтовій кислоті у воді та елюювали градієнтом 2-90% буфера В (де буфер А являє собою 0,1% мурашиної кислоти/ 2% ацетонітрилу/ 98% води, і буфер В являє собою 0,1% мурашиної кислоти/ 2% води/ 98% ацетонітрилу) при 1,00 мкл/хв із загальним часом аналізу 45 хвилин. Пептиди елюювали прямо в мас-спектрометр LTQ-Orbitrap XL (ThermoFisher) й іонізували, використовуючи джерело ADVANCE (Michrom-Bruker) з напругою при електророзпиленні 1,4 кВ. Мас-спектрометричні дані одержували, використовуючи метод, що включає одне повне MS сканування (375-1600 m/z) на приладі Orbitrap з дозволом 60000 M/ΔM при m/z 400 з наступною індукованою зіткненнями дисоціацією (CID) 8 найбільш представлених іонів у повних MS скануваннях за цикл, що повторюється протягом градієнта LC у лінійній іонній

пастці. ТанDEMні мас-спектрометричні результати підтверджували пошуком у базі даних з використанням алгоритму пошуку Mascot® версії 2.3.02 (Matrix Sciences) проти складової бази з цільових білків і свідомо помилкових (неіснуючих) білків, Uniprot версія 2010_12, що включає білки *S. aureus* і звичайні лабораторні забруднювачі. Використовували наступні параметри пошуку: специфічність використовуваного ферменту: трипсин, варіабельні модифікації: карбамідометилування цистеїну (+57,0215 Да) і окислювання метіоніну (+15,995 Да), можливі 2 розщеплення в невірних сайтах, помилка визначення маси іона прекурсор 200 мільйонних частин, і точність визначення маси фрагментного іона 0,5 Да. Збіги спектрів пептидів перевіряли з використанням лінійного дискримінантного алгоритму (LDA) з імовірністю хибнопозитивної ідентифікації, рівної 1%.

Приклад 26. Розщеплення стафопаїном thioFAB FRET пептидів і AAC.

5 мкМ thioFAB 4497 MP-LAFGA-QSY7 («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 135) і thioFAB 4497 MP-LAFAA-QSY7 («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 136) (Фіг. 30) інкубували з 50 нМ протеази у PBS, pH 7,2, 4 мМ L-Cys, 2,5 мМ ЕДТА протягом 2 годин при 37 °С. Через 2 години реакцію розщеплення зупиняли розведенням 1:1 1% ТФО. Зразки далі були проаналізовані за допомогою LC-MS для визначення відсотка розщеплення лінкера. Всі тестовані протеази розщеплювали два лінкера, хоча й у різному ступені та у різних сайтах (Таблиця 4). Стафопаїн А і стафопаїн В розщеплюють лінкери в тому самому сайті: MP-LAFGA-QSY7 («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 135) і MP-LAFGA-QSY7 («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 136). Стафопаїн В досягає 100% розщеплення обох лінкерів у тестованій концентрації. Катепсин В також досягав 100% розщеплення для обох лінкерів у цих умовах, хоча сайти розщеплення були змішаними. Катепсин В розщеплював mal-LAFGA-QSY7 («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 135) винятково в MP-LAFGA-QSY7 («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 135), тоді як mal-LAFAA-QSY7 («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 136) катепсин В розщеплював як в MP-LAFGA-QSY7 («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 136), так і в MP-LAFAA-QSY7 («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 136). Розщеплення стафопаїном А MP-LAFAA-QSY7 («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 136) склало 23%, тоді як розщеплення MP-LAFGA-QSY7 («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 135) склало 38%.

5 мкМ AAC-193 інкубували з 50 нМ протеази або у PBS з pH 7,2, 4 мМ L-Cys, 2,5 мМ ЕДТА, або в 100 мМ цитрату натрію з pH 5, 100 мМ NaCl, 4 мМ L-Cys, 2,5 мМ ЕДТА протягом 2 годин при 37 °С. Через 2 години реакцію розщеплення зупиняли розведенням 1:1 1% ТФО. Зразки далі були проаналізовані за допомогою LC-MS для визначення відсотка розщеплення лінкера. Оптимізований інтермедіат лінкер-антибіотик ефективно розщеплювався всіма тестованими протеазами. При розщепленні стафопаїном А і стафопаїном В вивільнявся вільний піперазинорифаміцин. Розщеплення стафопаїном В склало 100% як при pH 5, так і при pH 7,2. Розщеплення стафопаїном А склало 100% при pH 5 і 64% при pH 7,2.

Приклад 27. Кон'югат антитіло-антибіотик тіо-S4497 LC v8-MP-LAFG-PABC-(піперазиноBOR) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 128) AAC-215 інгібує *S. aureus* *in vitro*.

1×10^8 бактерій Wood46, що перебувають у стаціонарній фазі, суспендували в 10 мкл буфера HB (збалансований сольовий розчин Хенкса з додаванням 0,1% бичачого сироваткового альбуміну), що містить 100 мкг/мл тіо-S4497 LC v8-MP-LAFG-PABC-(піперазиноBOR) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 128) AAC-215 або тіо-S4497-HC-A118C-MC-vc-PABC-(піперазBOR) AAC-126. В останньому використаний лінкер валін-цитрулін (vc), розщеплюваний катепсином В, для доставки того ж самого антибіотика.

Через 1 годину зразки розбавляли в 10 разів додаванням 90 мкл HB або 90 мкл катепсину В (10 мкг/мл катепсину В в 20 мМ ацетаті натрію, 1 мМ ЕДТА, 5 мМ L-цистеїну з pH 5) та інкубували при 37 °С протягом додаткових 3 годин. Про вивільнення активного антибіотика судили за тим, чи інгібує інкубація AAC з бактеріями подальший ріст бактерій. Суспензії бактерій/ AAC вносили прямо у планшети з триптичним соєвим агаром і візуалізували ріст бактерій після інкубації протягом ночі при 37 °С. Активний лікарський засіб вивільняється з AAC, кон'югованого з інтермедіатом лінкер-антибіотик MC-LAFG-PAB-(піперазиноBOR) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 128).

Бактерії, які інкубували без AAC, росли добре, і на них не чинила впливу обробка катепсином В. Бактерії, оброблені AAC-126, що містить лінкер валін-цитрулін (vc), розщеплюваний катепсином В, росли добре після інкубації у буфері HB як такому, але їхній ріст придушувався після обробки AAC-126 + катепсин В, що свідчить про те, що обробка ферментом була необхідна для вивільнення активного антибіотика. На противагу цьому, ріст бактерій, які інкубували з AAC-215, що містить лінкер LAFG, розщеплюваний стафопаїном (SEQ ID NO: 128), придушувався після інкубації з буфером HB як таким, що припускає, що бактеріальна суспензія

мала ферментативну активність, достатню для вивільнення активного антибіотика з AAC, що містить розщеплюваний стафопаїном лінкер.

Приклад 28. Кон'югат антитіло-антибіотик тіо-S4497 HC v1-MP-LAFG-PABC-(піперазиноBOR) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 128) AAC-193 знищує внутрішньоклітинні MRSA в аналізі з макрофагами.

Штам USA300 *S. aureus* інкубували з різними дозами (100 мкг/мл, 10 мкг/мл, 1 мкг/мл або 0,1 мкг/мл) антитіла S4497 як такого, тіо-S4497 HC WT (v8) (SEQ ID NO: 137), LC V205C-MC-vc-PAB-(диметилпірBOR) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 128) AAC-192 або тіо-S4497 HC v1-MP-LAFG-PABC-(піперазиноBOR) AAC-193, щоб відбулося зв'язування AAC з бактеріями (Фіг. 31).

S4497 HC WT (v8) 446 амінокислот

EVQ LVE SGG GLV QPG GSL RLS CSA SGF SFN SFW MHW VRQ VPG KGL VWI SFT NNE GTT TAY

ADS VRG RFI ISR DNA KNT LYL EMN NLR GED TAV YYC ARG DGG LDD WGQ GTL VTV SSA STK

GPS VFP LAP SSK STS GGT AAL GCL VKD YFP EPV TVS WNS GAL TSG VHT FPA VLQ SSG LYS

LSS VVT VPS SSL GTQ TYI CNV NHK PSN TKV DKK VEP KSC DKT HTC PPC PAP ELL GGP SVF LFP PKP KDT LMI SRT PEV TCV VVD VSH EDP EVK FNW YVD GVE VHN AKT KPR EEQ YNS

TYR

VVS VLT VLH QDW LNG KEY KCK VSN KAL PAP IEK TIS KAK GQP REP QVY TLP PSR EEM TKN QVS LTC LVK GFY PSD IAV EWE SNG QPE NNY KTT PPV LDS DGS FFL YSK LTV DKS RWQ QGN

VFS CSV MHE ALH NHY TQK SLS LSP GK

(SEQ ID NO: 137)

Після 1 години інкубації опсонізовані бактерії додавали до мишачих макрофагів та інкубували при 37 °C протягом 2 годин, щоб пройшов фагоцитоз. Після завершення фагоцитозу суміш для інфікування заміщали на нормальне середовище для росту з додаванням 50 мкг/мл гентаміцину для знищення будь-яких позаклітинних бактерій, що залишились, і визначали загальну кількість внутрішньоклітинних бактерій, що вижили, через 2 дні, роблячи посіви серійних розведень лізатів макрофагів на чашки з триптичним соєвим агаром (Фіг. 31). Розщеплюваний стафопаїном AAC міг знищувати внутрішньоклітинні USA300 з аналогічною активністю у порівнянні з AAC, що розщеплюють катепсином B. Сіра пунктирна лінія означає межу виявлення для цього аналізу (10 КУО/ямку).

Приклад 29. AAC чинить спрямовану антибактеріальну дію на *S. aureus* за допомогою антиген-специфічного зв'язування з антитілом.

Був вибраний штам Wood46 *S. aureus*, оскільки він не експресує білок A, молекулу, що зв'язується з областю Fc антитіл IgG. Штам Wood46 *S. aureus* інкубували з 10 мкг/мл або 0,5 мкг/мл антитіла S4497; AAC, що містить контрольне антитіло з тим же самим ізотипом і містить розщеплюваний катепсином B лінкер, тіо-трастузумаб HC A118C-MC-vc-PAB-(диметилпірBOR) AAC-101; тіо-S4497 HC WT (v8), LC V205C-MC-vc-PAB-(диметилпірBOR) AAC-192; AAC, що містить контрольне антитіло з тим же самим ізотипом і містить розщеплюваний стафопаїном лінкер, тіо-трастузумаб HC A118C-MP-LAFG-PABC-(піперазиноBOR) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 128); або тіо-S4497 HC v1-MP-LAFG-PABC-(піперазиноBOR) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 128) AAC-193 протягом 1 години, щоб відбулося зв'язування AAC з бактеріями (Фіг. 32). Для обмеження неспецифічного зв'язування AAC опсонізовані бактерії центрифугували, однократно промивали та ресуспендували у буфері перед додаванням до мишачих макрофагів. Після завершення фагоцитозу суміш для інфікування заміщали на нормальне середовище для росту з додаванням 50 мкг/мл гентаміцину для знищення позаклітинних бактерій і загальну кількість внутрішньоклітинних бактерій, що вижили, визначали через 2 дні, роблячи посіви серійних розведень лізатів макрофагів на планшети з триптичним соєвим агаром (Фіг. 32). AAC, що містить розщеплюваний стафопаїном лінкер, AAC-193, міг знищувати всі внутрішньоклітинні бактерії, що виявляють, тоді як для AAC, що містить контрольне антитіло з тим же самим ізотипом, активність не була показана. Аналіз із макрофагами продемонстрував, що розщеплювані стафопаїном AAC можуть знищувати внутрішньоклітинні бактерії. Кон'югат антитіло-антибіотик, тіо-S4497 LC v8-MP-LAFG-PABC-(піперазиноBOR) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 128) AAC-215 ефективний у моделі інфекції MRSA *in vivo*.

Мишам CB17.SCID вводили людський IgG, використовуючи режим дозування, оптимізований для досягнення константного рівня людських IgG у сироватці крові, що

становить, щонайменше, 10 мг/мл. Мишей обробляли антитілом 4497 (50 мг/кг), AAC-215 із розщеплюваним стафопаїном лінкером (50 мг/кг) або анти-gD AAC, що містить контрольне антитіло з тим же самим ізотипом і містить розщеплюваний стафопаїном лінкер (50 мг/кг). Мишам вводили однократну дозу AAC-215 через 1 день після інфекції шляхом внутрішньовенної ін'єкції. Всіх мишей умертвляли на 4 день після інфекції та визначали загальну кількість бактерій, що вижили, в 2 нирках (Фіг. 33) або в серці (Фіг. 34), роблячи посіви. Обробка AAC-215, що містить розщеплюваний стафопаїном лінкер, знижувала бактеріальне навантаження до рівня нижче межі виявлення в 6 з 8 тестованих мишей, тоді як для AAC, що містить контрольне антитіло з тим же самим ізотипом, була показана обмежена активність. Пунктирна лінія означає межу виявлення для аналізу (333 КУО/миша).

Приклад 30. Вирощування *S. aureus* і визначення профілю протеазної активності.

Штам Wood46 *Staphylococcus aureus* (ATCC10832) культивували протягом ночі при 37 °C у триптичному соєвому бульйоні (TSB) з перемішуванням. Культури центрифугували при 10000 x g протягом 10 хв. Супернатант збирали та пропускали через два 0,22 мкм фільтри.

Профіль протеазної активності *S. aureus*: 150 мл супернатанту культури клітин піддавали концентруванню та заміні буфера на фосфатно-сольовий буферний розчин (PBS) до кінцевого об'єму 38 мл з кінцевою загальною концентрацією білка 1 мг/мл, використовуючи TFF (Millipore Pellicon XL Cassette Biomek 10kDa). Аналіз протеазної активності супернатанту Wood46 проводили, використовуючи бібліотеку Rapid Endopeptidase Profiling Library або REPLi (Mimotopes, Victoria, Australia). Бібліотека складається з 3375 флуорогенних пептидів із внутрішньомолекулярним гасінням флуоресценції в 96-ямковому форматі, організованих в 512 груп. Пептиди бібліотеки мають послідовність MCA-Gly-Gly-Gly-Xaa-Yaa-Zaa-Gly-Gly-DPA-Lys-Lys (SEQ ID NO: 132), де MCA відповідає 7-метоксикумарин-4-оцтовій кислоті (донор флуоресценції), і DPA відповідає N^p-(2,4-динітрофеніл)-L-2,3-діамінопропіонової кислоті (акцептор флуоресценції). В ямки, що містять 5 нмоль FRET пептидів, додавали 5 мкл 50% ацетонітрилу (Sigma) для розчинення пептидів. У кожну ямку додавали 50 мкл (мікролітрів) концентрованого супернатанту Wood46 і 50 мкл PBS. Планшети інкубували при 37 °C і вимірювання флуоресценції проводили через 0, 30, 60, 140 і 170 хвилин. Флуоресценцію вимірювали за допомогою Tecan Sapphire², екстинкція λ320 нм/ емісія λ400 нм. Кратність зміни інтенсивності флуоресценції в кінцевій точці розраховували як $F_{\text{кінцева}}/F_{\text{початкова}}$.

Сайти розщеплення субстрату визначали за допомогою LC-MS на Agilent Q-TOF, використовуючи джерело ESI. 10 мкл із кожної ямки інжектували та розділяли зверненою-фазовою хроматографією на колонці Waters Xbridge OST C18 2,5 мкм (4,6 x 50 мм), використовуючи систему BEPX Agilent 1260. Зразки елюювали градієнтом 2-90% буфера В (де буфер А являє собою 0,05% трифтороцтову кислоту/ 99,95% води, і буфер В являє собою 0,04% трифтороцтову кислоту/ 99,96% ацетонітрil) при 500 мкл/хв протягом 20 хвилин аналізу. Пептиди елюювали прямо в Q-TOF мас-спектрометр. Продукти розщеплення визначали, ґрунтуючись на порівнянні спостережуваних молекулярних ваг з розрахованими вагами, що відповідають розщепленню в кожному можливому сайті.

Приклад 31. Синтез малеїмідо FRET пептидного лінкера.

Малеїмідо FRET пептид (MP-Lys(TAMRA)-Gly-Gly-Ala-Phe-Ala-Gly-Gly-Gly-Lys(флуоресцеїн) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 125), показаний на Фіг.26, синтезували стандартним методом твердофазного синтезу з використанням Fmoc, використовуючи пептидний синтезатор PS3 (Protein Technologies, Inc.). Для одержання C-кінцевого карбоксаміду використали 0,1 ммоль Fmoc-Lys(Boc)-Rink амідної смоли (Novabiochem). До першого N-кінцевого залишку додавали Fmoc-Lys(Mtt)-OH (Novabiochem), що дозволило вводити додаткові бічні групи після видалення групи Mtt. Акцептор флуоресценції, 5(6)-карбокситетраметилпродамін, або TAMRA (Novabiochem), приєднували до цього аміну бічного ланцюга на смолі після видалення групи Mtt за допомогою трьох послідовних 30-хвилинних промивань 1% ТФО в дихлорметані з 3% триізопропілсиланом (TIS). Реакція протікала протягом 20 годин. Після цієї стадії кінцеву Fmoc групу видаляли 20% піперидином в DMF і здійснювали зв'язування з малеїмідо-пропіоновою кислотою (Bachem AG) за допомогою HBTU. TAMRA-мічені проміжні пептиди відщепляли від смоли сумішшю 95:2,5:2,5 трифтороцтової кислоти (ТФО)/TIS/води (об'єм/об'єм/об'єм) протягом 2 годин при кімнатній температурі й обережному перемішуванні. Розчин для відщеплення фільтрували та випаровували у потоці азоту для видалення ТФО. Неочищені інтермедіати, розведені в суміші води й ацетонітрилу, піддавали подальшому очищенню за допомогою зверненої-фазової BEPX на колонці Jupiter 5 мкм C4 (5 мкм, 10 мм x 250 мм) від Phenomenex. Після ліофілізації очищені інтермедіати далі вводили в реакцію з 10 еквівалентами NHS-флуоресцеїну (Thermo Scientific) у суміші 50/50 фосфатно-сольовий буферний розчин (PBS)/диметилформамід (DMF) (об'єм/об'єм) протягом 20 годин, щоб позначити вільний амін C-

кінцевого лізину. FRET пептид далі очищали та ліофілізували, як описано вище. Всі реакційні суміші та кінцеві продукти аналізували й підтверджували за допомогою LC-MS.

Твердофазний синтез лінкерів. Всі описані лінкери синтезували з використанням стандартного методу твердофазного синтезу з використанням Fmoc на пептидному синтезаторі PS3 (Protein Technologies, Inc.). Для всіх лінкерів для одержання C-кінцевого карбоксилу використали 0,1 мМ смоли Ванга Fmoc-амінокислота (Novabiochem). Лінкери очищали, як описано вище. Приєднання QSY7 аміну (Invitrogen) здійснювали реакцією очищених лінкерів з молярним надлишком (в 1,1 раз) QSY7 аміну, молярним надлишком (в 1,1 раз) HATU і молярним надлишком (в 2,2 рази) DIEA в DMF протягом ночі при кімнатній температурі. Лінкер-QSY7 далі очищали, як описано вище. Всі реакційні суміші й кінцеві продукти аналізували та підтверджували за допомогою LC-MS.

Приклад 32. Клітинні аналізи розщеплення з використанням FRET.

Культури Wood46 і USA300 інокулювали 1:200 розведенням нічних культур (0,1 мл в 20 мл) в TSB та інкубували при 37 °C з перемішуванням. Штами культивували до експонентної фази росту та висіювали при щільності 10^8 клітин/мл і 10^7 клітин/мл у триптичний соєвий бульйон (TSB). Кон'югат ThioMab FRET пептид додавали в ямки в кінцевій концентрації FRET пептиду 2 мкМ. Планшети інкубували при 37 °C і вимірювали флуоресценцію протягом 210 хвилин, екстинкція $\lambda 495$ нм/ емісія $\lambda 518$ нм.

Розщеплення thioFAB FRET пептид і thioFAB mal-GGAFAGGG-DNA31 («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 126) концентрованим активним супернатантом: thioFAB S4497, кон'юговане або з MP-Lys(TAMRA)-Gly-Gly-Ala-Phe-Ala-Gly-Gly-Gly-Lys(флуоресцеїн) («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 125), або MP-Gly-Gly-Ala-Phe-Ala-Gly-Gly-Gly-(pipBOR) LA-59 («коровий пептид» наведений в SEQ ID NO: 126), інкубували з концентрованим супернатантом Wood46, що був оброблений, як описано вище. thioFAB S4497 і супернатант змішували 1:1 у міліграмах (25 мкг thioFAB S4497 із супернатантом, що містить 25 мкг білка) у PBS. Зразки інкубували протягом 2 годин при 37 °C. Через 2 години реакцію зупиняли розведенням 1:1 0,1% TFA. Зразки аналізували за допомогою LC-MS для визначення ступеня розщеплення та продуктів розщеплення.

Незважаючи на те, що даний винахід був описаний у деяких деталях за допомогою ілюстрацій і прикладів з метою ясності розуміння, описи та приклади не повинні бути витлумачені як обмежуючі об'єм даного винаходу. Розкриття всієї патентної та наукової літератури, цитовані в даному документі, спеціально включені в даний документ у всій своїй повноті за допомогою посилання.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> GENENTECH, INC.

<120> АНТИТИЛА ПРОТИ ТЕЙХОЄВИХ КИСЛОТ КЛІТИННОЇ СТІНКИ ТА ЇХ КОН'ЮГАТИ

<130> P4960R2-W0

<140>

<141>

<150> 14/284,609

<151> 2014-05-22

<150> 61/829,461

<151> 2013-05-31

<160> 180

<170> PatentIn версія 3.5

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 1

Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Val	Leu	Ser	Arg	Ala	Asn	Asn	Asn	Tyr	Tyr	Val
1				5					10					15	

Ala

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 2

Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Phe
1			5			

<210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 3
 Gln Gln Tyr Tyr Thr Ser Arg Arg Thr
 1 5

<210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 4
 Asp Tyr Tyr Met His
 1 5

<210> 5
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 5
 Trp Ile Asn Pro Lys Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 6

Asp Cys Gly Ser Gly Gly Leu Arg Asp Phe
1 5 10

<210> 7

<211> 16

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 7

Arg Ser Asn Gln Asn Leu Leu Ser Ser Ser Asn Asn Asn Tyr Leu Ala
1 5 10 15

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 8

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 9

Gln Gln Tyr Tyr Ala Asn Pro Arg Thr
1 5

<210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 10
 Asp Tyr Tyr Ile His
 1 5

<210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 11
 Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe Arg
 1 5 10 15

Asp

<210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 12
 Asp Cys Gly Arg Gly Gly Leu Arg Asp Ile
 1 5 10

<210> 13
 <211> 17
 <212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 13

Lys	Ser	Asn	Gln	Asn	Val	Leu	Ala	Ser	Ser	Asn	Asp	Lys	Asn	Tyr	Leu
1				5					10					15	

Ala

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 14

Trp	Ala	Ser	Ile	Arg	Glu	Ser
1				5		

<210> 15

<211> 9

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 15

Gln	Gln	Tyr	Tyr	Thr	Asn	Pro	Arg	Thr
1				5				

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний

пептид"

<400> 16

Asp Tyr Tyr Ile His
1 5

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 17

Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 18

Asp Cys Gly Asn Ala Gly Leu Arg Asp Ile
1 5 10

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 19

Lys Ser Ser Gln Asn Val Leu Tyr Ser Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 20
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 20
 Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 21
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 21
 Gln Gln Tyr Tyr Thr Ser Pro Pro Tyr Thr
 1 5 10

<210> 22
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 22
 Ser Tyr Trp Ile Gly
 1 5

<210> 23
 <211> 17
 <212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 23

Ile Ile His Pro Gly Asp Ser Lys Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 24

<211> 29

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 24

Leu Tyr Cys Ser Gly Gly Ser Cys Tyr Ser Asp Arg Ala Phe Ser Ser
1 5 10 15

Leu Gly Ala Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Gly Val
20 25

<210> 25

<211> 113

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 25

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

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

Ala Asn Asn Asn Tyr Tyr Val Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Phe Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Asn Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Thr Ser Arg Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 26

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 26

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Pro Lys Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Arg Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Gly Asp Thr Ser Ile Ser Ala Ala Tyr
65 70 75 80

Met Asp Leu Ala Ser Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Lys Asp Cys Gly Ser Gly Gly Leu Arg Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 27

<211> 112

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 27

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ser Asn Gln Asn Leu Leu Ser Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Leu Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

<210> 28

<211> 119

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 28

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Arg Asp Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ala Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Asp Cys Gly Arg Gly Gly Leu Arg Asp Ile Trp Gly Pro Gly
100 105 110

Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 29

<211> 113

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 29

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

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

Ser Asn Asp Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln His Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Leu Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Thr Asn Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Phe
100 105 110

Asn

<210> 30
<211> 119
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 30
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Thr
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

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

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Thr Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ala Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Lys Asp Cys Gly Asn Ala Gly Leu Arg Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 31
<211> 114
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний
поліпептид"

<400> 31
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Asn Val Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Thr Ser Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu
100 105 110

Ile Glu

<210> 32

<211> 138

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 32

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Tyr Cys Ser Gly Gly Ser Cys Tyr Ser Asp Arg Ala Phe
100 105 110

Ser Ser Leu Gly Ala Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Gly Val Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 33
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 33
 Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 34
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 34
 Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser
 1 5

<210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 35
 Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Ser Phe Asn
 1 5

<210> 36
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний

пептид"

<400> 36

Ser Tyr Asp Ile Asn

1 5

<210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 37

Trp Met Asn Ala Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 38

Ser Ser Ile Leu Val Arg Gly Ala Leu Gly Arg Tyr Phe Asp Leu

1 5 10 15

<210> 39

<211> 11

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 39

Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 40
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 40
 Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser
 1 5

<210> 41
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 41
 Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Ser Phe Asn
 1 5

<210> 42
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 42
 Ser Tyr Asp Ile Asn
 1 5

<210> 43
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 43

Trp Met Asn Ala Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 44

Ser Ser Ile Leu Val Arg Gly Ala Leu Gly Arg Tyr Phe Asp Leu
1 5 10 15

<210> 45

<211> 12

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 45

Arg Ala Ser Gln Phe Val Ser Arg Thr Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 46

Glu Thr Ser Ser Arg Ala Thr

1

5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 47

His Lys Tyr Gly Ser Gly Pro Arg Thr

1

5

<210> 48

<211> 5

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 48

Asn Tyr Asp Phe Ile

1

5

<210> 49

<211> 17

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 49

Trp Met Asn Pro Asn Ser Tyr Asn Thr Gly Tyr Gly Gln Lys Phe Gln

1

5

10

15

Gly

<210> 50

<211> 10

<212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

 <400> 50
 Ala Val Arg Gly Gln Leu Leu Ser Glu Tyr
 1 5 10

 <210> 51
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

 <400> 51
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

 <210> 52
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

 <400> 52
 Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5

 <210> 53
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

 <400> 53

Gln Lys Tyr Gly Ser Thr Pro Arg Pro
1 5

<210> 54
<211> 5
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 54
Ser Tyr Asp Ile Asn
1 5

<210> 55
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 55
Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Arg Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 56
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 56
Glu Arg Trp Ser Lys Asp Thr Gly His Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp
1 5 10 15

Val

<210> 57
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

 <400> 57
 Arg Ala Ser Leu Asp Ile Thr Asn His Leu Ala
 1 5 10

 <210> 58
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

 <400> 58
 Glu Ala Ser Ile Leu Gln Ser
 1 5

 <210> 59
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

 <400> 59
 Glu Lys Cys Asn Ser Thr Pro Arg Thr
 1 5

 <210> 60
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

 <220>

<221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 60
 Asn Tyr Asp Ile Asn
 1 5

<210> 61
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 61
 Trp Met Asn Pro Ser Ser Gly Arg Thr Gly Tyr Ala Pro Lys Phe Arg
 1 5 10 15

Gly

<210> 62
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 62
 Gly Gly Gly Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Asn Tyr His Ile Ser Gly Leu
 1 5 10 15

Asp Val

<210> 63
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 63

Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ala Ile Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 64

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 64

Gly Val Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 65

<211> 10

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 65

Gln Leu Tyr Thr Ser Ser Arg Ala Leu Thr
1 5 10

<210> 66

<211> 5

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 66

Ala Tyr Ala Met Asn
1 5

<210> 67

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 67
 Ser Ile Thr Lys Asn Ser Asp Ser Leu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 68
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 68
 Leu Ala Ala Arg Ile Met Ala Thr Asp Tyr
 1 5 10

<210> 69
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 69
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Gly Leu Gly
 1 5 10

<210> 70
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 70
 Pro Ala Ser Thr Leu Glu Ser
 1 5

<210> 71
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 71
 Leu Gln Asp His Asn Tyr Pro Pro Thr
 1 5

<210> 72
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 72
 Tyr Tyr Ser Met Ile
 1 5

<210> 73
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 73
 Ser Ile Asp Ser Ser Ser Arg Tyr Leu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 74
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 74
 Asp Gly Asp Asp Ile Leu Ser Val Tyr Arg Gly Ser Gly Arg Pro Phe
 1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 75
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 75
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Gly Leu Gly
 1 5 10

<210> 76
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 76
 Pro Ala Ser Thr Leu Glu Ser
 1 5

<210> 77

<211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 77
 Leu Gln Asp His Asn Tyr Pro Pro Ser
 1 5

<210> 78
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 78
 Tyr Tyr Ser Met Ile
 1 5

<210> 79
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 79
 Ser Ile Asp Ser Ser Ser Arg Tyr Arg Tyr Tyr Thr Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 80
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"
 <400> 80
 Asp Gly Asp Asp Ile Leu Ser Val Tyr Gln Gly Ser Gly Arg Pro Phe
 1 5 10 15

Asp Tyr

<210> 81
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 81
 Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Thr Asn Val Ala
 1 5 10

<210> 82
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 82
 Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ser
 1 5

<210> 83
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 83

Leu Gln Tyr Asn Thr Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 84
<211> 5
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 84
Thr Asn Asp Met Ser
1 5

<210> 85
<211> 17
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 85
Thr Ile Ile Gly Ile Asp Asp Thr Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 86
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 86
Asn Ser Gly Ile Tyr Ser Phe
1 5

<210> 87

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 87
 Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Ser Leu Ala
 1 5 10

<210> 88
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 88
 Ala Thr Ser Thr Leu Gln Ser
 1 5

<210> 89
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 89
 Gln Gln Leu Asn Asn Tyr Val His Ser
 1 5

<210> 90
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 90
 Asp Tyr Ala Met Gly
 1 5

<210> 91
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 91
 Val Val Thr Gly His Ser Tyr Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 92
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 92
 Arg Ile Trp Ser Tyr Gly Asp Asp Ser Phe Asp Val
 1 5 10

<210> 93
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 93
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Asp Arg Leu Ala
 1 5 10

<210> 94
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 94
 Trp Ala Ser Asn Leu Glu Gly
 1 5

<210> 95
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 95
 Gln Gln Tyr Lys Ser Gln Trp Ser
 1 5

<210> 96
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 96
 Ser Tyr Ala Met Asn
 1 5

<210> 97
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 97

Tyr Ile Ser Ser Ile Glu Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
1 5 10 15

<210> 98

<211> 13

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 98

Asp Arg Leu Val Asp Val Pro Leu Ser Ser Pro Asn Ser
1 5 10

<210> 99

<211> 17

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 99

Lys Ser Ser Gln Ser Ile Phe Arg Thr Ser Arg Asn Lys Asn Leu Leu
1 5 10 15

Asn

<210> 100

<211> 7

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 100

Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser
1 5

<210> 101
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 101
 Gln Gln Tyr Phe Ser Pro Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 102
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 102
 Ser Phe Trp Met His
 1 5

<210> 103
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 103
 Phe Thr Asn Asn Glu Gly Thr Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val Arg
 1 5 10 15

Gly

<210> 104
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 104
 Gly Asp Gly Gly Leu Asp Asp
 1 5

<210> 105
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 105
 Arg Ala Ser Gln Phe Thr Asn His Tyr Leu Asn
 1 5 10

<210> 106
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 106
 Val Ala Ser Asn Leu Gln Ser
 1 5

<210> 107
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 107
 Gln Gln Ser Tyr Arg Thr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 108
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 108
 Ser Gly Tyr Tyr Asn
 1 5

<210> 109
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 109
 Tyr Ile Leu Ser Gly Ala His Thr Asp Ile Lys Ala Ser Leu Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 110
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 110
 Ser Gly Val Tyr Ser Lys Tyr Ser Leu Asp Val
 1 5 10

<210> 111
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 111

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

Asp Asp Phe Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Ser Phe
85 90 95

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

<210> 112

<211> 124

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 1

<223> Xaa = Gln або Glu

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 2

<223> Xaa = Met або Ile або Val

<400> 112

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

<210> 113
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний
 поліпептид"

<400> 113
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ile Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

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

Asp Asp Phe Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Ser Phe
 85 90 95

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

	100		105		110	
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro
	115					120
Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser
				125		Gly
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu
	130					135
Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg
				140		Glu
Ala						
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp
	145					150
Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn
			155			160
Ser	Gln					
Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp
				165		170
Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser
						175
Leu	Ser					
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys
			180			185
Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys
						190
Val	Tyr					
Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln
	195					200
Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr
						205
Lys	Ser					
Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	
	210					

<210> 114
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 114
 Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Met Asn Ala Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Gly Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Ser Ile Leu Val Arg Gly Ala Leu Gly Arg Tyr Phe Asp
 100 105 110
 Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
 115 120 125
 Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly
450

<210> 115

<211> 214

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 115

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

Asp Asp Phe Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Ser Phe
85 90 95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 116
<211> 453
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<220>
<221> ВАРИАНТ
<222> 2
<223> Xaa = Met або Ile або Val

<400> 116
Glu Xaa Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Ser Tyr
20 25 30
Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
35 40 45
Gly Trp Met Asn Ala Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Gly Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Ser Ile Leu Val Arg Gly Ala Leu Gly Arg Tyr Phe Asp
100 105 110
Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
210 215 220

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

<210> 117

<211> 453

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<220>

<221> ВАРИАНТ

<222> 2

<223> Xaa = Met або Ile або Val

<400> 117

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

[illegible]

<210> 118
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 118
 Gly Glu Gly Gly Leu Asp Asp
 1 5

<210> 119
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 119
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Phe Arg Thr
 20 25 30

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

Pro Pro Arg Leu Leu Ile His Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

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

Tyr Phe Ser Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys

<210> 120
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний
 поліпептид"

<400> 120
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

Ser Phe Thr Asn Asn Glu Gly Thr Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Asp Gly Gly Leu Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 121
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 121

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Phe Arg Thr
20 25 30

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

Pro Pro Arg Leu Leu Ile His Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Tyr Phe Ser Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

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

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

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

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser

195 200 205

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 122
<211> 445
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 122
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Phe Thr Asn Asn Glu Gly Thr Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Glu Gly Gly Leu Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	145	150	155	160
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	165	170	175	
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	180	185	190	
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	195	200	205	
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	210	215	220	
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	225	230	235	240
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	245	250	255	
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	260	265	270	
Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	275	280	285	
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	290	295	300	
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	305	310	315	320
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	325	330	335	
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	340	345	350	
Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	355	360	365	

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

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

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

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

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

<210> 123

<211> 220

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний
поліпептид"

<400> 123

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Phe Arg Thr
20 25 30

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

Pro Pro Arg Leu Leu Ile His Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Thr Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln

```

                        85                      90                      95
Tyr Phe Ser Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
      100                      105                      110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
      115                      120                      125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
      130                      135                      140
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
145                      150                      155                      160
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
      165                      170                      175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
      180                      185                      190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
      195                      200                      205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210                      215                      220

<210> 124
<211> 444
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний
      поліпептид"

<400> 124
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1                      5                      10                      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ser Phe
      20                      25                      30

```

Trp Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Ile
 35 40 45
 Ser Phe Thr Asn Asn Glu Gly Thr Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Arg Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Glu Met Asn Asn Leu Arg Gly Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Glu Gly Gly Leu Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

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

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

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

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

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

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

Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

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

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

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

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

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

<210> 125

<211> 10

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Lys(TAMRA)

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Lys(флуоресцеїн)

<400> 125
 Lys Gly Gly Ala Phe Ala Gly Gly Gly Lys
 1 5 10

<210> 126
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 126
 Gly Gly Ala Phe Ala Gly Gly Gly
 1 5

<210> 127
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 127
 Gln Met Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Ser Cys Ser Val Ser Gly Ala Ser Ala Ser Ser Gly
 20 25 30

Tyr Tyr Asn Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Gly Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Ala Tyr Ile Leu Ser Gly Ala His Thr Asp Ile Lys Ala Ser Leu Gly
 50 55 60
 Ser Arg Val Ala Val Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Thr Leu
 65 70 75 80
 Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ser Gly Val Tyr Ser Lys Tyr Ser Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
 Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
 Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160
 Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175
 Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 128

<211> 4

<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 128
Leu Ala Phe Gly
1

<210> 129
<211> 6
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Ile(me)

<400> 129
Gly Pro Ile Leu Phe Phe
1 5

<210> 130
<211> 6
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 130
Gly Pro Ile Leu Phe Phe
1 5

<210> 131
<211> 5
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 131
 Gly Gly Ala Phe Ala
 1 5

<210> 132
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(6)
 <223> Будь-яка аміно кислота

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> DPA

<400> 132
 Gly Gly Gly Хаа Хаа Хаа Gly Gly Хаа Lys Lys
 1 5 10

<210> 133
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 133
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

Ser Val Val Thr Gly His Ser Tyr Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

[illegible]

<210> 134
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 134
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

Ser Tyr Ile Ser Ser Ile Glu Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

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

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

Arg Asp Arg Leu Val Asp Val Pro Leu Ser Ser Pro Asn Ser Trp Gly
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly
450

<210> 135
<211> 5
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 135
Leu Ala Phe Gly Ala
1 5

<210> 136
<211> 5
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 136
Leu Ala Phe Ala Ala
1 5

<210> 137
<211> 446
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 137

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

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

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

Ser Phe Thr Asn Asn Glu Gly Thr Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Asp Gly Gly Leu Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

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

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

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

	405		410		415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His					
	420		425		430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys					
	435		440		445
<210> 138					
<211> 445					
<212> PRT					
<213> Штучна Послідовність					
<220>					
<221> джерело					
<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"					
<400> 138					
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly					
1	5		10		15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ser Phe					
	20		25		30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Ile					
	35		40		45
Ser Phe Thr Asn Asn Glu Gly Thr Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val					
	50		55		60
Arg Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr					
	65		70		75
Leu Glu Met Asn Asn Leu Arg Gly Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
	85		90		95
Ala Arg Gly Asp Gly Gly Leu Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val					
	100		105		110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala					
	115		120		125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

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

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

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

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

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

<210> 139

<211> 453

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 139

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Met Asn Ala Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Gly Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65				70				75				80				
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ala	Arg	Ser	Ser	Ile	Leu	Val	Arg	Gly	Ala	Leu	Gly	Arg	Tyr	Phe	Asp	
				100					105					110		
Leu	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Cys	Ser	Thr	Lys	
				115					120					125		
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	
				130					135					140		
Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	
				145					150					155		
Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	
				165					170					175		
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	
				180					185					190		
Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	
				195					200					205		
Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	
				210					215					220		
Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	
				225					230					235		
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	
				245					250					255		
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	
				260					265					270		
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	
				275					280					285		

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly
450

<210> 140

<211> 453

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 140

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Met Asn Ala Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Gly Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Ser Ile Leu Val Arg Gly Ala Leu Gly Arg Tyr Phe Asp
100 105 110

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly
450

<210> 141
<211> 453
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний
поліпептид"

<400> 141
Glu Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Met Asn Ala Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Gly Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Ser Ile Leu Val Arg Gly Ala Leu Gly Arg Tyr Phe Asp
100 105 110

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys
115 120 125

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

130		135		140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro				
145		150		160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr				
	165		170	175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val				
	180		185	190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn				
	195		200	205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro				
	210		215	220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu				
225		230		240
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp				
	245		250	255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp				
	260		265	270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly				
	275		280	285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn				
	290		295	300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp				
305		310		320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro				
	325		330	335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu				
	340		345	350

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly
450

<210> 142

<211> 453

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 142

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Met Asn Ala Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Gly Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Ser Ile Leu Val Arg Gly Ala Leu Gly Arg Tyr Phe Asp
100 105 110

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly
450

<210> 143

<211> 453

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 143

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Met Asn Ala Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Gly Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Ser Ile Leu Val Arg Gly Ala Leu Gly Arg Tyr Phe Asp
100 105 110

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys
115 120 125

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

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

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

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

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn

195	200	205																	
Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro				
210						215					220								
Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu				
225					230					235					240				
Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp				
				245					250						255				
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp				
			260					265						270					
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly				
		275					280						285						
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn				
	290					295					300								
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp				
305					310					315					320				
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro				
				325					330					335					
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu				
			340					345						350					
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn				
		355					360					365							
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile				
	370					375					380								
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr				
385					390					395					400				
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys				
				405					410					415					

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly
450

<210> 144

<211> 453

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний
поліпептид"

<400> 144

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Ser Tyr
20 25 30

Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Met Asn Ala Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Gly Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Ser Ile Leu Val Arg Gly Ala Leu Gly Arg Tyr Phe Asp
100 105 110

Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 130 135 140
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 145 150 155 160
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 165 170 175
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 180 185 190
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 195 200 205
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 210 215 220
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 225 230 235 240
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 245 250 255
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 260 265 270
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 275 280 285
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 305 310 315 320
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 325 330 335

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Ser Pro Gly
450

<210> 145

<211> 220

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний
поліпептид"

<400> 145

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Phe Arg Thr
20 25 30

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

Pro Pro Arg Leu Leu Ile His Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Phe Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

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

Tyr Phe Ser Pro Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
115 120 125

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
130 135 140

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

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

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

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

Ser Pro Cys Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215 220

<210> 146

<211> 445

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 146

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

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

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

Ser Phe Thr Asn Asn Glu Gly Thr Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Asp Gly Gly Leu Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

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

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

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

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

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

<210> 147

<211> 445

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 147

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

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

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

Ser Phe Thr Asn Asn Glu Gly Thr Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Glu Gly Gly Leu Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

145		150		155		160									
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser
				165					170					175	
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu
			180					185					190		
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr
		195					200					205			
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr
	210					215					220				
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
225					230					235					240
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro
				245					250					255	
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val
			260					265					270		
Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr
		275					280					285			
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
	290					295					300				
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys
305					310					315					320
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser
				325					330					335	
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro
			340					345					350		
Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val
		355					360					365			

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

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

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

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

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

<210> 148

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 148

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

330

<210> 149

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 149

Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 150
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 150
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

```

          35              40              45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50              55              60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65              70              75              80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
              85              90              95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          100              105

<210> 151
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 151
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1              5              10              15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
          20              25              30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
          35              40              45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50              55              60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65              70              75              80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
          85              90              95

Pro Cys Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          100              105

<210> 152

```

<211> 42
 <212> ДНК
 <213> Штучна Послідовність

 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний
 олігонуклеотид"

 <400> 152
 cccagactgc accagctgga tctctgaatg tactccagtt gc 42

 <210> 153
 <211> 41
 <212> ДНК
 <213> Штучна Послідовність

 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний
 олігонуклеотид"

 <400> 153
 ccagactgca ccagctgcac ctctgaatgt actccagttg c 41

 <210> 154
 <211> 61
 <212> ДНК
 <213> Штучна Послідовність

 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний
 олігонуклеотид"

 <400> 154
 ccagggttcc ctggccccaw tmgtaagtc caccwkcacc tcttgacacag taatagacag 60
 c 61

 <210> 155
 <211> 52
 <212> ДНК
 <213> Штучна Послідовність

 <220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний
 олігонуклеотид"

 <400> 155

cctggcccca gtcgtcaagt cctccttcac ctcttgcaca gtaatagaca gc

52

<210> 156

<211> 116

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 156

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

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

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

Ser Phe Thr Asn Asn Glu Gly Thr Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Glu Gly Gly Leu Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 157

<211> 445

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний

поліпептид"

<400> 157

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

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

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

Ser Phe Thr Asn Asn Glu Gly Thr Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Glu Gly Gly Leu Asp Asp Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

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

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

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

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His

420	425	430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
435	440	445
<210> 158		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> Штучна Послідовність		
<220>		
<221> джерело		
<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"		
<400> 158		
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ile Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Ile Ser Gly Trp		
20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Ala Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile		
35	40	45
Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
65	70	75 80
Asp Asp Phe Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Ser Phe		
85	90	95
Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 159
<211> 215
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний
поліпептид"

<400> 159
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

Ser Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu
35 40 45

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys His Lys Tyr Gly Ser Gly Pro
85 90 95

Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 160

<211> 215

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 160

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

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

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

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

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

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

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

Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125

Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140

Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 161

<211> 214

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний

поліпептид"

<400> 161

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Leu Asp Ile Thr Asn His
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Glu Lys Cys Asn Ser Thr Pro Arg
 85 90 95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 162
<211> 216
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 162
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Glu Pro Gly Arg Ala Pro Thr Leu Leu
35 40 45

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

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

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

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

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
115 120 125

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

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

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
165 170 175

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

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

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 163
<211> 214
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний
поліпептид"

<400> 163
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp His Asn Tyr Pro Pro
85 90 95

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

100	105	110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
115	120	125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
130	135	140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
145	150	155 160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
180	185	190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
195	200	205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210		

<210> 164
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 164
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp His Asn Tyr Pro Pro
85 90 95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 165

<211> 214

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 165

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

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

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

Ser Gly Ala Ser Thr Arg Ala Ser Gly Ala Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Thr Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

```

<210> 166
<211> 214
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний
        поліпептид"

<400> 166
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1          5          10          15

Asp Arg Val Thr Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ser Ser
          20          25          30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Asn Asn Tyr Val His
          85          90          95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
          115          120          125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
          130          135          140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145          150          155          160

```

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 167

<211> 213

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 167

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

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

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

Tyr Trp Ala Ser Asn Leu Glu Gly Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Thr Gly Ser Gly Thr Glu Phe Ala Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Leu Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Ser Gln Trp Ser
85 90 95

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

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

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

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 168

<211> 214

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 168

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Phe Thr Asn His Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Thr Phe Gly Gln Gly Ser Arg Leu Glu Met Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 169

<211> 453

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний
поліпептид"

<400> 169

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Ser Tyr	20	25	30
Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met	35	40	45
Gly Trp Met Asn Ala Asn Ser Gly Asn Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe	50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Gly Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr	65	70	75
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys	85	90	95
Ala Gly Ser Ser Ile Leu Val Arg Gly Ala Leu Gly Arg Tyr Phe Asp	100	105	110
Leu Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys	115	120	125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly	130	135	140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro	145	150	155
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr	165	170	175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val	180	185	190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn	195	200	205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro	210	215	220

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

435

440

445

Ser Leu Ser Pro Gly
450

<210> 170

<211> 448

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний
поліпептид"

<400> 170

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

Ser Leu Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Ile Ile Asn Tyr
20 25 30

Asp Phe Ile Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Pro Glu Trp Met
35 40 45

Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Tyr Asn Thr Gly Tyr Gly Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Trp Asp Ser Ser Met Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Ala Val Arg Gly Gln Leu Leu Ser Glu Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

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

Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155	160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	195	200	205	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	210	215	220	
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	225	230	235	240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	245	250	255	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	260	265	270	
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	275	280	285	
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	290	295	300	
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	305	310	315	320
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	325	330	335	
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	340	345	350	
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	355	360	365	

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

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

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

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

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

<210> 171

<211> 455

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний
поліпептид"

<400> 171

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

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

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

Gly Trp Met Asn Pro Asn Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Arg Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Leu Thr Met Thr Lys Asn Thr Ser Ile Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85										90					95															
Ala	Thr	Glu	Arg	Trp	Ser	Lys	Asp	Thr	Gly	His	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly															
			100					105					110																	
Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser															
		115					120					125																		
Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr															
		130				135					140																			
Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro															
145					150					155					160															
Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val															
				165					170					175																
His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser															
			180					185					190																	
Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile															
		195					200					205																		
Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val															
		210				215					220																			
Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala															
225					230					235					240															
Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro															
				245					250					255																
Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val															
			260					265					270																	
Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val															
		275					280					285																		
Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln															
	290					295					300																			

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

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

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

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr
355 360 365

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

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
385 390 395 400

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

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

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

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455

<210> 172

<211> 456

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 172

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Ala Ser Gly Tyr Thr Val Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Asp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Met Asn Pro Ser Ser Gly Arg Thr Gly Tyr Ala Pro Lys Phe
 50 55 60
 Arg Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Ser Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Gly Tyr Tyr Asp Ser Ser Gly Asn Tyr His Ile Ser
 100 105 110
 Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120 125
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 130 135 140
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 145 150 155 160
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 165 170 175
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 180 185 190
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 195 200 205
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 210 215 220

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455

<210> 173

<211> 448

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 173

Gln Ile Thr Leu Lys Glu Ser Gly Gly Gly Leu Ile Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

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

Ser Ser Ile Thr Lys Asn Ser Asp Ser Leu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Thr Leu Ala Ala Arg Ile Met Ala Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

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

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

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

145		150		155		160									
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
				165					170					175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
			180					185					190		
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
		195					200					205			
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
	210					215					220				
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
225					230					235					240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
			245						250					255	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
			260					265					270		
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
		275					280					285			
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
	290					295					300				
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
305					310					315					320
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys
				325					330					335	
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
			340					345					350		
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr
			355				360					365			

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

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

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

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

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

<210> 174

<211> 456

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний
поліпептид"

<400> 174

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

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

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

Ser Ser Ile Asp Ser Ser Ser Arg Tyr Leu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Asp Gly Asp Asp Ile Leu Ser Val Tyr Arg Gly Ser Gly Arg
100 105 110

Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120 125

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

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

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
165 170 175

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

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
195 200 205

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
210 215 220

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

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
245 250 255

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

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

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
290 295 300

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

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
325 330 335

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

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
355 360 365

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
385 390 395 400

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455

<210> 175

<211> 456

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 175

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Tyr Tyr
 20 25 30
 Ser Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Asp Ser Ser Ser Arg Tyr Arg Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Ser Ala Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asp Gly Asp Asp Ile Leu Ser Val Tyr Gln Gly Ser Gly Arg
 100 105 110
 Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120 125
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 130 135 140
 Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 145 150 155 160
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 165 170 175
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 180 185 190
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 195 200 205
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
 210 215 220
 Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
450 455

<210> 176

<211> 445

<212> PRT

<213> Штучна Послідовність

<220>

<221> джерело

<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний поліпептид"

<400> 176

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

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

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Gln Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ile Gly Ile Asp Asp Thr Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Val Lys Asn Ser Gly Ile Tyr Ser Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

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

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

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

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

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

<210> 177
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 177
Ala Arg Gly Asp Gly Gly Leu
1 5

<210> 178
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
<221> джерело
<223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 178
Ala Arg Gly Asp Ala Gly Leu
1 5

<210> 179
<211> 7
<212> PRT
<213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 179
 Ala Arg Gly Glu Gly Gly Leu
 1 5

<210> 180
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Штучна Послідовність

<220>
 <221> джерело
 <223> /примітка="Опис Штучної Послідовності: синтетичний пептид"

<400> 180
 Ala Arg Gly Ala Gly Gly Leu
 1 5

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Сполука кон'югата антитіло-антибіотик, що включає виділене моноклональне антитіло проти тейхоевих кислот клітинної стінки (WTA), причому анти-WTA моноклональне антитіло включає легкий (L) ланцюг і важкий (H) ланцюг, де: L ланцюг включає CDR L1, що включає послідовність KSSQSIFRTSRNKNLLN (SEQ ID NO: 99), CDR L2, що включає послідовність WASTRKS (SEQ ID NO: 100), і CDR L3, що включає послідовність QQYFSPPYT (SEQ ID NO: 101); і H ланцюг
- 10 включає CDR H1, що включає послідовність SFWMH (SEQ ID NO: 102), CDR H2, що включає послідовність FTNNEGTTTAYADSVRG (SEQ ID NO: 103), і CDR H3, що включає послідовність GEGGLDD (SEQ ID NO: 118), причому моноклональне антитіло проти тейхоевих кислот клітинної стінки зв'язується з *Staphylococcus aureus* і ковалентно приєднане до антибіотика типу рифаміцину за допомогою розщеплюваного протеазою пептидного лінкера.
- 15 2. Сполука кон'югата антитіло-антибіотик за п. 1, що містить анти-WTA моноклональне антитіло, яке включає варіабельну область важкого ланцюга (VH), де VH включає амінокислотну послідовність, що має щонайменше 95% ідентичність послідовності за довжиною послідовності VH SEQ ID NO: 156.
- 20 3. Сполука кон'югата антитіло-антибіотик за п. 1, що містить анти-WTA моноклональне антитіло, яке включає варіабельну область легкого ланцюга (VL), де VL включає амінокислотну послідовність, що має щонайменше 95% ідентичність послідовності за довжиною послідовності VL SEQ ID NO: 119.
- 25 4. Сполука кон'югата антитіло-антибіотик за п. 1, що містить анти-WTA моноклональне антитіло, яке включає варіабельну область легкого ланцюга (VL) і варіабельну область важкого ланцюга (VH), де VL включає послідовність SEQ ID NO: 119, а VH включає послідовність SEQ ID NO: 156.
5. Сполука кон'югата антитіло-антибіотик за п. 1, що містить анти-WTA моноклональне антитіло, яке включає легкий ланцюг (LC), причому LC включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 145, і важкий ланцюг (HC), причому HC включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 157.
- 30 6. Сполука кон'югата антитіло-антибіотик за будь-яким із пунктів 1-5, що містить анти-WTA моноклональне антитіло, де константна область важкого ланцюга включає амінокислотну заміну A118C і/або константна область легкого ланцюга включає амінокислотну заміну V205C, де нумерація наведена відповідно до нумерації EU.

7. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик, що включає моноклональне антитіло проти тейхоєвих кислот клітинної стінки (WTA), де анти-WTA антитіло включає легкий (L) ланцюг і важкий (H) ланцюг, де:

L ланцюг включає CDR L1, що включає послідовність KSSQSIFRTSRNKNLLN (SEQ ID NO: 99), CDR L2, що включає послідовність WASTRKS (SEQ ID NO: 100), і CDR L3, що включає послідовність QQYFSPPYT (SEQ ID NO: 101); і H ланцюг включає CDR H1, що включає послідовність SFWMH (SEQ ID NO: 102), CDR H2, що включає послідовність FTNNEGTTTAYADSVRG (SEQ ID NO: 103), і CDR H3, що включає послідовність GEGGLDD (SEQ ID NO: 118) або GDGGLDD (SEQ ID NO: 104), де моноклональне антитіло проти тейхоєвих кислот клітинної стінки зв'язується з *Staphylococcus aureus* і ковалентно приєднане до антибіотика типу рифаміцину за допомогою розщеплюваного протеазою пептидного лінкера.

8. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 7, де анти-WTA антитіло зв'язується з мітицилін-стійким *Staphylococcus aureus* (MRSA).

9. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за будь-яким із пунктів 7-8, де антибіотик типу рифаміцину являє собою антибіотик типу рифалазилу.

10. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за будь-яким із пунктів 7-9, де антибіотик типу рифаміцину включає четвертинний амін, приєднаний до пептидного лінкера.

11. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за будь-яким із пунктів 7-10, де пептидний лінкер приєднаний до цистеїну або введений методами генної інженерії цистеїну анти-WTA антитіла.

12. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за будь-яким із пунктів 7-11, де пептидний лінкер являє собою лінкер, розщеплюваний ендопептидазою *S. aureus* або цистеїновою протеазою.

13. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 12, де пептидний лінкер являє собою лінкер, розщеплюваний стафопаїном B або стафопаїном A.

14. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 12, де пептидний лінкер являє собою лінкер, розщеплюваний людською протеазою катепсином B.

15. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 14, де пептидний лінкер являє собою дипептидний лінкер val-cit.

16. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 7, що має формулу:

$Ab-(L-abx)_p$,

де:

Ab являє собою антитіло проти тейхоєвих кислот клітинної стінки;

L являє собою пептидний лінкер, що має формулу:

-Str-Pep-Y-,

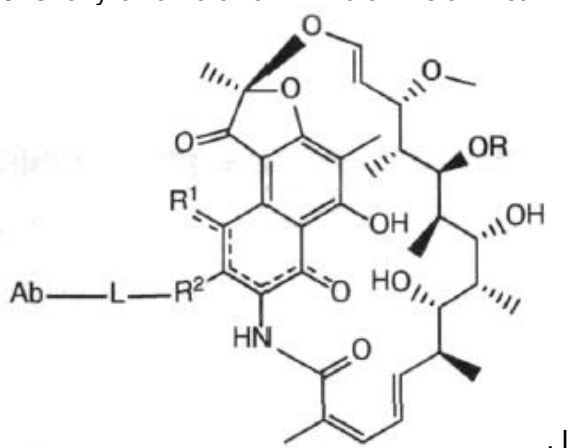
де Str являє собою сполучну частину; Pep являє собою пептид, що складається з двох-дванадцяти амінокислотних залишків, і Y являє собою спейсер:

abx являє собою антибіотик типу рифаміцину; і

p являє собою ціле число від 1 до 8.

17. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 16, де p являє собою від 2 до 4.

18. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 7, що має формулу I:



де:

пунктирні лінії означають необов'язковий зв'язок;

R являє собою H, C₁-C₁₂алкіл або C(O)CH₃;

R¹ являє собою OH;

R² являє собою CH=N-(гетероцикл), де гетероцикл необов'язково заміщений однією або декількома групами, незалежно вибраними з C(O)CH₃, C₁-C₁₂алкілу, C₁-C₁₂гетероарилу, C₂-C₂₀гетероциклілу, C₆-C₂₀арилу та C₃-C₁₂карбоциклілу;

або R^1 і R^2 утворюють п'яти- або шестичленний конденсований гетероарил або гетероцикліл, і необов'язково утворюють спірозчленоване або конденсоване шестичленне гетероарильне, гетероциклільне, арильне або карбоциклільне кільце, де спірозчленоване або конденсоване шестичленне гетероарильне, гетероциклільне, арильне або карбоциклільне кільце

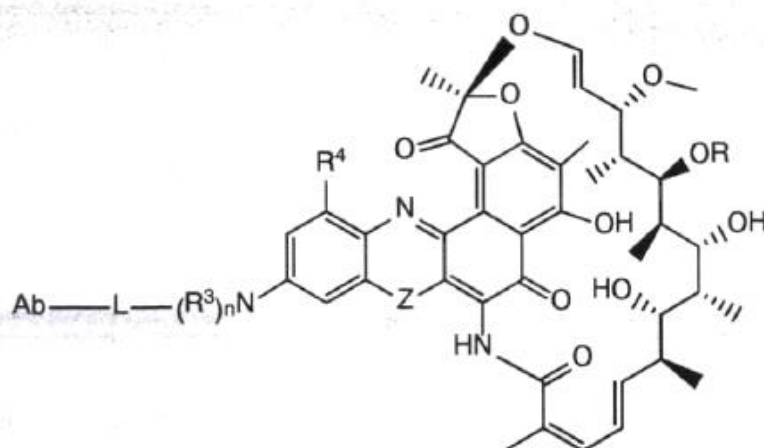
необов'язково заміщене H, F, Cl, Br, I, C_1 - C_{12} алкілом або OH;

L являє собою пептидний лінкер, приєднаний до R^2 або конденсованого гетероарила або гетероциклілу, утвореного R^1 і R^2 ; i

Ab являє собою антитіло проти тейхоевих кислот клітинної стінки (WTA).

19. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 18, де формула вибрана з групи, що складається з:

a)



де

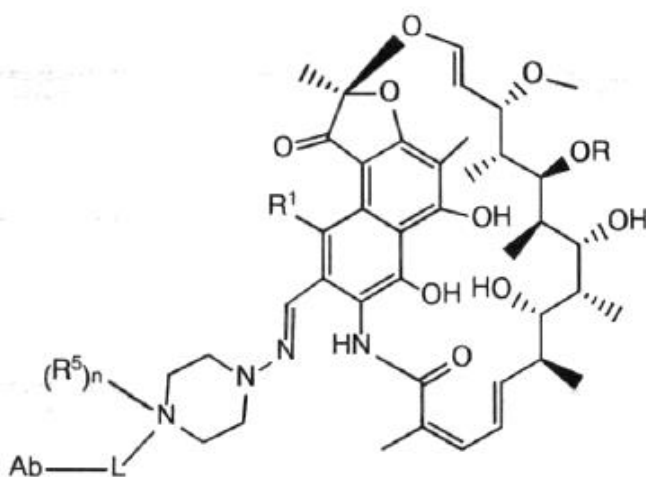
R^3 незалежно вибраний з H і C_1 - C_{12} алкілу;

n являє собою 1 або 2;

R^4 вибраний з H, F, Cl, Br, I, C_1 - C_{12} алкілу і OH; i

Z вибраний з NH, N(C_1 - C_{12} алкілу), O і S;

b)

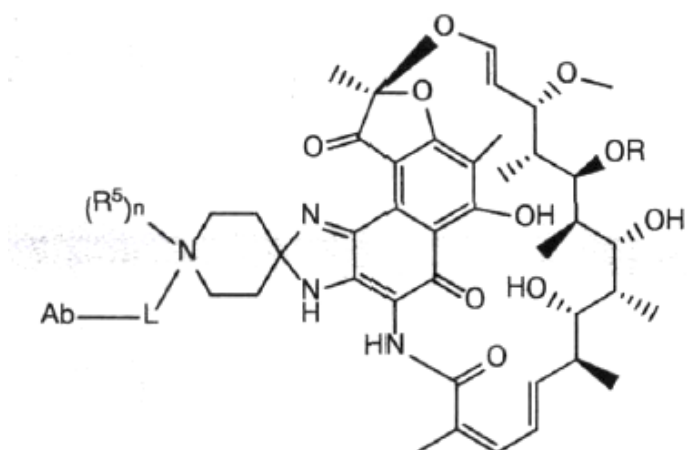


де

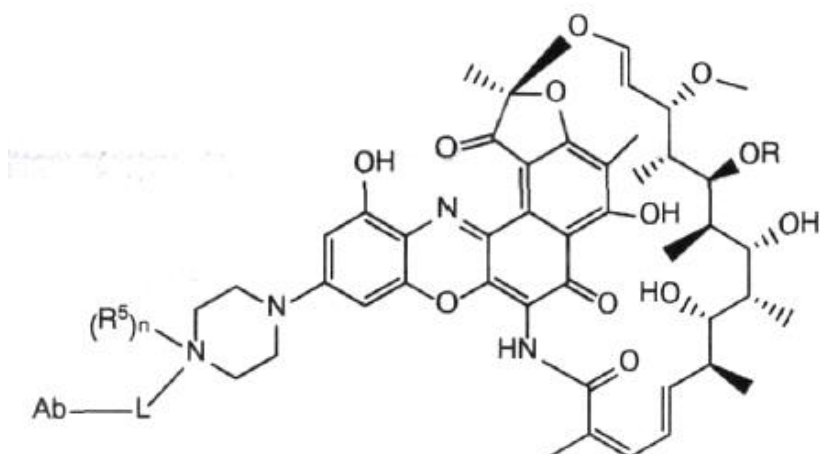
R^5 вибраний з H і C_1 - C_{12} алкілу; i

n являє собою 0 або 1;

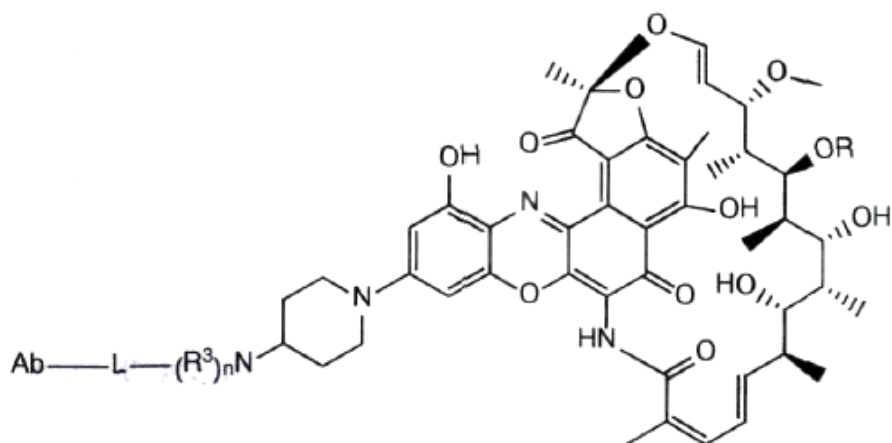
c)



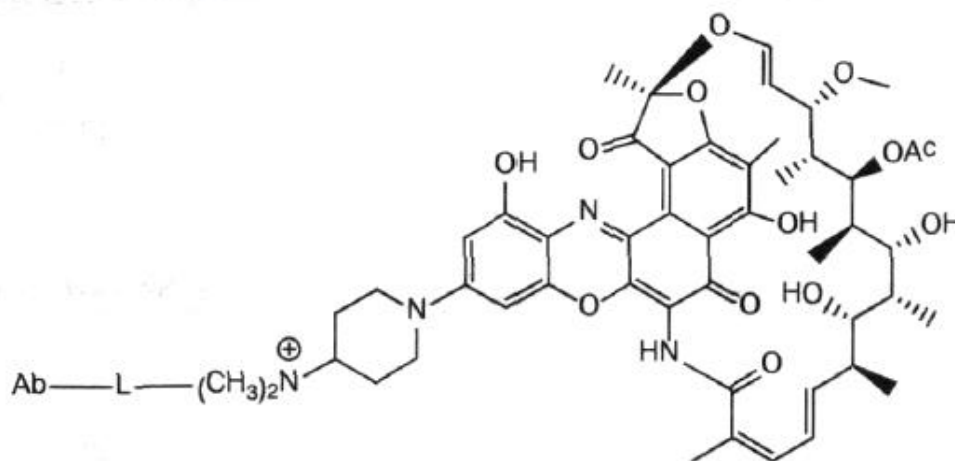
- де
 R^5 вибраний з Н і C_1 - C_{12} алкілу; і
 n являє собою 0 або 1;
 5 d)



- де
 R^5 незалежно вибраний з Н і C_1 - C_{12} алкілу; і
 n являє собою 0 або 1;
 10 e)



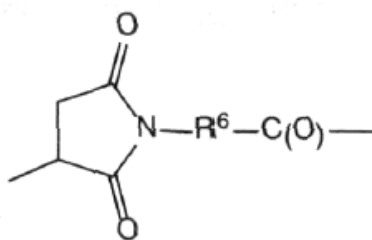
- де
 R^3 незалежно вибраний з Н і C_1 - C_{12} алкілу; і
 n являє собою 1 або 2; і
 15 f)



20. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 7, де пептидний лінкер має формулу:
-Str-Pep-Y-,

де Str являє собою сполучну частину, ковалентно приєднану до антитіла проти тейхоевих кислот клітинної стінки (WTA); Pep являє собою пептид, що складається з двох-дванадцяти амінокислотних залишків, і Y являє собою спейсер, ковалентно приєднаний до антибіотика типу рифаміцину.

21. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 20, де Str має формулу:



де R⁶ вибраний з групи, що складається з C₁-C₁₀алкілену-, -C₃-C₈карбоцикло-, -O-(C₁-C₈алкілу)-, -арилену-, -C₁-C₁₀алкіленарилену-, -арилен-C₁-C₁₀алкілену-, -C₁-C₁₀алкілен-(C₃-C₈карбоцикло)-, - (C₃-C₈карбоцикло)- C₁-C₁₀алкілену-, -C₃-C₈гетероцикло-, -C₁-C₁₀алкілен-(C₃-C₈гетероцикло)-, - (C₃-C₈гетероцикло)- C₁-C₁₀алкілену-, -(CH₂CH₂O)_r- і -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-; і r являє собою ціле число в діапазоні від 1 до 10.

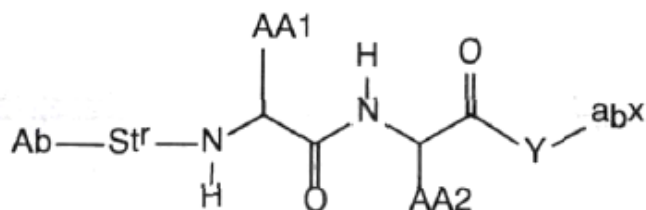
22. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 21, де R⁶ являє собою-(CH₂)₅-.

23. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 20, де Pep включає від двох до дванадцяти амінокислотних залишків, незалежно вибраних із гліцину, аланіну, фенілаланіну, лізину, аргініну, валіну та цитруліну.

24. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 23, де Pep вибраний з валін-цитруліну (val-cit, vc); фенілаланін-лізину (fk); GGAFAAGGG (SEQ ID NO: 126); tpm-cit; GPIImLFF (SEQ ID NO: 129); валін-цитрулін-фенілаланіну (val-cit-phe); GGAFA (SEQ ID NO: 131) і LAFG (SEQ ID NO: 128).

25. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 20, де Y включає пара-амінобензил або пара-амінобензилоксикарбоніл.

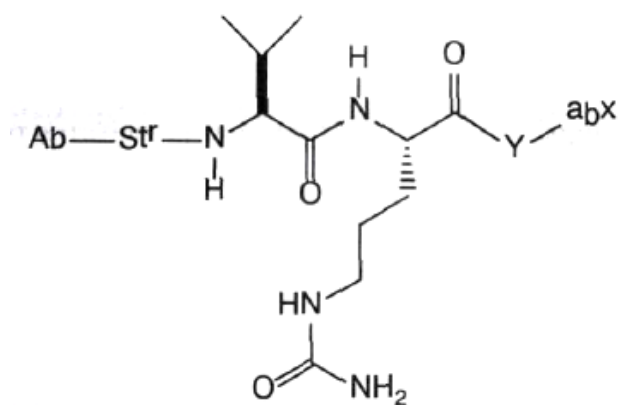
26. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 7, що має формулу:



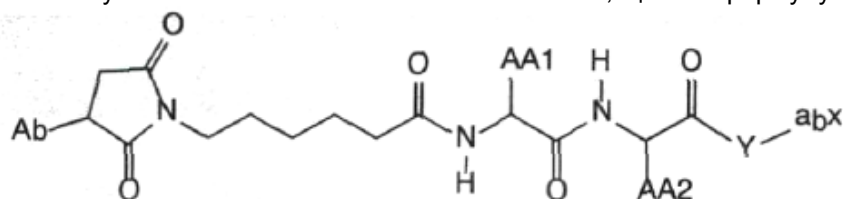
де AA1 і AA2 незалежно вибрані з бічних ланцюгів амінокислот.

27. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 26, де бічний ланцюг амінокислоти незалежно вибраний з H, -CH₃, -CH₂(C₆H₅), -CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂, -CH₂CH₂CH₂NHC(NH)NH₂, -CHCH(CH₃)CH₃ і -CH₂CH₂CH₂NHC(O)NH₂.

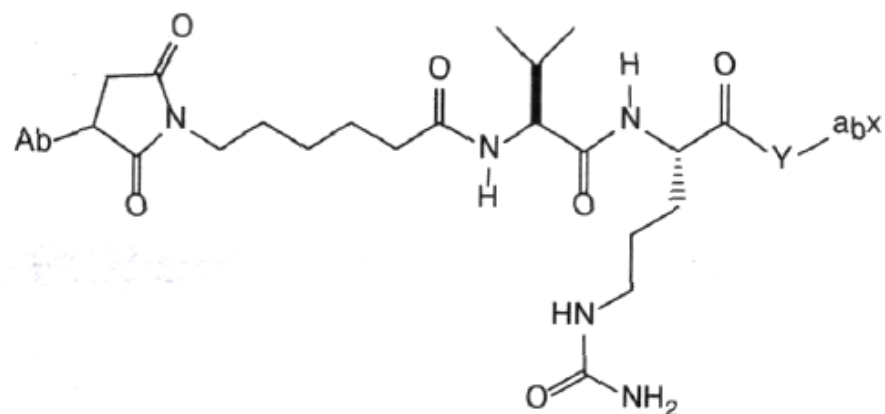
28. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 26, що має формулу:



29. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 26, що має формулу:

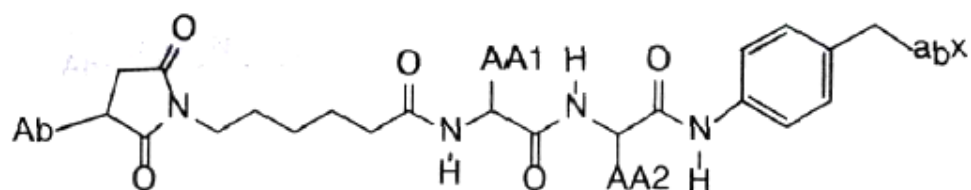


30. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 26, що має формулу:

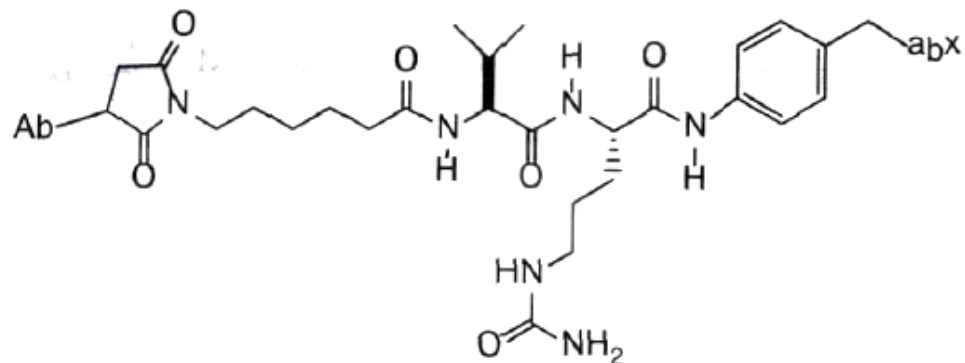


5

31. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 26, що має формулу:

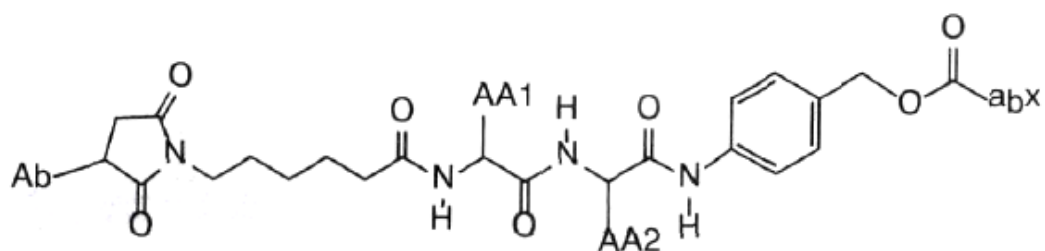


32. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 31, що має формулу:

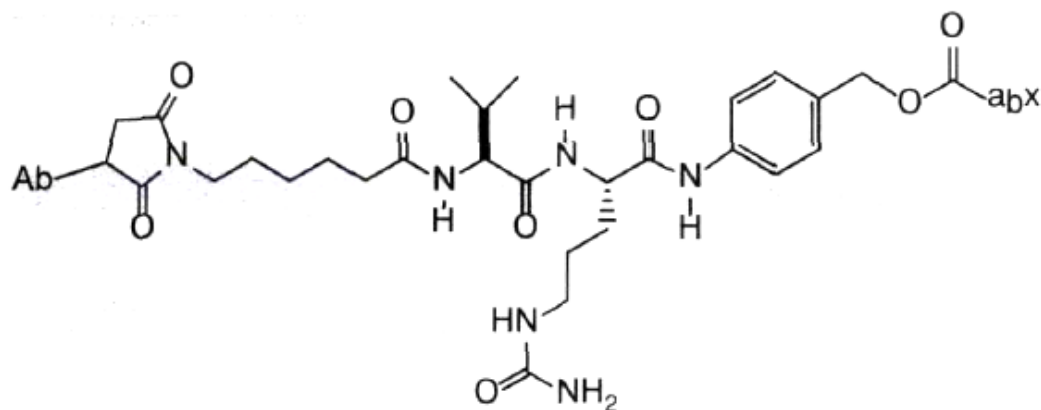


10

33. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 26, що має формулу:

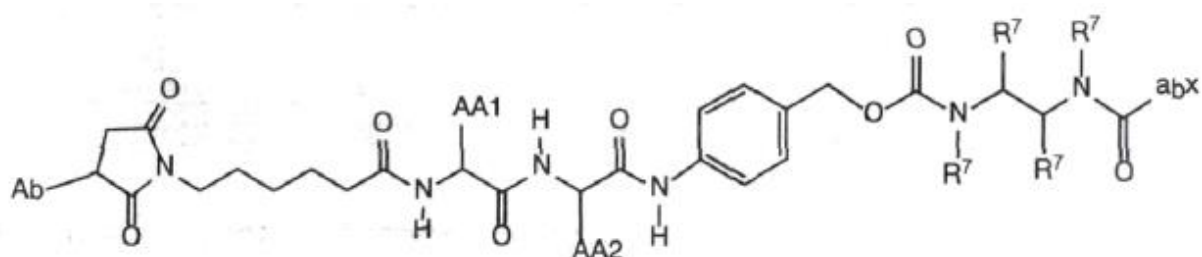


34. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 33, що має формулу:



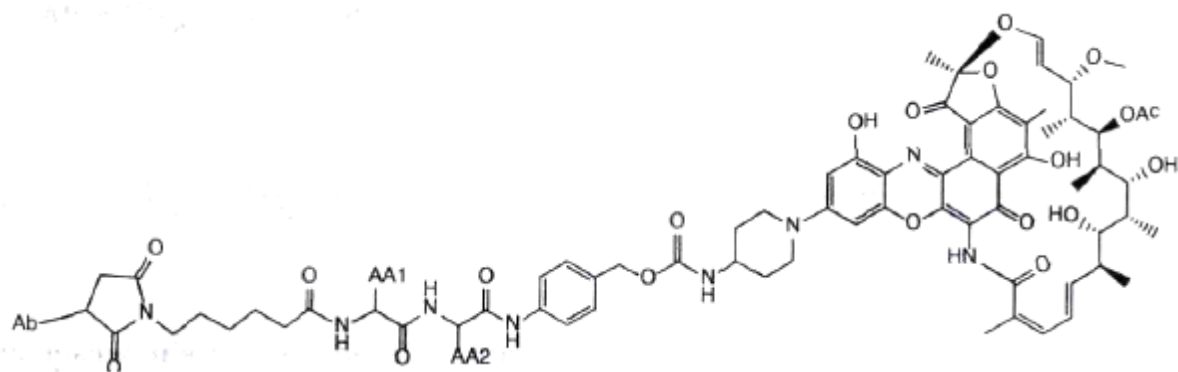
35. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 26, що має формулу:

5



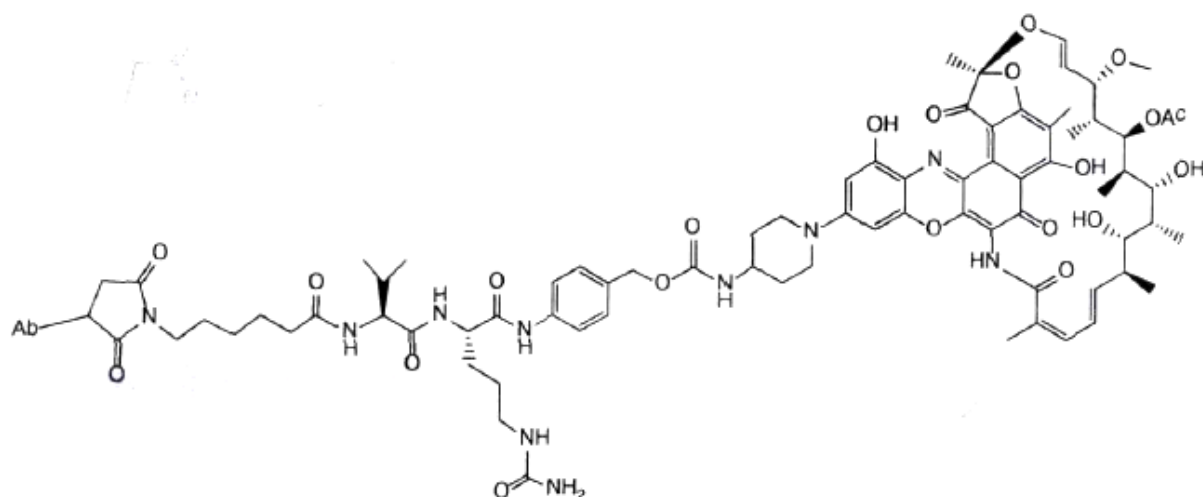
де R^7 незалежно вибраний з H і C_1 - C_{12} алкілу.

36. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 26, що має формулу:

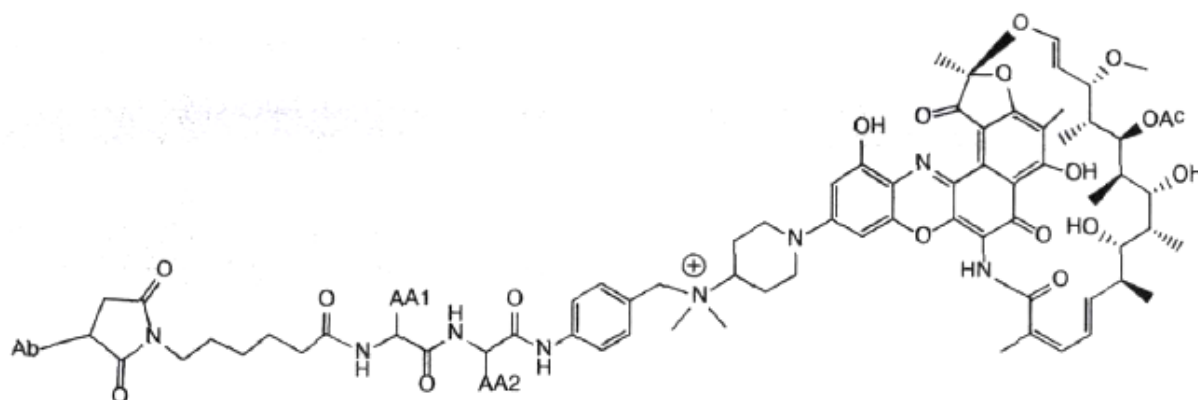


10

37. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 36, що має формулу:

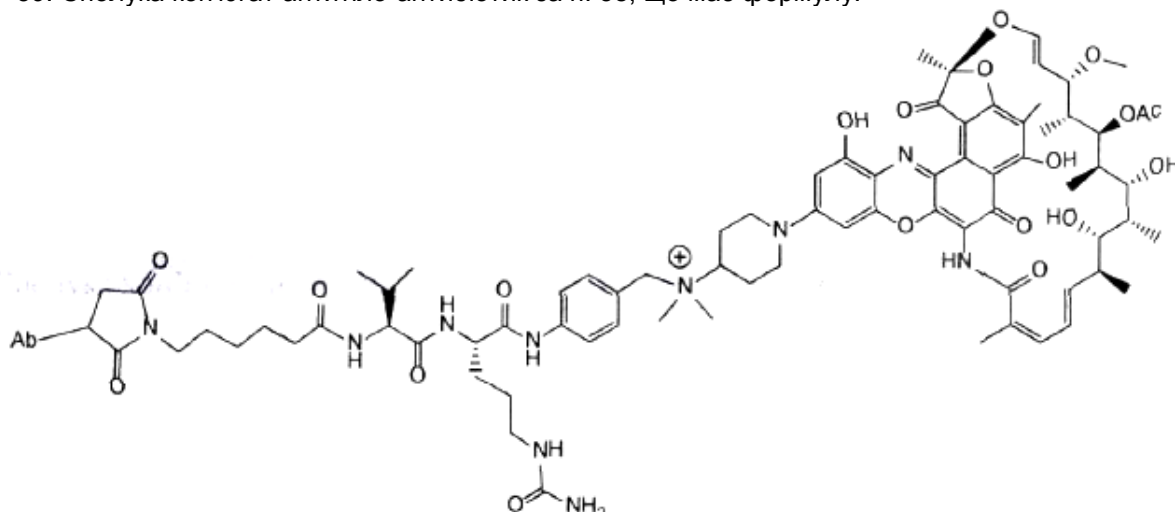


38. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 26, що має формулу:



5

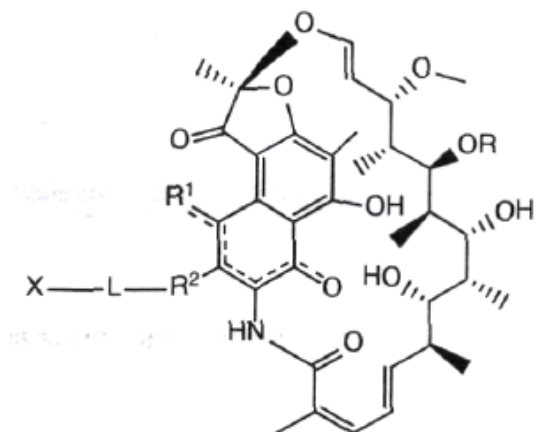
39. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 38, що має формулу:



де Ab являє собою анти-WTA антитіло, де анти-WTA антитіло включає легкий (L) ланцюг і важкий (H) ланцюг, де: L ланцюг включає CDR L1, що включає послідовність KSSQSIFRTSRNKNLLN (SEQ ID NO: 99), CDR L2, що включає послідовність WASTRKS (SEQ ID NO: 100), і CDR L3, що включає послідовність QQYFSPPYT (SEQ ID NO: 101); і H ланцюг включає CDR H1, що включає послідовність SFWMH (SEQ ID NO: 102), CDR H2, що включає послідовність FTNNEGTTTAYADSVRG (SEQ ID NO: 103), і CDR H3, що включає послідовність GEGGLDD (SEQ ID NO: 118) або GDGGLDD (SEQ ID NO: 104).

40. Фармацевтична композиція, яка включає сполуку кон'югат антитіло-антибіотик за будь-яким із пунктів 1-39 і фармацевтично прийнятний носій, глідант, розріджувач або ексципієнт.

41. Спосіб одержання сполуки кон'югат антитіло-антибіотик за будь-яким із пунктів 1-39, який включає кон'югування антибіотика типу рифаміцину з анти-WTA антитілом.
 42. Інтермедіат антибіотик-лінкер, що має формулу II:



де:

пунктирні лінії означають необов'язковий зв'язок;

R являє собою H, C₁-C₁₂алкіл або C(O)CH₃;

R¹ являє собою OH;

R² являє собою CH=N-(гетероцикл), де гетероцикл необов'язково заміщений однією або декількома групами, незалежно вибраними з C(O)CH₃, C₁-C₁₂алкілу, C₁-C₁₂гетероарилу, C₂-C₂₀гетероциклілу, C₆-C₂₀арилу та C₃-C₁₂карбоциклілу;

або R¹ і R² утворюють п'яти- або шестичленний конденсований гетероарил або гетероцикл, і необов'язково утворюють спірозчленоване або конденсоване шестичленне гетероарильне, гетероциклільне, арильне або карбоциклільне кільце, де спірозчленоване або конденсоване шестичленне гетероарильне, гетероциклільне, арильне або карбоциклільне кільце, необов'язково заміщене H, F, Cl, Br, I, C₁-C₁₂алкілом або OH;

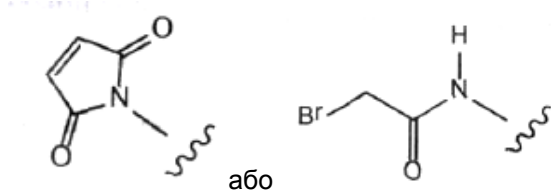
L являє собою пептидний лінкер, приєднаний до R² або конденсованого гетероарилу або гетероциклілу, утворених R¹ і R²; і має формулу:

-Str-Pep-Y-,

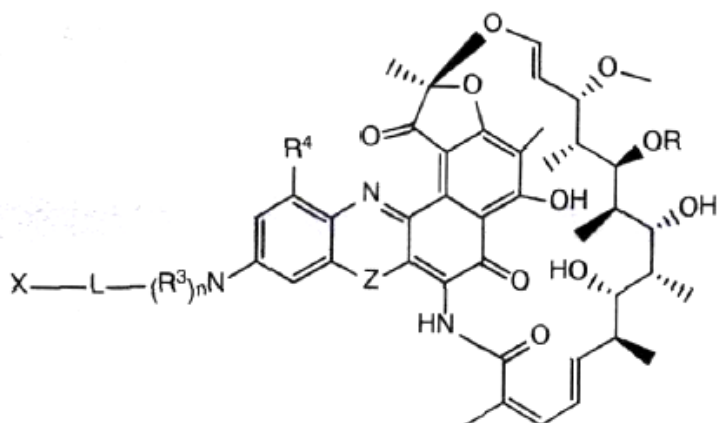
де Str являє собою сполучну частину; Pep являє собою пептид, що складається з двох-дванадцяти амінокислотних залишків; і Y являє собою спейсер; і

X являє собою реакційноздатну функціональну групу, вибрану з малеїміду, тіолу, аміно, броміду, бромацетамідо, йодацетамідо, п-толуолсульфонату, йодиду, гідроксилу, карбоксилу, піридилдисульфіді та N-гідроксисукциніміді.

43. Інтермедіат антибіотик-лінкер за п. 42, де X являє собою:



44. Інтермедіат антибіотик-лінкер за п. 42, що має формулу:



де

R^3 незалежно вибраний з H і C_1 - C_{12} алкілу;

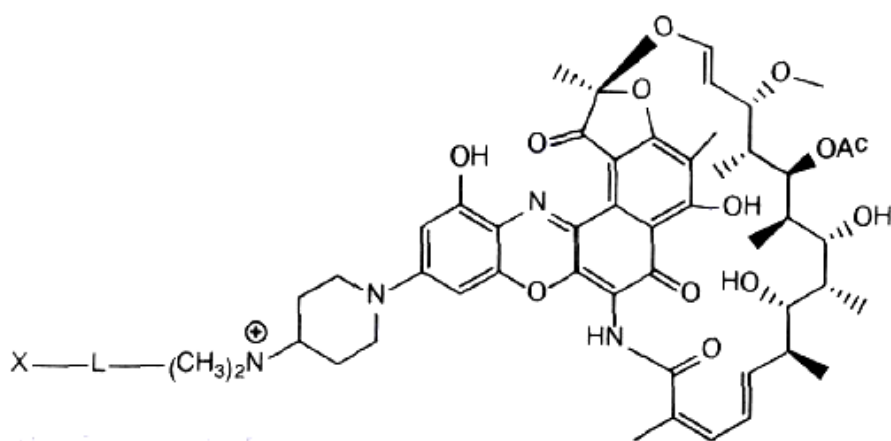
n являє собою 1 або 2;

5 R^4 вибраний з H, F, Cl, Br, I, C_1 - C_{12} алкілу і OH; і

Z вибраний з NH, N(C_1 - C_{12} алкілу), O і S.

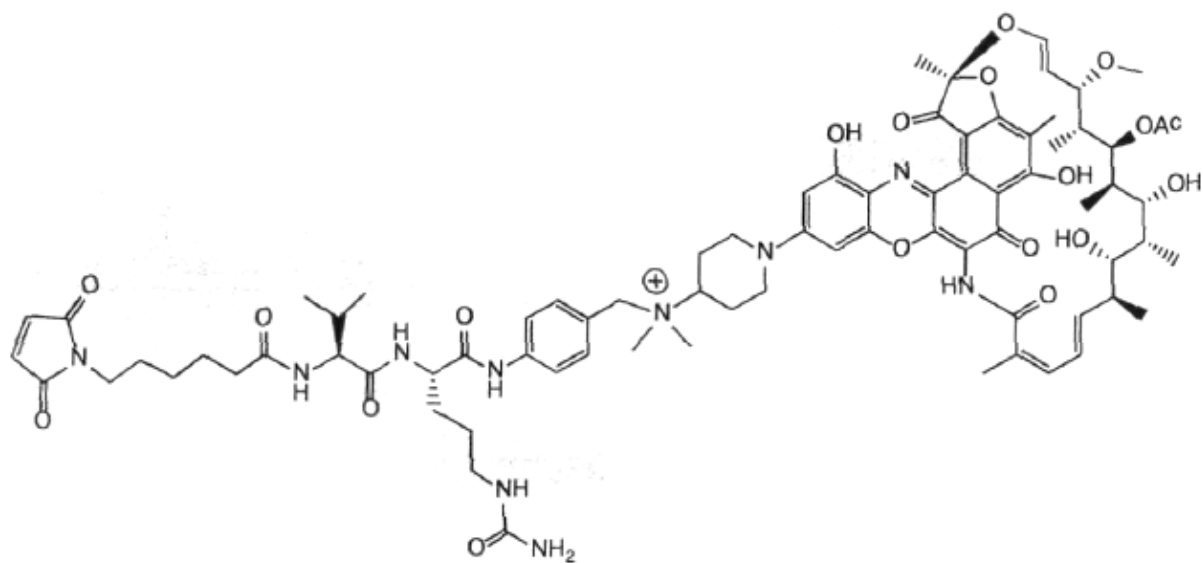
45. Інтермедіат антибіотик-лінкер за п. 44, що має формулу, вибрану з групи, що складається з:

a)



10

b)



46. Спосіб знищення внутрішньоклітинного *Staphylococcus aureus* у клітинах-хазяїнах пацієнта, інфікованого *Staphylococcus aureus*, без знищення клітин-хазяїнів, який включає введення сполуки кон'югата анти-WTA-антибіотика за будь-яким із пунктів 1-39.

47. Спосіб за п. 46, де знищуються персистуючі бактеріальні клітини.

5 48. Спосіб за п. 46 або п. 47, який додатково включає введення другого терапевтичного агента.

49. Спосіб за п. 48, де другим терапевтичним агентом є антибіотик.

50. Спосіб за п. 49, де антибіотик вибраний з структурних класів, що включають (i) аміноглікозиди; (ii) бета-лактами; (iii) макроліди/циклічні пептиди; (iv) тетрацикліни; (v) фторхіноліни/фторхінолони; й (vi) оксазолідинони.

10 51. Спосіб за п. 49, де антибіотик вибраний з групи, що складається з кліндаміцину, новобіоцину, ретапамуліну, даптоміцину, GSK-2140944, CG-400549, ситафлоксацину, тейкопланіну, триклозану, нафтиридону, радезоліду, доксорубіцину, ампіциліну, ванкоміцину, іміпенему, доріпенему, гемцитабіну, далбаванцину й азитроміцину.

52. Набір для лікування бактеріальної інфекції, який включає:

15 а) фармацевтичну композицію за п. 40; і

б) інструкції із застосування.

53. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 7, де анти-WTA антитіло включає варіабельну область легкого ланцюга (VL), де VL включає амінокислотну послідовність, що має щонайменше 95% ідентичність послідовності за довжиною послідовності VL SEQ ID NO: 119.

20 54. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 7, де анти-WTA антитіло включає варіабельну область важкого ланцюга (VH), де VH включає амінокислотну послідовність, що має щонайменше 95% ідентичність послідовності за довжиною послідовності VH SEQ ID NO: 156.

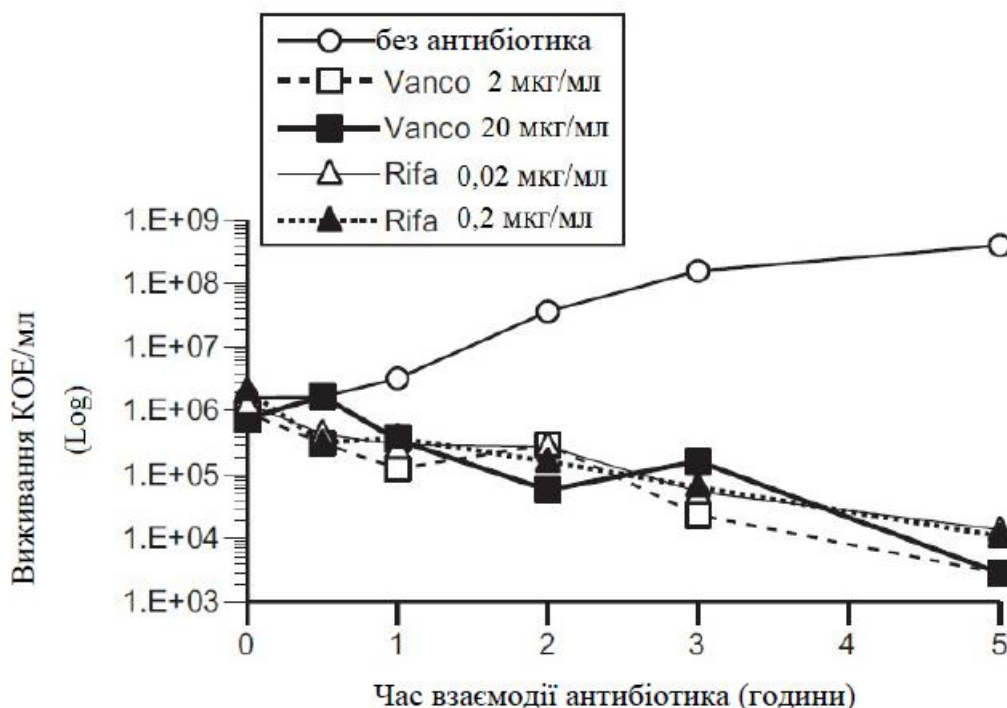
55. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 7, де анти-WTA антитіло включає VL і VH, де VL включає послідовність SEQ ID NO: 119, а VH включає послідовність SEQ ID NO: 156.

25 56. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 7, де анти-WTA антитіло включає легкий ланцюг (LC), причому LC включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 145, і важкий ланцюг (HC), причому HC включає амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 157.

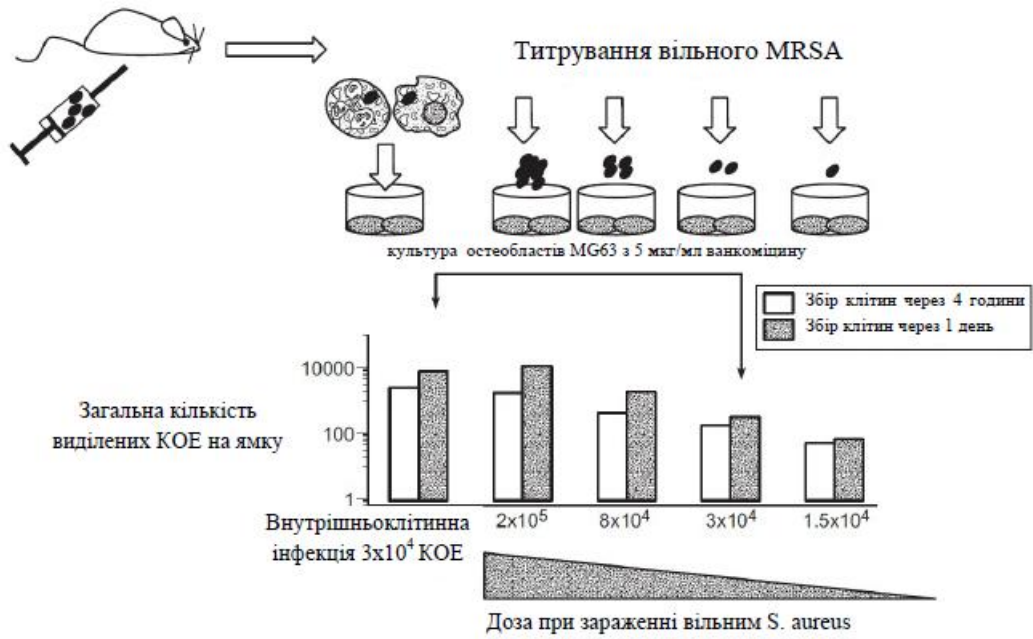
57. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 7, де константна область важкого ланцюга анти-WTA антитіла включає амінокислотну заміну A118C і/або константна область легкого ланцюга включає амінокислотну заміну V205C, де нумерація наведена відповідно до нумерації EU.

30 58. Сполука кон'югат антитіло-антибіотик за п. 39, де Ab являє собою анти-WTA антитіло, де анти-WTA антитіло включає VL і VH, де VL включає послідовність SEQ ID NO: 119, а VH включає послідовність SEQ ID NO: 156, і де р являє собою ціле число, що дорівнює 2.

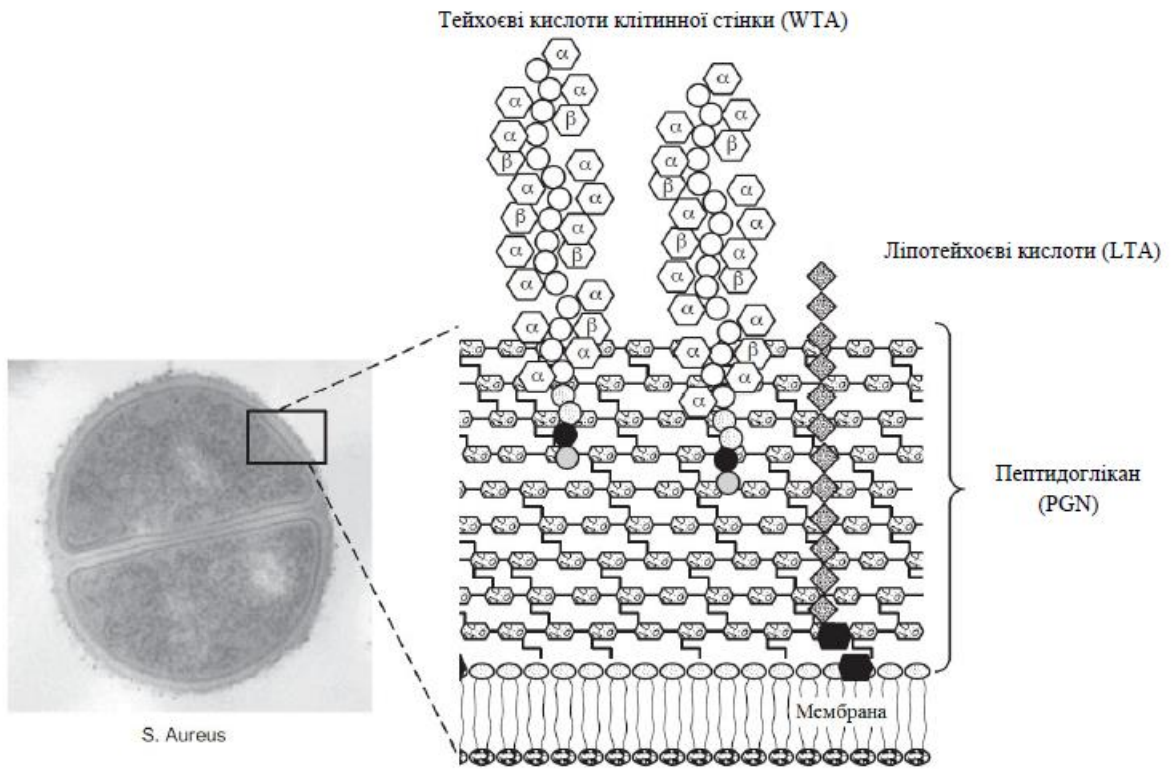
ФІГ. 1



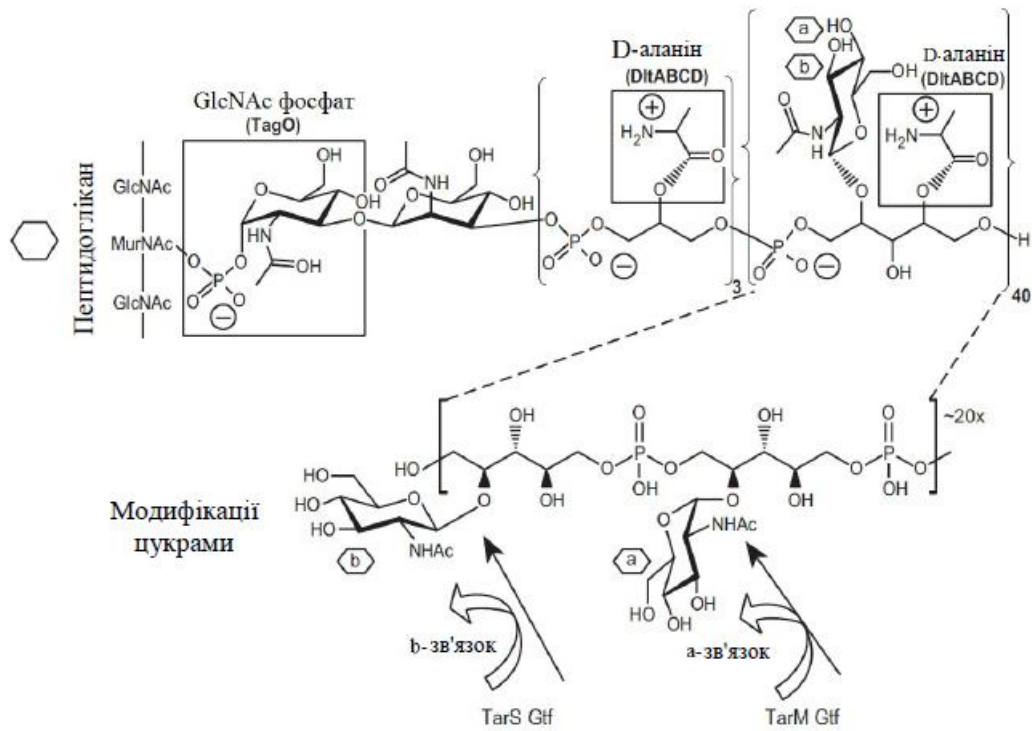
ФІГ. 2



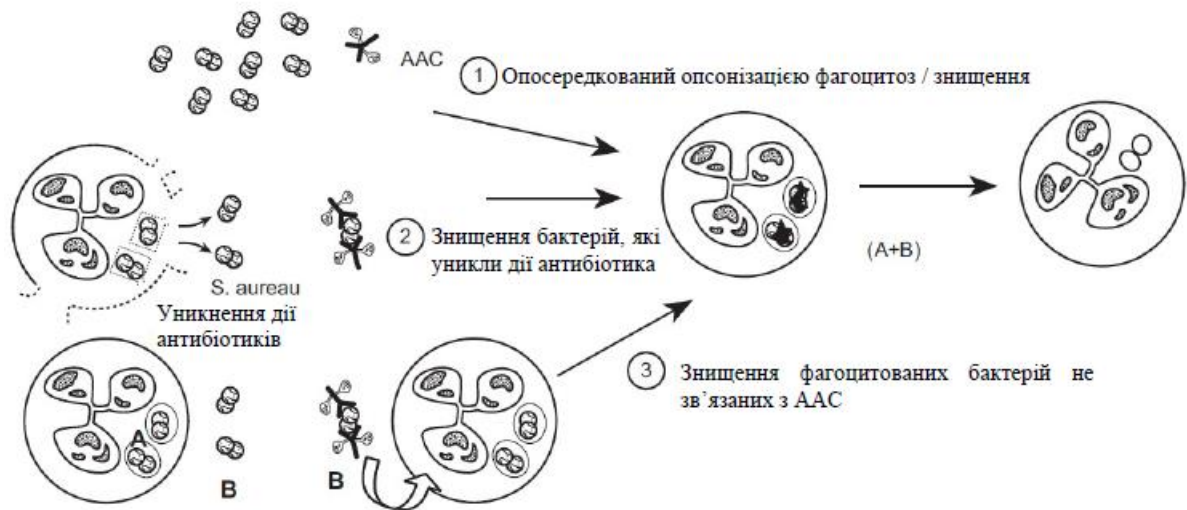
ФІГ. 3



ФІГ. 4



ФІГ. 5



ФІГ. 6А

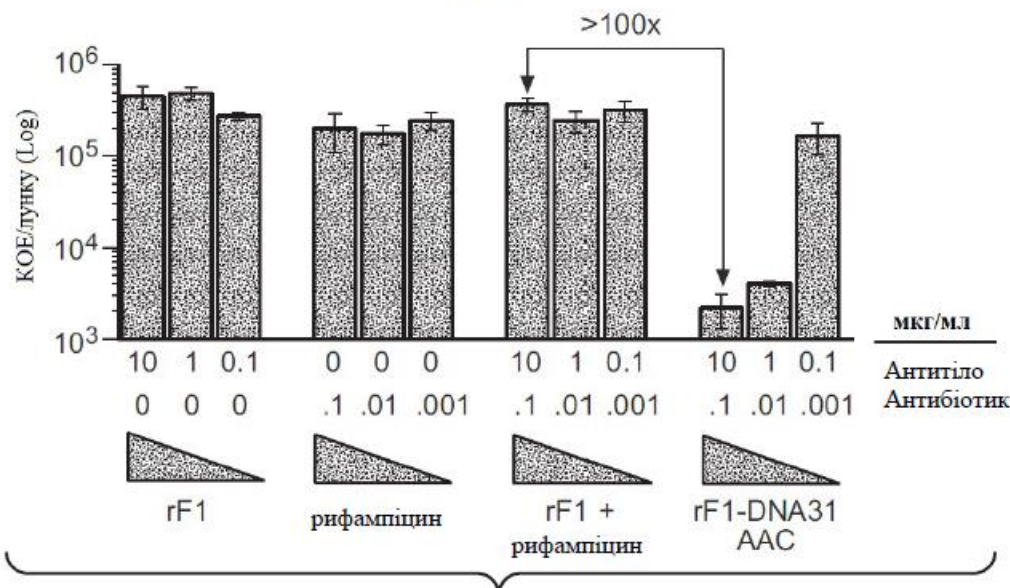
Антитіло	Антиген	GlcNAc	KD (нМ)	Густина антигена, доступних сайтів на бактерію	Донор	Джерело клітин	Зв'язування з покриттям при первинному скринінгу з Ag (ELISA)
4497	WTA	бета	2.5	50	327	PB/PC	WTA; PGN; CW USA300 стаціонарна фаза (препарат, що не містить залізо: TSB у відношенні 96:4)
4462	WTA	бета	3.1	43	326	sMBC	WTA; PGN; CW USA300 стаціонарна фаза (препарат, що не містить залізо: TSB у відношенні 96:4)
4450	WTA	бета			326	sMBC	WTA; PGN; CW USA300 стаціонарна фаза (препарат, що не містить залізо: TSB у відношенні 96:4)
4487	WTA	бета			327	PB/PC	WTA; PGN; CW USA300 стаціонарна фаза (препарат, що не містить залізо: TSB у відношенні 96:4)
6078	WTA	бета			349	sMBC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 стаціонарна фаза (препарат, що не містить залізо: TSB у відношенні 96:4)
6263	WTA	бета	1.4	22,000	350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 стаціонарна фаза (препарат, що не містить залізо: TSB у відношенні 96:4)
6297	WTA	бета	1.1	21,000	350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 стаціонарна фаза (препарат, що не містить залізо: TSB у відношенні 96:4)
6239	WTA	бета			350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 стаціонарна фаза (препарат, що не містить залізо: TSB у відношенні 96:4)
6292	WTA	бета			350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 стаціонарна фаза (препарат, що не містить залізо: TSB у відношенні 96:4)
6232	WTA	бета			350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 стаціонарна фаза (препарат, що не містить залізо: TSB у відношенні 96:4)
6259	WTA	бета			350	PB/PC	CW USA300 стаціонарна фаза (препарат, що не містить залізо: TSB у відношенні 96:4)
6253	WTA	бета			350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 стаціонарна фаза (препарат, що не містить залізо: TSB у відношенні 96:4)
6265	WTA	бета			350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 стаціонарна фаза (препарат, що не містить залізо: TSB у відношенні 96:4)
4461(7574)	WTA	альфа			326	sMBC	CW USA300 стаціонарна фаза (препарат, що не містить залізо: TSB у відношенні 96:4)
4624(7578)	WTA	альфа	0.4	16	326	sMBC	CW USA300 стаціонарна фаза (препарат, що не містить залізо: TSB у відношенні 96:4)
4399	WTA	альфа			326	sMBC	CW USA300 стаціонарна фаза (препарат, що не містить залізо: TSB у відношенні 96:4)
6267	WTA	альфа			350	PB/PC	CW USA300 стаціонарна фаза (препарат, що не містить залізо: TSB у відношенні 96:4)
rF1	SDR-білки	?	0.3	1600			
4516(7577)	SDR-білки	?			327	PB/PC	WTA; PGN; CW USA300 стаціонарна фаза (препарат, що не містить залізо: TSB у відношенні 96:4)
6234	SDR-білки	?			350	PB/PC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 стаціонарна фаза (препарат, що не містить залізо: TSB у відношенні 96:4)
6060	SDR-білки	?			349	sMBC	PGN+WTA (1:1); CW USA300 стаціонарна фаза (препарат, що не містить залізо: TSB у відношенні 96:4)
4569	LTA	?			327	PB/PC	CW Wood46 стаціонарна фаза TSB
4479	PGN				327	PB/PC	WTA; PGN; CW USA300 стаціонарна фаза (препарат, що не містить залізо: TSB у відношенні 96:4)

ФІГ. 6В

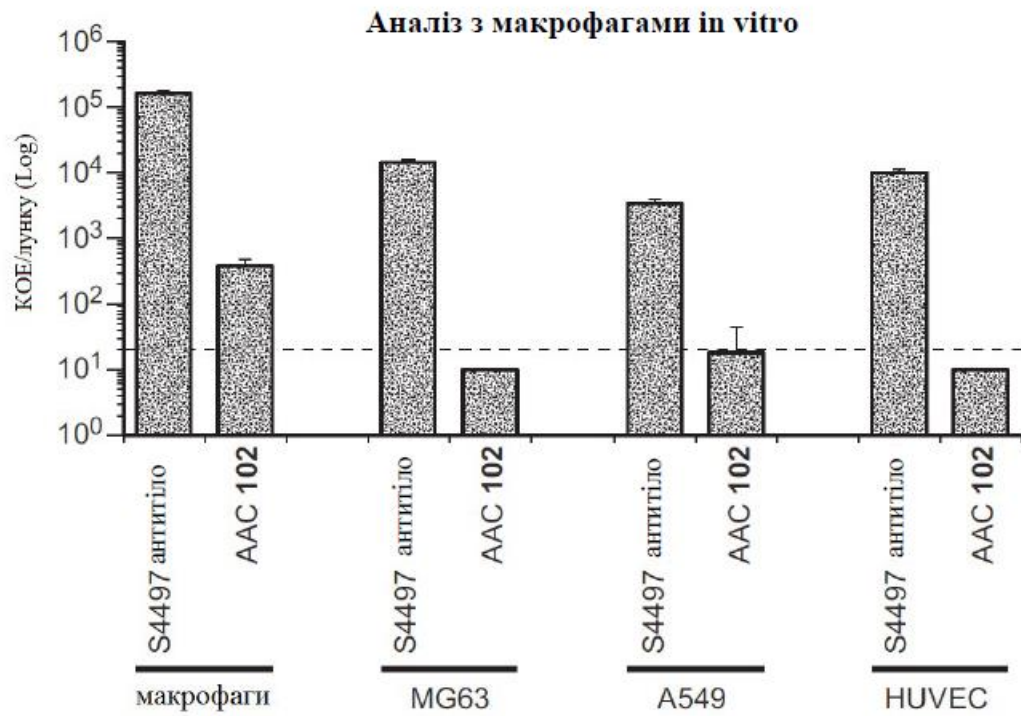
PB/PC – плазмобласти / плазматичні клітини

sMBC – В-клітини пам'яті

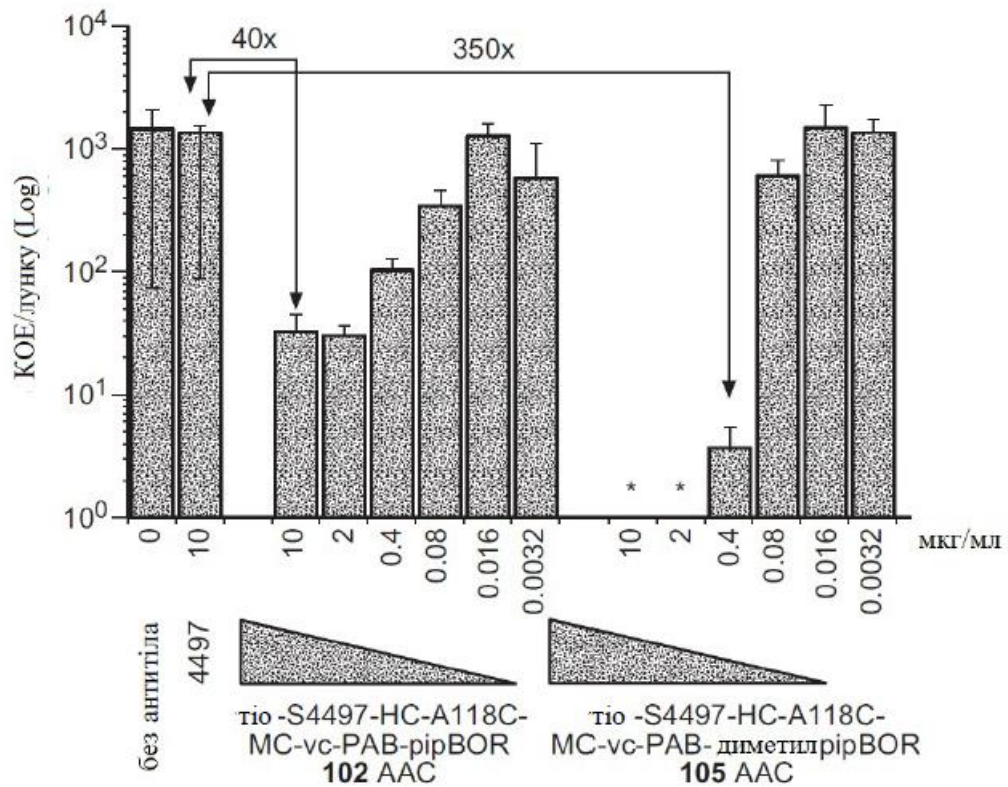
ФІГ. 7А

Аналіз з макрофагами *in vitro*

ФІГ. 7В

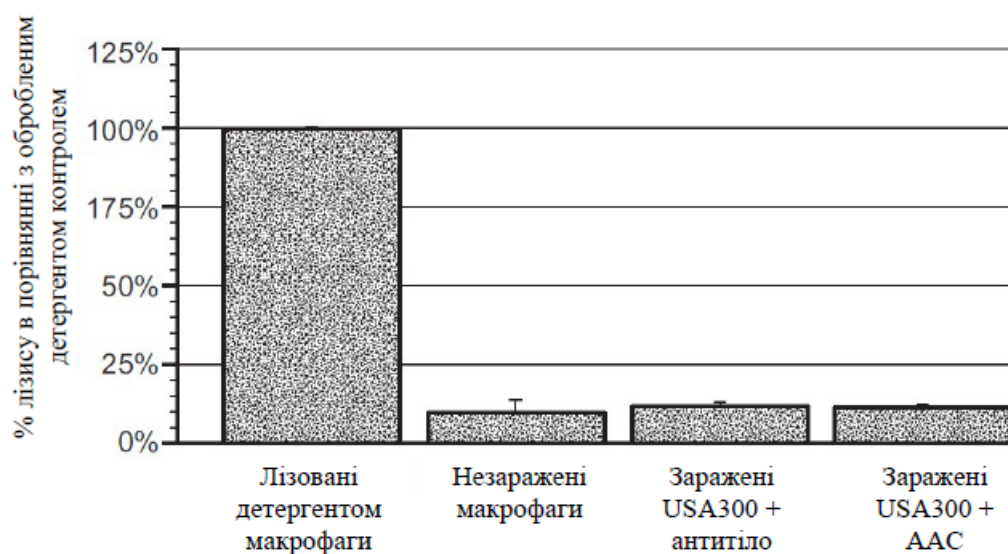


ФІГ. 7С



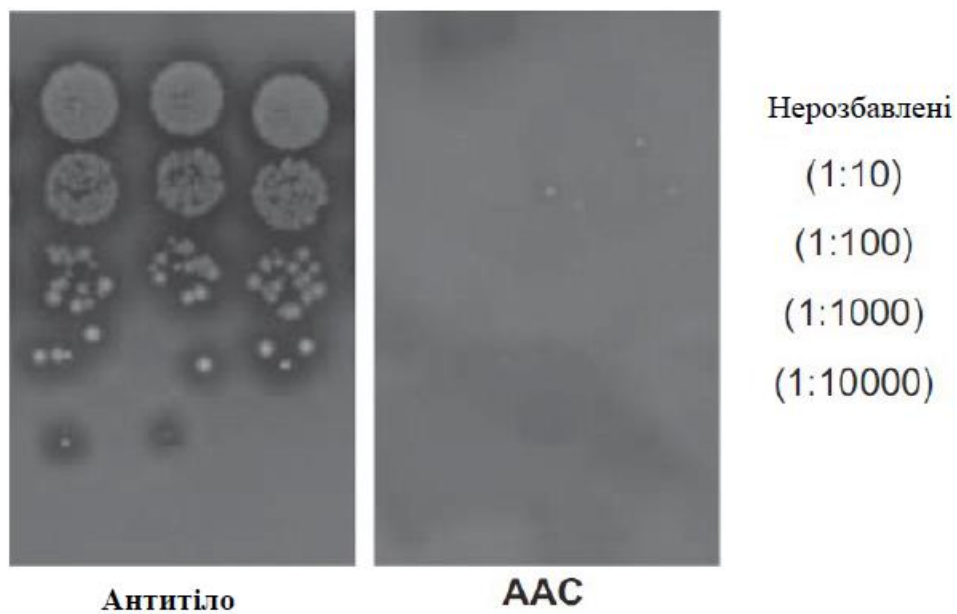
* нижче межі виявлення (3 КОЕ/лунку)

ФІГ. 7D

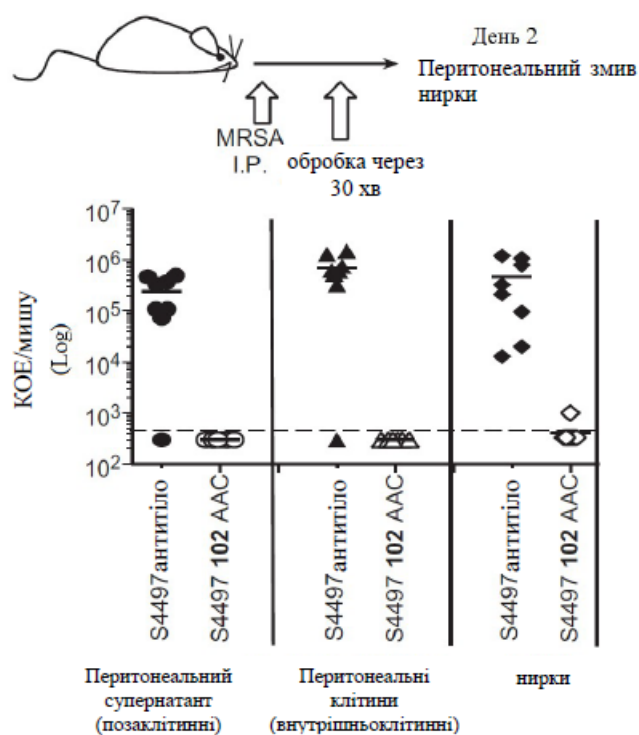


ФІГ. 7E

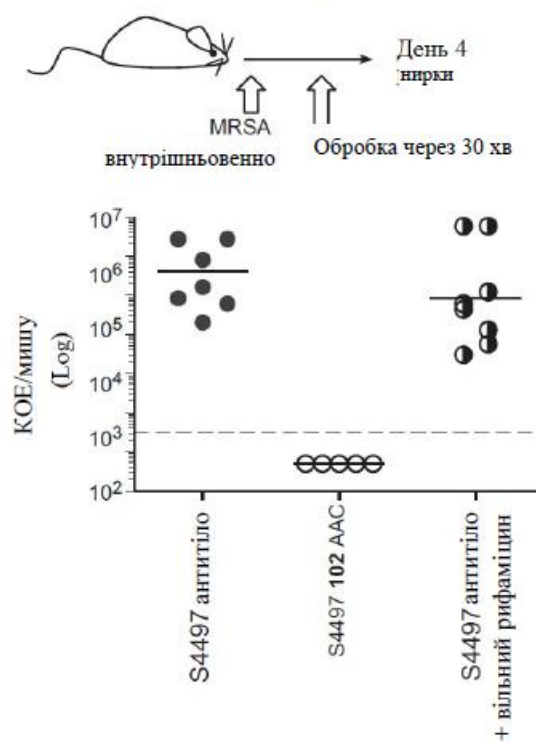
Виділення живих *S. aureus* із макрофагів



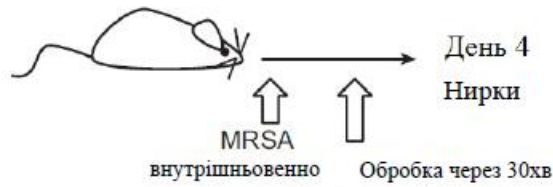
ФІГ. 8А



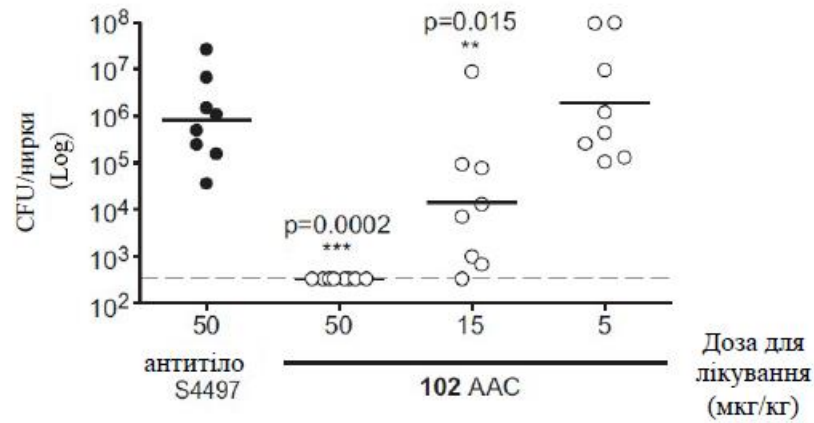
ФІГ. 8В



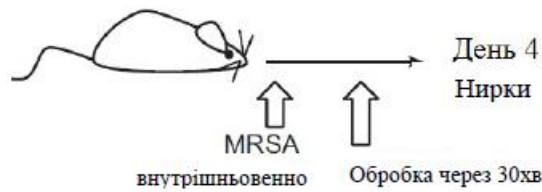
ФІГ. 9А



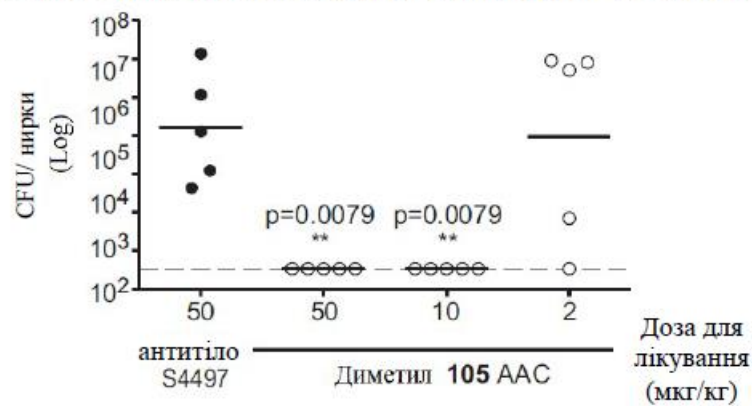
р-значення з тесту Манна-Уїтні у порівнянні з групою 4497,1 мг



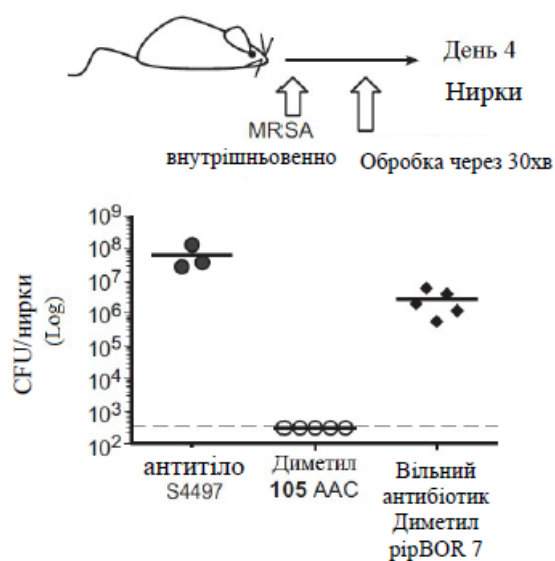
ФІГ. 9В



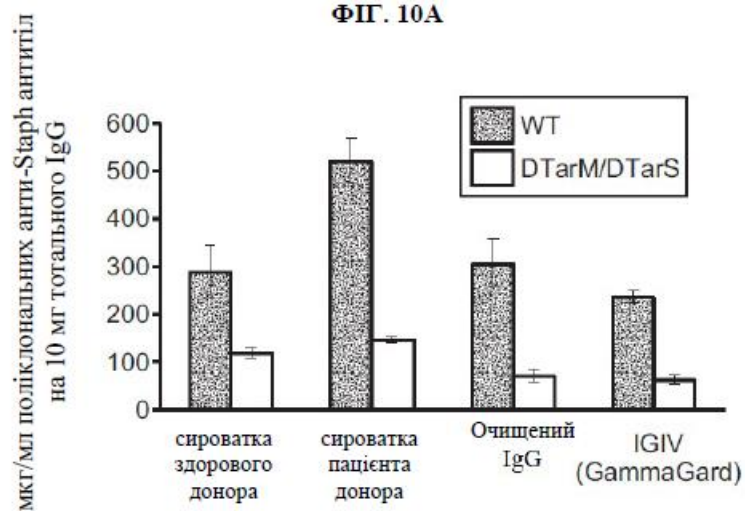
р-значення з тесту Манна-Уїтні у порівнянні з групою 4497,2000 мг



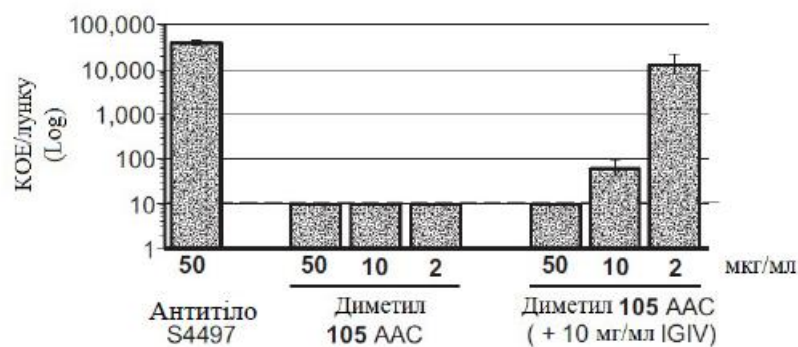
ФІГ. 9С



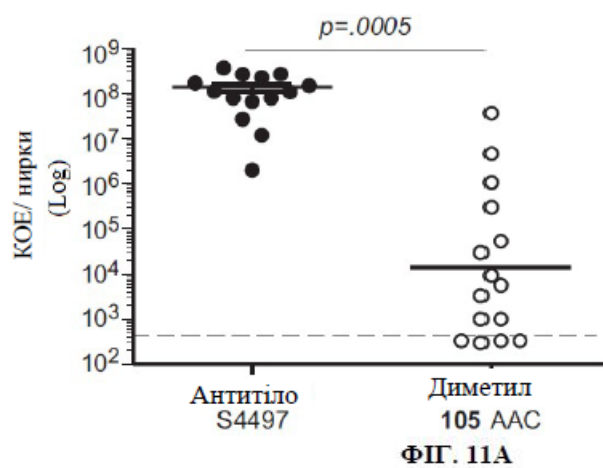
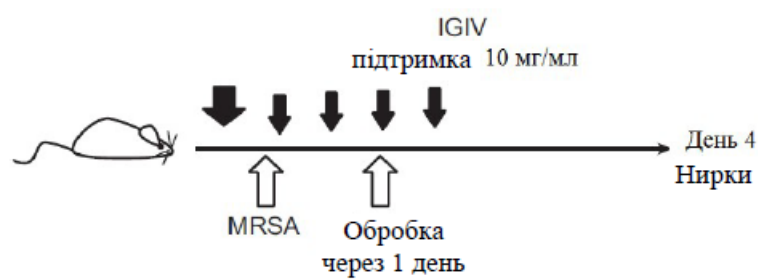
ФІГ. 10А



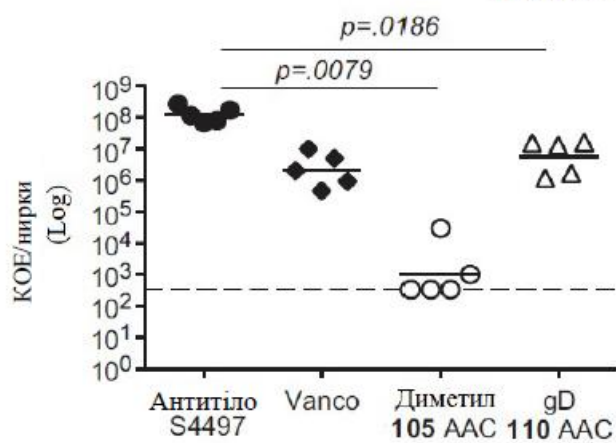
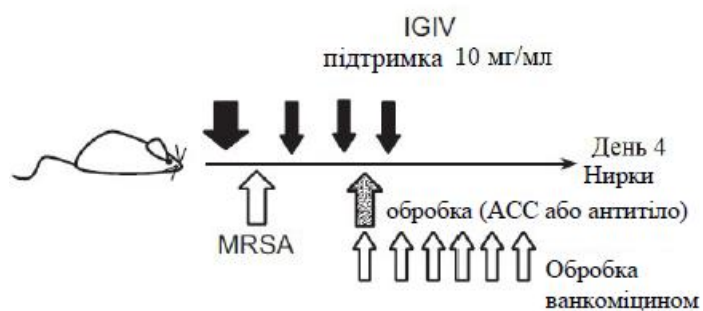
ФІГ. 10В



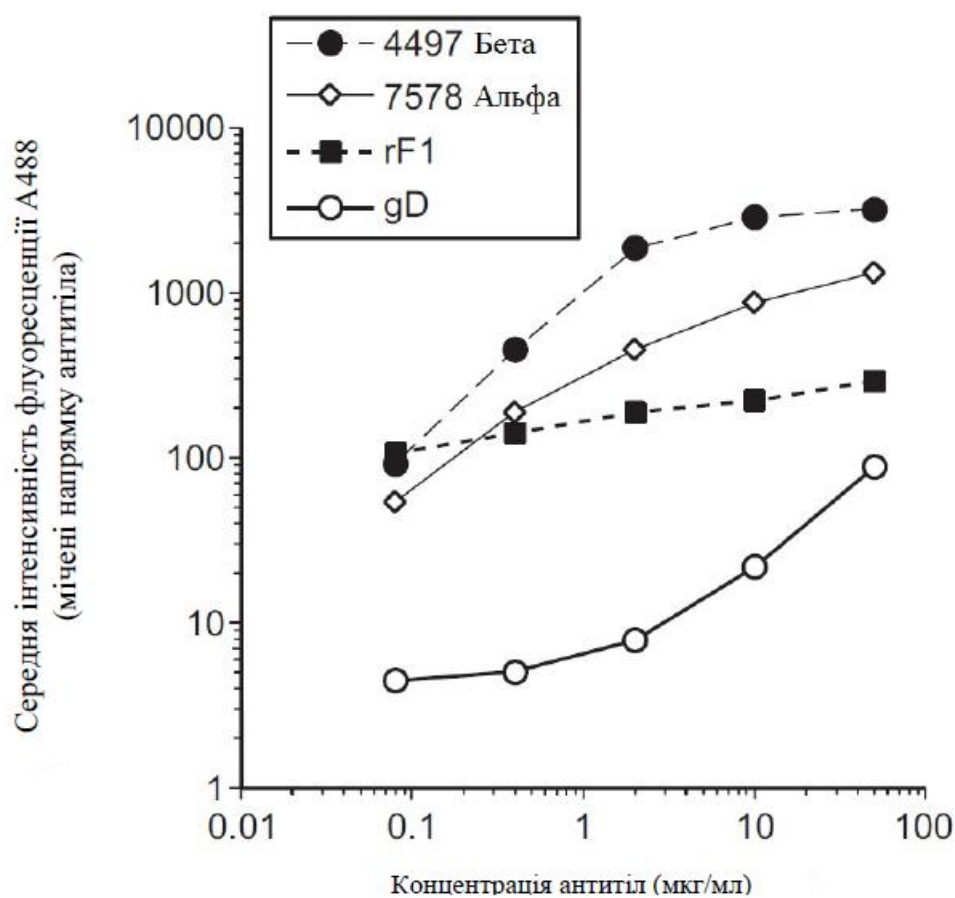
ФІГ. 10С



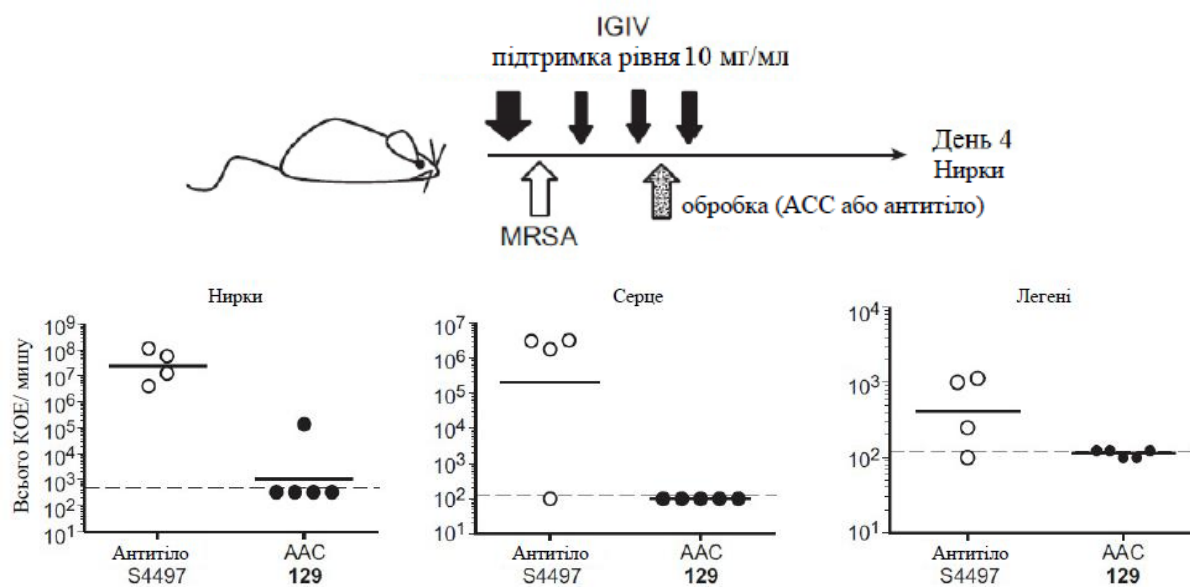
ФІГ. 11А



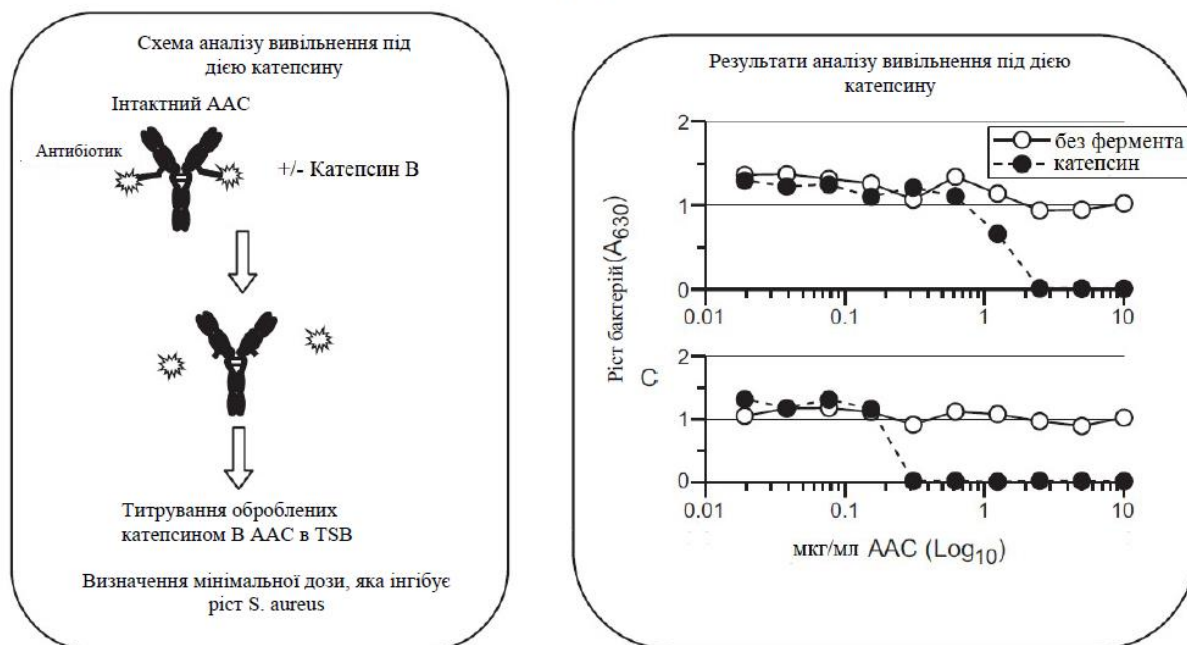
ФІГ. 11В



ФІГ. 11С



ΦΙΓ. 12



ΦΠ. 13Α

Підкреслені послідовності CDR відповідно до системи Kabat

Вариабельна область легкого ланцюга

																																				CDR L1 - Contact											
																																				CDR L1 - Chothia											
																																				CDR L1 - Kabat											
Нумерація за Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	27f	28	29	30	31	32	33	34	35	36					
4461	D	I	Q	M	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	S	Q	S	V	L	S	R	A	N	N	N	Y	Y	V	A	W	Y					
4624	D	I	Q	M	T	Q	S	P	D	S	L	S	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	R	S	N	Q	N	L	-	S	S	S	N	N	N	Y	Y	L	A	W	Y					
4399	E	I	V	L	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	N	Q	N	V	L	A	S	S	N	D	K	N	Y	L	A	W	Y					
6267	D	I	Q	L	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	S	Q	N	V	L	Y	S	S	N	N	K	N	Y	L	A	W	Y					
																																				CDR L2 - Contact											
																																				CDR L2 - Chothia											
																																				CDR L2 - Kabat											
Нумерація за Kabat	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78					
4461	Q	H	K	P	G	Q	P	P	K	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	N	S	L					
4624	Q	Q	K	P	G	Q	P	L	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L					
4399	Q	H	K	P	G	Q	P	L	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L					
6267	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L					
																																				CDR L3 - Contact											
																																				CDR L3 - Chothia											
																																				CDR L3 - Kabat											
Нумерація за Kabat	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	95a	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107																	
4461	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	T	S	R	.	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K																	
4624	R	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	A	N	P	.	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K																	
4399	R	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	T	N	P	.	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	F	N																	
6267	Q	A	E	D	V	A	V	Y	Y	C	Q	Q	Y	Y	T	S	P	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	E																	

ΦΠ. 13B

Підкреслені послідовності CDR відповідно до системи Kabat

Варіабельна область важкого ланцюга

CDR H1 - Contact

CDR H1 - Chothia

CDR H1 - Kabat

Нумерация за Kabat

4461

4624

4399

6267

CDR H2 - Contact

CDR H2 - Chothia

CDR H2 - Kabat

Нумерация за Kabat

4461

4624

4399

6267

CDR H3 - Contact

CDR H3 - Chothia

CDR H3 - Kabat

Нумерация за Kabat

82b

82c

83

84

85

86

87

88

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

100a

100b

100c

100d

100e

100f

100g

100h

100i

100j

100k

100l

100m

100n

100o

100p

100q

100r

100s

100t

100u

101

4461

4624

4399

6267

Нумерация за Kabat

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

4461

4624

4399

6267

ΦΙΓ. 14

Анхтл	CDR L1	CDR L2	CDR L3	CDR H1	CDR H2	CDR H3
6078	RASQTISGWLA (SEQ ID NO:33)	KASTLES (SEQ ID NO:34)	QQYKSYSFN (SEQ ID NO:35)	SYDIN (SEQ ID NO:36)	WMNANSNGTGYAQKFQG (SEQ ID NO:37)	SSILVRGALGRYFDL (SEQ ID NO:38)
6263	RASQTISGWLA (SEQ ID NO:39)	KASTLES (SEQ ID NO:40)	QQYKSYSFN (SEQ ID NO:41)	SYDIN (SEQ ID NO:42)	WMNANSNGTGYAQKFQG (SEQ ID NO:43)	SSILVRGALGRYFDL (SEQ ID NO:44)
4450	RASQFVSRTLSA (SEQ ID NO:45)	ETSSRAT (SEQ ID NO:46)	HKYGSGRPRT (SEQ ID NO:47)	NYDFI (SEQ ID NO:48)	WMNPNSYNTGYGQKFQG (SEQ ID NO:49)	AVRGQLLSEY (SEQ ID NO:50)
6297	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO:51)	DASSRAT (SEQ ID NO:52)	KQYGSTPRP (SEQ ID NO:53)	SYDIN (SEQ ID NO:54)	WMNPNSGNTNYAQRFGQ (SEQ ID NO:55)	ERWSKDTGHYYYYGMDV (SEQ ID NO:56)
6239	RASLDITNHLA (SEQ ID NO:57)	EASILQS (SEQ ID NO:58)	EKCNSTPRT (SEQ ID NO:59)	NYDIN (SEQ ID NO:60)	WMNPSSGRTGYAPKFRG (SEQ ID NO:61)	GGGYDDSSGNHYHISGLDV (SEQ ID NO:62)
6232	RASQSVGAIIYLA (SEQ ID NO:63)	GYSNRAT (SEQ ID NO:64)	QLYTSSRALT (SEQ ID NO:65)	AYAMN (SEQ ID NO:66)	SITKNSDSLYYADSVKG (SEQ ID NO:67)	LAARIMATDY (SEQ ID NO:68)
6259	RASQGIRNGLG (SEQ ID NO:69)	PASTLES (SEQ ID NO:70)	LQDHNYPPT (SEQ ID NO:71)	YYSMI (SEQ ID NO:72)	SIDSSSRVLYYADSVKG (SEQ ID NO:73)	DGDDILSVYRGSGRPFDY (SEQ ID NO:74)
6292	RASQGIRNGLG (SEQ ID NO:75)	PASTLES (SEQ ID NO:76)	LQDHNYPPT (SEQ ID NO:77)	YYSMI (SEQ ID NO:78)	SIDSSSRVRYTDSVKG (SEQ ID NO:79)	DGDDILSVYQGSGRPFDY (SEQ ID NO:80)
4462	RASQSVRTNVA (SEQ ID NO:81)	GASTRAS (SEQ ID NO:82)	LQYNTWPRT (SEQ ID NO:83)	TNDMS (SEQ ID NO:84)	TIIGIDTTHYADSVRG (SEQ ID NO:85)	NSGIYSF (SEQ ID NO:86)
6265	RASQDIGSSLA (SEQ ID NO:87)	ATSTLQS (SEQ ID NO:88)	QQLNNYVHS (SEQ ID NO:89)	DYAMG (SEQ ID NO:90)	VYTGHSYRTHYADSVKG (SEQ ID NO:91)	RIWSYGDDSFVDV (SEQ ID NO:92)
6253	RASQSIGDRLA (SEQ ID NO:93)	WASNLEG (SEQ ID NO:94)	QQYKSQWS (SEQ ID NO:95)	SYAMN (SEQ ID NO:96)	YISSIETIYYADSVKG (SEQ ID NO:97)	DRLVDPPLSSPNS (SEQ ID NO:98)
4497	KSSQSIFTRSRNKNLLN (SEQ ID NO:99)	WASTRKS (SEQ ID NO:100)	QQYFSPPYT (SEQ ID NO:101)	SFWMH (SEQ ID NO:102)	FTNNEGTTTAYADSVRG (SEQ ID NO:103)	GDGGLDD (SEQ ID NO:104)
4487	RASQFTNHLYLN (SEQ ID NO:105)	VASNLQS (SEQ ID NO:106)	QQSYRTPYT (SEQ ID NO:107)	SGYYN (SEQ ID NO:108)	YILSGAHTDIKASLGS (SEQ ID NO:109)	SGVYSKYSLDV (SEQ ID NO:110)

6263 має такі самі CDR, як 6078

Легкий данцюг

281

ΦΠ. 15B-1

Важкий ланцюг

		CDR H1 - Contact																																									
		CDR H1 - Chothia																																									
		CDR H1 - Kabat																																									
Номерация за Kabat		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
	6078	Q	M	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	E	A	S	G	Y	T	L	T	S	Y	D	I	N	W	V	R	Q	A	T	G
	6078.v2HC-Cys	E	M	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	E	A	S	G	Y	T	L	T	S	Y	D	I	N	W	V	R	Q	A	T	G
	6078.v2LC-Cys	E	M	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	E	A	S	G	Y	T	L	T	S	Y	D	I	N	W	V	R	Q	A	T	G
	6078.v3HC-Cys	E	I	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	E	A	S	G	Y	T	L	T	S	Y	D	I	N	W	V	R	Q	A	T	G
	6078.v3LC-Cys	E	I	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	E	A	S	G	Y	T	L	T	S	Y	D	I	N	W	V	R	Q	A	T	G
	6078.v4HC-Cys	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	E	A	S	G	Y	T	L	T	S	Y	D	I	N	W	V	R	Q	A	T	G
	6078.v4LC-Cys	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	E	A	S	G	Y	T	L	T	S	Y	D	I	N	W	V	R	Q	A	T	G
	6078.v4HCLC-Cys	E	V	Q	L	V	Q	S	G	A	E	V	K	K	P	G	A	S	V	K	V	S	C	E	A	S	G	Y	T	L	T	S	Y	D	I	N	W	V	R	Q	A	T	G

Нумерация за Kabat	CDR H2 - Contact																																									
	CDR H2 - Chothia																CDR H2 - Kabat																									
	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82a
6078	Q	G	P	E	W	M	G	W	M	N	A	N	S	G	N	T	G	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	G	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S
6078.v2HC-Cys	Q	G	P	E	W	M	G	W	M	N	A	N	S	G	N	T	G	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	G	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S
6078.v2LC-Cys	Q	G	P	E	W	M	G	W	M	N	A	N	S	G	N	T	G	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	G	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S
6078.v3HC-Cys	Q	G	P	E	W	M	G	W	M	N	A	N	S	G	N	T	G	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	G	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S
6078.v3LC-Cys	Q	G	P	E	W	M	G	W	M	N	A	N	S	G	N	T	G	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	G	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S
6078.v4HC-Cys	Q	G	P	E	W	M	G	W	M	N	A	N	S	G	N	T	G	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	G	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S
6078.v4LC-Cys	Q	G	P	E	W	M	G	W	M	N	A	N	S	G	N	T	G	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	G	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S
6078.v4HC-Cys	Q	G	P	E	W	M	G	W	M	N	A	N	S	G	N	T	G	Y	A	Q	K	F	Q	G	R	V	T	L	T	G	D	T	S	I	S	T	A	Y	M	E	L	S

ΦΠ. 15B-2

Нумерация за Kabat		CDR H3 - Contact																				CDR H3 - Chothia										КОНТАКТНА ЧАСТИНА											
		CDR H3 - Kabat																																									
		82b	82c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	100g	101	102	103		104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	118
6078	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	A	S	
6078.v2HC-Cys	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	[C]	S	
6078.v2LC-Cys	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	A	S	
6078.v3HC-Cys	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	[C]	S	
6078.v3LC-Cys	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	A	S	
6078.v4HC-Cys	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	[C]	S	
6078.v4LC-Cys	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	A	S	
6078.v4HCLC-Cys	S	L	R	S	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	S	S	I	L	V	R	G	A	L	G	R	Y	F	D	L	W	G	R	G	T	L	V	T	V	S	S	[C]	S	
Нумерация за EU		120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161
6078	T	X	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	X	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	X	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	
6078.v2HC-Cys	T	X	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	X	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	X	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	
6078.v2LC-Cys	T	X	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	X	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	X	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	
6078.v3HC-Cys	T	X	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	X	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	X	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	
6078.v3LC-Cys	T	X	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	X	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	X	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	
6078.v4HC-Cys	T	X	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	X	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	X	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	
6078.v4LC-Cys	T	X	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	X	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	X	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	
6078.v4HCLC-Cys	T	X	G	P	S	V	F	P	L	A	P	S	S	X	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	X	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	
Нумерация за EU		162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203
6078	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N
6078.v2HC-Cys	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N
6078.v2LC-Cys	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N
6078.v3HC-Cys	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N
6078.v3LC-Cys	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N
6078.v4HC-Cys	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N
6078.v4LC-Cys	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N
6078.v4HCLC-Cys	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N

ФІГ. 15В-3

Нумерація за EU	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	
6078	Н	К	Р	С	Н	Т	К	В	Д	К	К	В	Е	Р	К	С	С	Д	К	Т	Н	Т	С	Р	Р	С	Р	А	Р	Е	Л	Л	Г	Г	Р	С	В	В	Л	Р	Р	Р	Р
6078.v2HC-Cys	Н	К	Р	С	Н	Т	К	В	Д	К	К	В	Е	Р	К	С	С	Д	К	Т	Н	Т	С	Р	Р	С	Р	А	Р	Е	Л	Л	Г	Г	Р	С	В	В	Л	Р	Р	Р	Р
6078.v2LC-Cys	Н	К	Р	С	Н	Т	К	В	Д	К	К	В	Е	Р	К	С	С	Д	К	Т	Н	Т	С	Р	Р	С	Р	А	Р	Е	Л	Л	Г	Г	Р	С	В	В	Л	Р	Р	Р	Р
6078.v3HC-Cys	Н	К	Р	С	Н	Т	К	В	Д	К	К	В	Е	Р	К	С	С	Д	К	Т	Н	Т	С	Р	Р	С	Р	А	Р	Е	Л	Л	Г	Г	Р	С	В	В	Л	Р	Р	Р	Р
6078.v3LC-Cys	Н	К	Р	С	Н	Т	К	В	Д	К	К	В	Е	Р	К	С	С	Д	К	Т	Н	Т	С	Р	Р	С	Р	А	Р	Е	Л	Л	Г	Г	Р	С	В	В	Л	Р	Р	Р	Р
6078.v4HC-Cys	Н	К	Р	С	Н	Т	К	В	Д	К	К	В	Е	Р	К	С	С	Д	К	Т	Н	Т	С	Р	Р	С	Р	А	Р	Е	Л	Л	Г	Г	Р	С	В	В	Л	Р	Р	Р	Р
6078.v4LC-Cys	Н	К	Р	С	Н	Т	К	В	Д	К	К	В	Е	Р	К	С	С	Д	К	Т	Н	Т	С	Р	Р	С	Р	А	Р	Е	Л	Л	Г	Г	Р	С	В	В	Л	Р	Р	Р	Р
6078.v4HCLC-Cys	Н	К	Р	С	Н	Т	К	В	Д	К	К	В	Е	Р	К	С	С	Д	К	Т	Н	Т	С	Р	Р	С	Р	А	Р	Е	Л	Л	Г	Г	Р	С	В	В	Л	Р	Р	Р	Р

Нумерація за EU	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287
6078	К	Р	К	Д	Т	Л	Н	І	С	Р	Т	Р	Е	В	Т	С	В	В	В	Д	В	С	Н	Е	Д	Р	Е	В	К	Р	Н	В	У	Д	Г	В	Е	В	Н	А		
6078.v2HC-Cys	К	Р	К	Д	Т	Л	Н	І	С	Р	Т	Р	Е	В	Т	С	В	В	В	Д	В	С	Н	Е	Д	Р	Е	В	К	Р	Н	В	У	Д	Г	В	Е	В	Н	А		
6078.v2LC-Cys	К	Р	К	Д	Т	Л	Н	І	С	Р	Т	Р	Е	В	Т	С	В	В	В	Д	В	С	Н	Е	Д	Р	Е	В	К	Р	Н	В	У	Д	Г	В	Е	В	Н	А		
6078.v3HC-Cys	К	Р	К	Д	Т	Л	Н	І	С	Р	Т	Р	Е	В	Т	С	В	В	В	Д	В	С	Н	Е	Д	Р	Е	В	К	Р	Н	В	У	Д	Г	В	Е	В	Н	А		
6078.v3LC-Cys	К	Р	К	Д	Т	Л	Н	І	С	Р	Т	Р	Е	В	Т	С	В	В	В	Д	В	С	Н	Е	Д	Р	Е	В	К	Р	Н	В	У	Д	Г	В	Е	В	Н	А		
6078.v4HC-Cys	К	Р	К	Д	Т	Л	Н	І	С	Р	Т	Р	Е	В	Т	С	В	В	В	Д	В	С	Н	Е	Д	Р	Е	В	К	Р	Н	В	У	Д	Г	В	Е	В	Н	А		
6078.v4LC-Cys	К	Р	К	Д	Т	Л	Н	І	С	Р	Т	Р	Е	В	Т	С	В	В	В	Д	В	С	Н	Е	Д	Р	Е	В	К	Р	Н	В	У	Д	Г	В	Е	В	Н	А		
6078.v4HCLC-Cys	К	Р	К	Д	Т	Л	Н	І	С	Р	Т	Р	Е	В	Т	С	В	В	В	Д	В	С	Н	Е	Д	Р	Е	В	К	Р	Н	В	У	Д	Г	В	Е	В	Н	А		

Нумерація за EU	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329
6078	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P
6078.v2HC-Cys	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P
6078.v2LC-Cys	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P
6078.v3HC-Cys	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P
6078.v3LC-Cys	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P
6078.v4HC-Cys	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P
6078.v4LC-Cys	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P
6078.v4HCLC-Cys	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P

ФІГ. 15В-4

Нумерація за EU	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371
6078	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
6078.v2HC-Cys	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
6078.v2LC-Cys	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
6078.v3HC-Cys	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
6078.v3LC-Cys	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
6078.v4HC-Cys	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
6078.v4LC-Cys	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G
6078.v4HCLC-Cys	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G

Нумерація за EU	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413
6078	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D
6078.v2HC-Cys	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D
6078.v2LC-Cys	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D
6078.v3HC-Cys	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D
6078.v3LC-Cys	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D
6078.v4HC-Cys	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D
6078.v4LC-Cys	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D
6078.v4HCLC-Cys	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D

Нумерація за EU	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	44
-----------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	----

ФІГ. 16B-2

Нумерація за EU	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	
4497	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	
4497.v8-HC-Cys	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	
4497.v8-LC-Cys	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	
4497.v8-HCLC-Cys	L	A	P	S	S	K	S	T	S	G	G	T	A	A	L	G	C	L	V	K	D	Y	F	P	E	P	V	T	V	S	W	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	
Нумерація за EU	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	
4497	P	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V
4497.v8-HC-Cys	P	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V
4497.v8-LC-Cys	P	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V
4497.v8-HCLC-Cys	P	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V
Нумерація за EU	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	
4497	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	P	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	
4497.v8-HC-Cys	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	P	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	
4497.v8-LC-Cys	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	P	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	
4497.v8-HCLC-Cys	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L	P	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	
Нумерація за EU	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	
4497	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q		
4497.v8-HC-Cys	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q		
4497.v8-LC-Cys	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q		
4497.v8-HCLC-Cys	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q		
Нумерація за EU	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	
4497	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	N	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	
4497.v8-HC-Cys	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	N	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	
4497.v8-LC-Cys	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	N	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	
4497.v8-HCLC-Cys	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	N	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	
Нумерація за EU	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	
4497	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	
4497.v8-HC-Cys	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	
4497.v8-LC-Cys	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	
4497.v8-HCLC-Cys	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	

ФІГ. 16B-3

Нумерація за EU	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421
4497	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N
4497.v8-HC-Cys	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N
4497.v8-LC-Cys	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N
4497.v8-HCLC-Cys	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	F	F	L	Y	S	K	L	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N
Нумерація за EU	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446																	
4497	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G																	
4497.v8-HC-Cys	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G																	
4497.v8-LC-Cys	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G																	
4497.v8-HCLC-Cys	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G																	

ФІГ. 17A-1

Підкреслені послідовності CDR відповідно до системи Kabat

Легкий ланцюг

																																				CDR L1 - Contact									
																																				CDR L1 - Chothia									
																																				CDR L1 - Kabat									
Нумерація за Kabat	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	27f	28	29	30	31	32	33	34	35	36			
6078	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	T	I	S	G	W	L	A	W	Y			
6263	D	I	Q	L	T	Q	S	P	S	I	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	T	I	S	G	W	L	A	W	Y			
4450	E	I	V	L	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	D	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	P	V	S	R	T	S	L	A	W	F		
6297	E	T	T	L	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	V	S	S	S	Y	L	A	W	Y		
6239	D	V	V	M	T	Q	S	P	S	T	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	L	D	I	T	N	H	L	A	W	Y			
6232	E	I	V	M	T	Q	S	P	G	T	L	S	L	S	P	G	E	R	A	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	V	G	A	I	Y	L	A	W	Y		
6259	E	I	V	L	T	Q	S	P	S	T	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	G	I	R	N	G	L	G	W	Y			
6292	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	T	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	G	I	R	N	G	L	G	W	Y			
4462	D	I	Q	M	T	Q	S	P	A	T	L	S	V	S	P	G	E	T	V	T	L	S	C	R	A	S	Q	S	V	R	T	N	V	A	W	Y			
6265	D	V	V	M	T	Q	S	P	S	P	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	L	T	C	R	A	S	Q	D	I	G	S	S	L	A	W	Y			
6253	E	T	T	L	T	Q	S	P	S	T	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	G	D	R	L	A	W	Y			
4497	D	I	Q	L	T	Q	S	P	D	S	L	A	V	S	L	G	E	R	A	T	I	N	C	K	S	S	Q	S	I	P	R	T	S	R	N	K	N	L	L	N	W	Y			
4487	D	I	Q	L	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	F	T	N	H	Y	L	N	W	Y			

																																				CDR L2 - Contact									
																																				CDR L2 - Chothia									
																																				CDR L2 - Kabat									
Нумерація за Kabat	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78			
6078	Q	Q	K	P	A	E	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L			
6263	Q	Q	K	P	A	E	A	P	K	L	L	I	Y	K	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	E	F	T	L	T	I	S	S	L			
4450	Q	Q	K	P	G	Q	P	P	R	L	L	I	Y	K	T	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	R	L			
6297	Q	Q	K	P	G	Q	A	P	K	V	L	I	Y	E	A	S	S	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	R	L			
6239	Q	Q	K	P	G	E	L	P	K	L	L	I	Y	E	A	S	I	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L			
6232	Q	Q	E	P	G	R	A	P	T	L	L	F	Y	G	V	S	N	R	A	T	G	I	P	D	R	F	S	C	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	R	L			
6259	Q	Q	T	P	G	X	A	P	K	L	L	I	Y	P	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	D	R	D	F	T	L	T	I	T	S	L			
6292	Q	Q	I	P	G	X	A	P	K	L	L	I	Y	P	A	S	T	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	D	R	D	F	T	L	T	I	T	S	L			
4462	R	H	K	A	G	Q	A	P	M	I	L	V	S	G	A	S	T	R	A	S	G	A	P	A	R	F	S	G	S	G	Y	G	T	E	F	T	L	T	I	T	S	L			
6265	Q	Q	R	P	G	K	A	P	N	L	L	I	Y	A	T	S	T	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	F	G	T	E	F	T	L	T	I	S	T	L			
6253	Q	Q	K	P	G	X	A	P	K	V	L	I	Y	W	A	S	N	L	E	G	G	V	P	S	R	F	S	G	T	G	S	G	T	E	F	A	L	T	I	S	G	L			
4497	Q	Q	R	P	G	Q	P	P	R	L	L	I	H	W	A	S	T	R	K	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	F	G	T	D	F	T	L	T	I	S	G	L			
4487	Q	H	K	P	G	R	A	P	K	L	M	I	S	V	A	S	N	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	T	G	S	E	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	G	L			

ФІГ. 17А-2

		CDR L3 - Contact										CDR L3 - Chothia										CDR L3 - Kabat										Константна область, нумерація EU											
Нумерація за Kabat		79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	95a	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119
6078	Q	P	D	D	F	G	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	.	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	
6263	Q	P	D	D	F	G	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Y	S	.	F	N	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	
4450	E	P	E	D	F	A	M	Y	Y	C	H	K	Y	G	S	G	P	.	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	V	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	
6297	E	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	K	Y	G	S	G	P	.	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	
6239	Q	P	E	D	V	A	T	Y	Y	C	E	K	[C]	[N]	S	[T]	P	.	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	
6232	Q	P	E	D	F	A	V	Y	Y	C	Q	L	Y	T	S	S	R	A	L	T	F	G	G	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	
6259	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	L	Q	D	H	N	Y	P	.	P	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	
6292	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	L	Q	D	H	N	Y	P	.	P	T	F	S	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	
4462	Q	S	E	D	F	A	V	Y	Y	C	L	Q	Y	N	T	[W]	P	.	R	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	V	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	
6265	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	L	N	N	Y	V	.	H	S	F	G	P	G	T	K	L	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	
6253	Q	P	D	D	L	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	K	S	Q	.	[W]	S	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P		
4497	Q	A	E	D	V	A	I	Y	Y	C	Q	Q	Y	F	S	P	P	.	Y	T	F	G	Q	G	T	K	L	E	I	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	
4487	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	S	V	R	T	P	.	Y	T	F	G	Q	G	S	R	L	E	M	K	R	T	V	A	A	P	S	V	F	I	F	P	

Нумерація за EU		120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161
6078	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	N	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	
6263	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	N	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	
4450	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	N	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	
6297	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	N	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	
6239	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	N	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	
6232	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	N	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	
6259	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	N	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	
6292	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	N	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	
4462	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	N	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	
6265	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	N	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	
6253	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	N	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	
4497	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	N	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	
4487	P	S	D	E	Q	L	K	S	G	T	A	S	V	V	C	L	L	N	N	F	Y	P	R	E	A	K	V	Q	N	K	V	D	N	A	L	Q	S	G	N	S	Q	E	

ФІГ. 17А-3

Нумерація за EU	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203
6078	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
6263	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
4450	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
6297	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
6239	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
6232	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
6259	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
6292	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
4462	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
6265	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
6253	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
4497	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S
4487	S	V	T	E	Q	D	S	K	D	S	T	Y	S	L	S	S	T	L	T	L	S	K	A	D	Y	E	K	H	K	V	Y	A	C	E	V	T	H	Q	G	L	S	S

Нумерація за EU		204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214
6078	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	
6263	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	
4450	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	
6297	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	
6239	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	
6232	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	
6259	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	
6292	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	
4462	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	
6265	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	
6253	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	
4497	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	
4487	P	V	T	K	S	F	N	R	G	E	C	

*

* Амінокислота у положенні 205 за EU, позначена зірочкою, може бути замінена на Суз для кон'югації з лікарським засобом

	CDR H1 - Contact
CDR H1 - Chothia	

CDR H2 - Contact
CDR H2 - Chothia
CDR H2 - Kabat

ΦΠ. 17B-2

Константна область, нумерація EU

287

ФІГ. 17В-3

Нумерація за EU	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	
6078	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
6263	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
4450	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
6297	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
6239	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
6232	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
6259	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
6292	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
4462	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
6265	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
6253	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
4497	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C
4487	N	S	G	A	L	T	S	G	V	H	T	F	P	A	V	L	Q	S	S	G	L	Y	S	L	S	S	S	V	V	T	V	P	S	S	S	L	G	T	Q	T	Y	I	C

Нумерація за EU	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242
6078	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
6263	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
4450	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
6297	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
6239	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
6232	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
6259	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
6292	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
4462	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
6265	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
6253	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
4497	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L
4487	N	V	N	H	K	P	S	N	T	K	V	D	K	K	V	E	P	K	S	C	D	K	T	H	T	C	P	P	C	P	A	P	E	L	L	G	G	P	S	V	F	L

ФІГ. 17В-4

Нумерація за EU	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284
6078	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V
6263	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V
4450	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V
6297	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V
6239	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V
6232	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V
6259	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V
6292	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V
4462	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V
6265	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V
6253	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V
4497	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V
4487	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y	V	D	G	V	E	V

Нумерація за EU	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326
6078	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K
6263	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K
4450	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K
6297	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K
6239	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K
6232	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K
6259	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K
6292	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K
4462	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K
6265	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K
6253	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K
4497	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K
4487	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	Y	N	S	T	Y	R	V	V	S	V	L	T	V	L	H	Q	D	W	L	N	G	K	E	Y	K	C	K	V	S	N	K

ФІГ. 17В-5

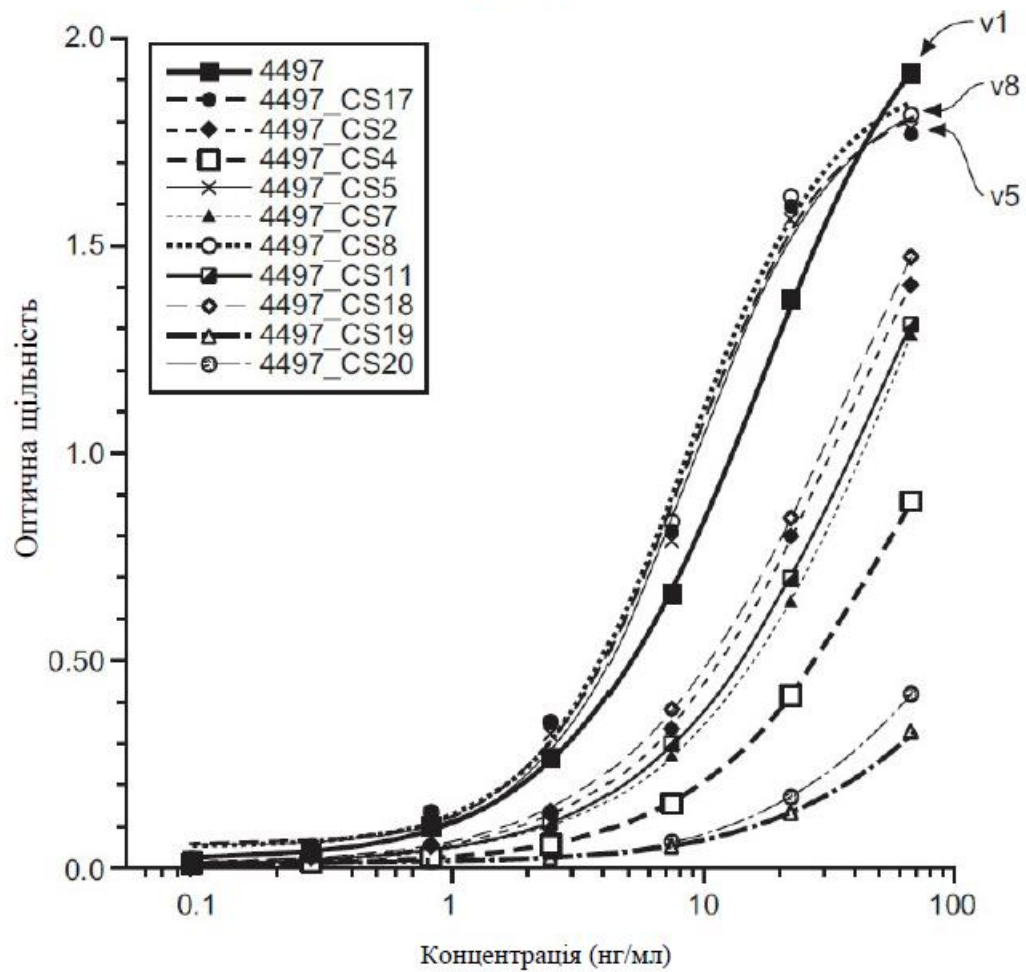
Нумерація за EU	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368
6078	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L
6263	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L
4450	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L
6297	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L
6239	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L
6232	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L
6259	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L
6292	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L
4462	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L
6265	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L
6253	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L
4497	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L
4487	A	L	P	A	P	I	E	K	T	I	S	K	A	K	G	Q	P	R	E	P	Q	V	Y	T	L	P	P	S	R	E	E	M	T	K	N	Q	V	S	L	T	C	L

Нумерація за EU	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410
6078	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	P	F	L	Y	S	K	L
6263	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	P	F	L	Y	S	K	L
4450	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	P	F	L	Y	S	K	L
6297	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	P	F	L	Y	S	K	L
6239	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	P	F	L	Y	S	K	L
6232	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	P	F	L	Y	S	K	L
6259	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	P	F	L	Y	S	K	L
6292	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	P	F	L	Y	S	K	L
4462	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	P	F	L	Y	S	K	L
6265	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	P	F	L	Y	S	K	L
6253	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	P	F	L	Y	S	K	L
4497	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	P	F	L	Y	S	K	L
4487	V	K	G	F	Y	P	S	D	I	A	V	E	W	E	S	N	G	Q	P	E	N	N	Y	K	T	T	P	P	V	L	D	S	D	G	S	P	F	L	Y	S	K	L

ФІГ. 17В-6

Нумерація за EU	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446
6078	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6263	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
4450	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6297	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6239	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6232	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6259	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6292	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
4462	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6265	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
6253	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
4497	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G
4487	T	V	D	K	S	R	W	Q	Q	G	N	V	F	S	C	S	V	M	H	E	A	L	H	N	H	Y	T	Q	K	S	L	S	L	S	P	G

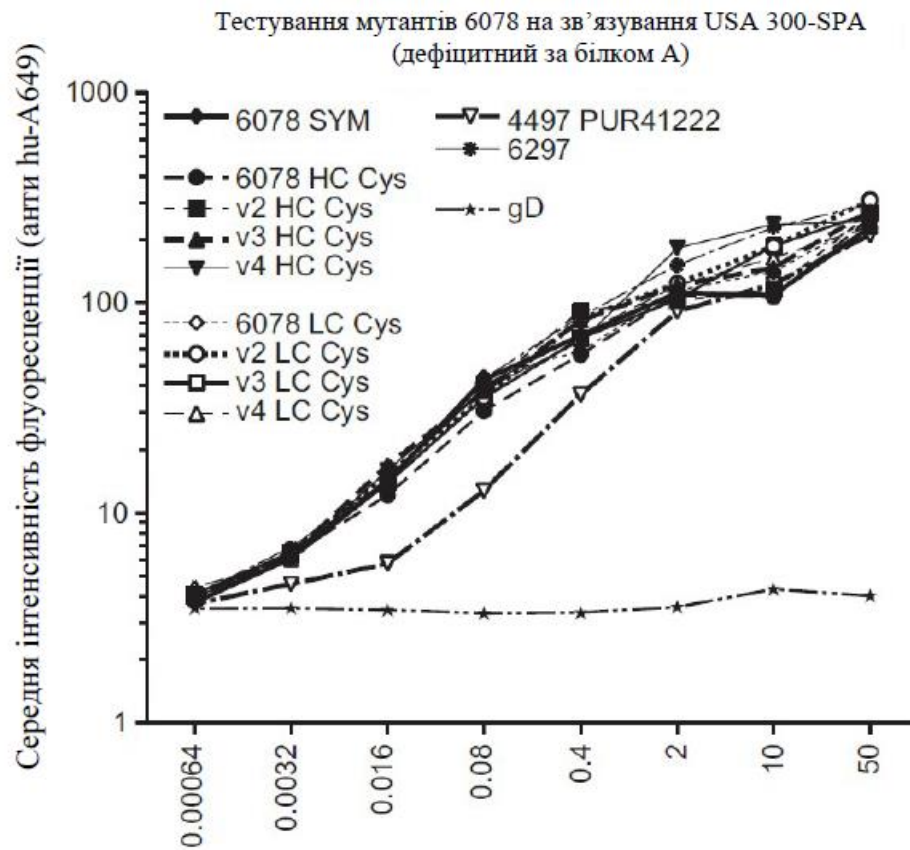
ФІГ. 18А



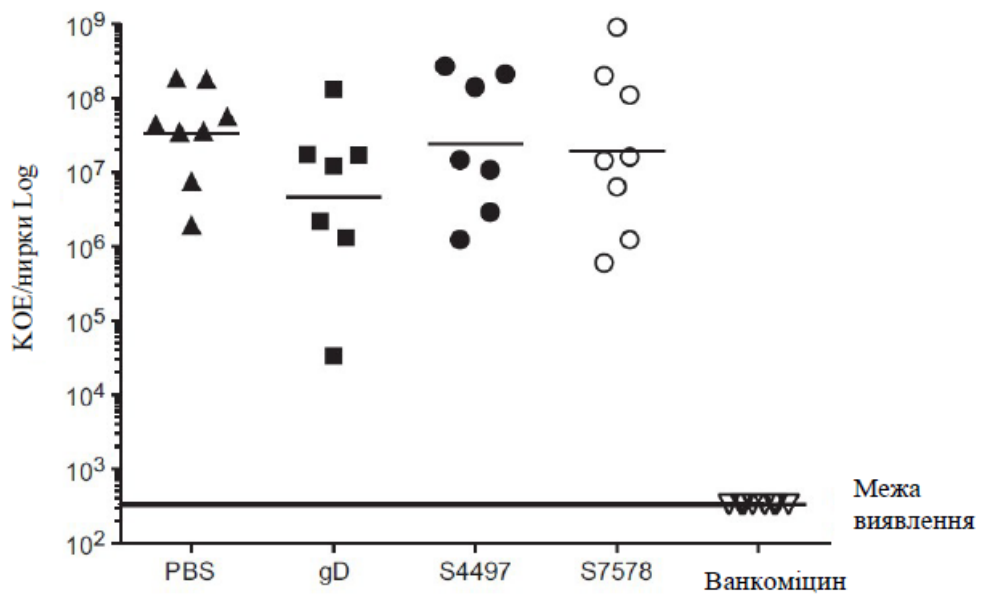
ФІГ. 18В

	93	94	95	96	97	98	99	101	102	ELISA
WT (v1)	A	R	G	D	G	G	L	D	D	+++
v7				D	G				E	+
v2				D	G				Y	+
v4				D	A				D	+
v19				D	A				E	+/-
v8				E	G				D	+++
v20				E	G				E	+/-
v5				A	G				D	++
v11				A	G				E	+
v18				A	G				Y	+

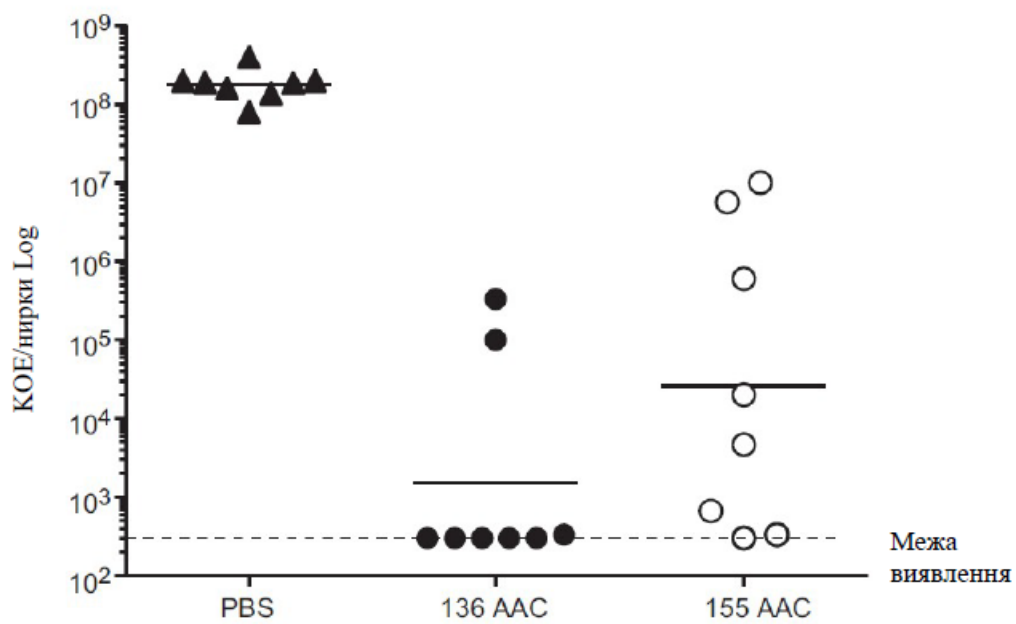
ФІГ. 19



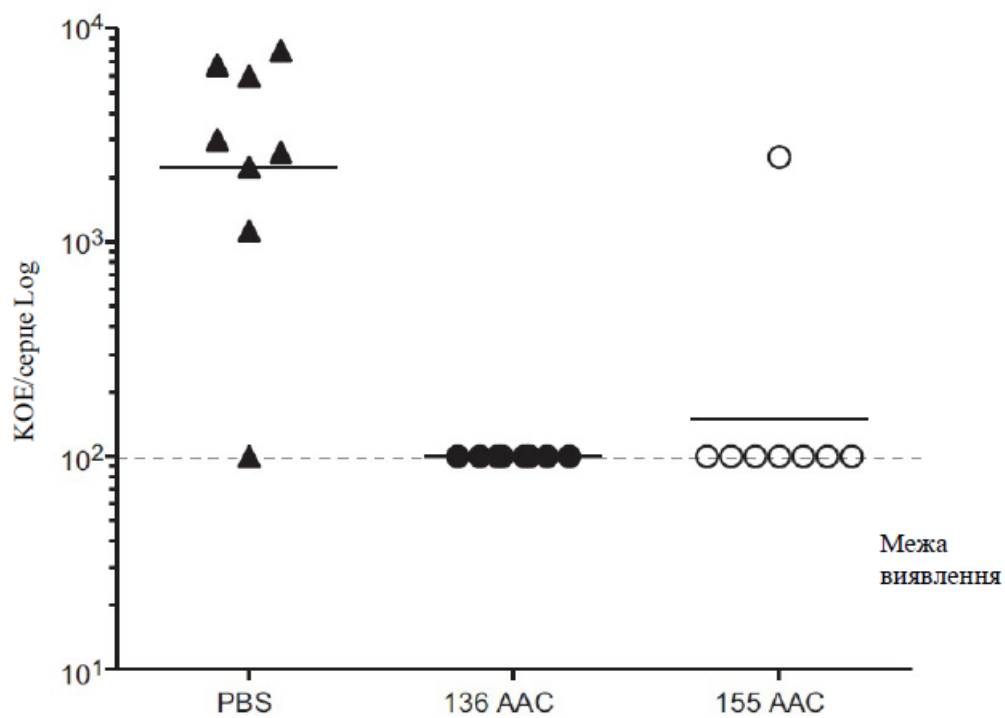
ФІГ. 20



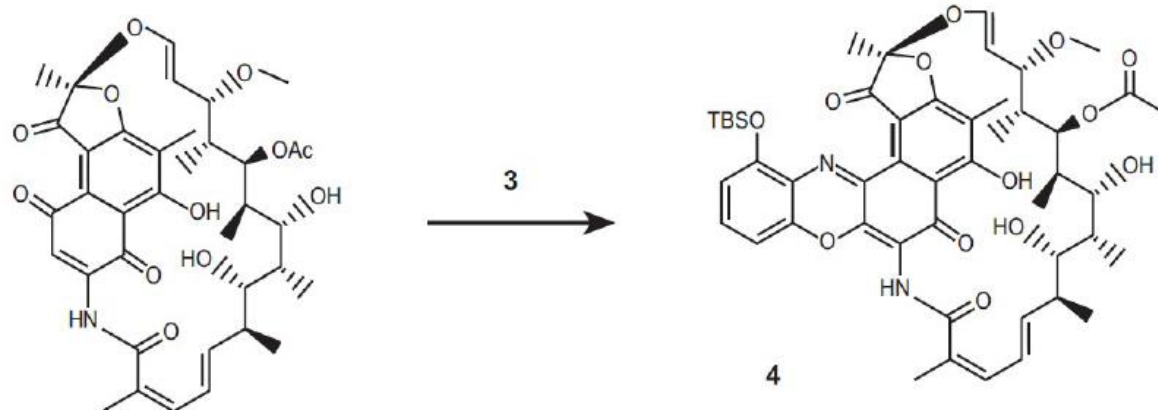
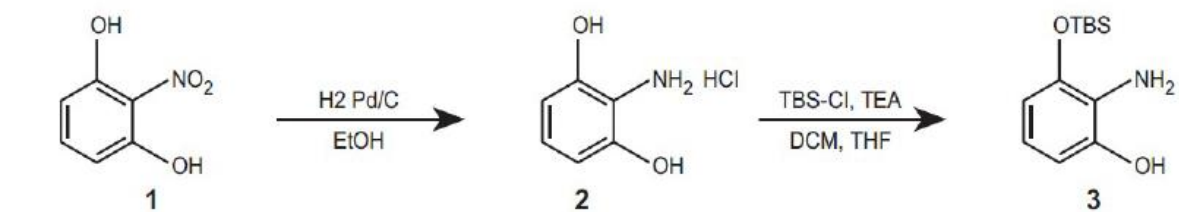
Фиг. 21



Фиг. 22

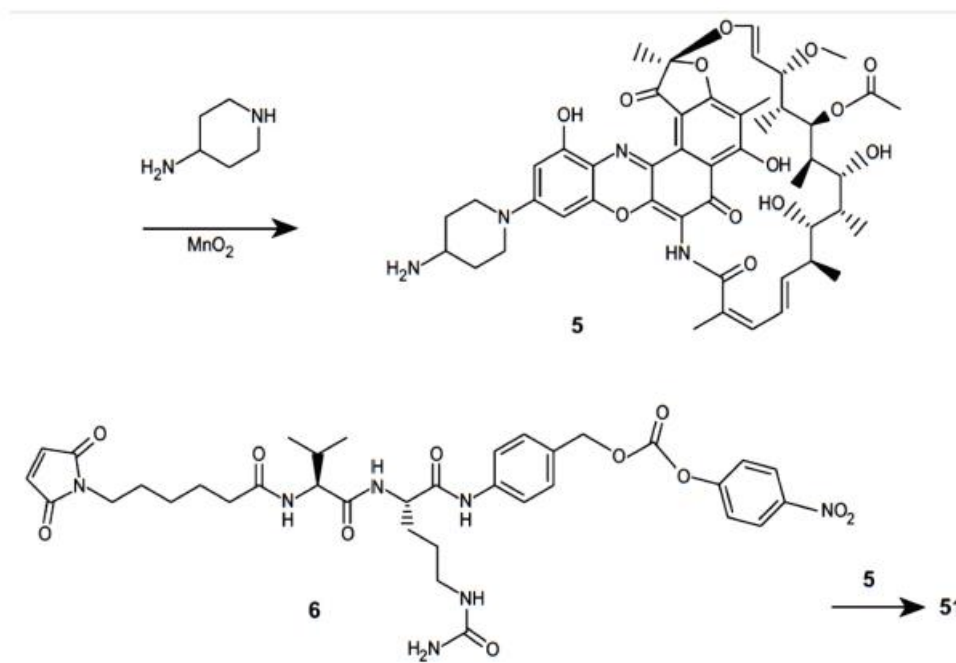


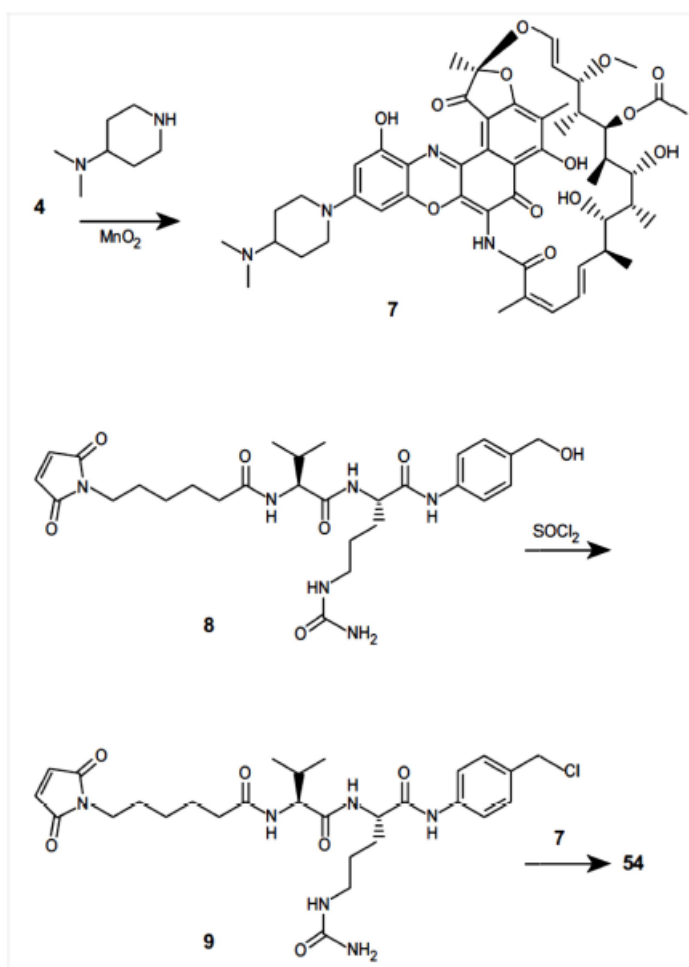
ФІГ. 23А



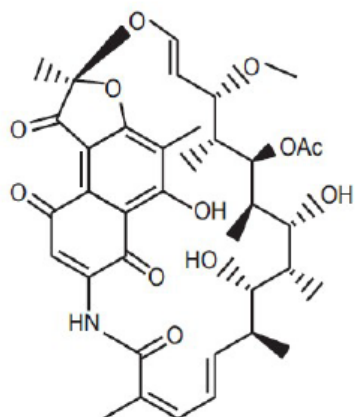
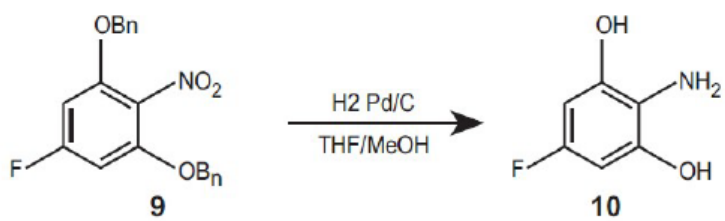
Рифаміцин S

ФІГ. 23В



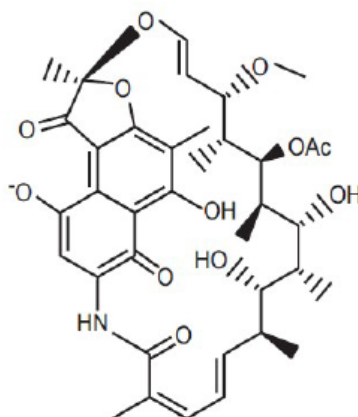


ФП. 25А

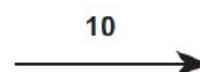


Рифаміцин S

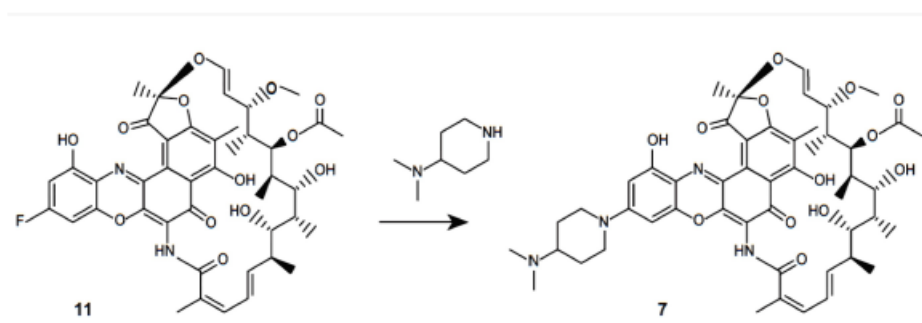
або



Натрієва сіль рифаміцину SV

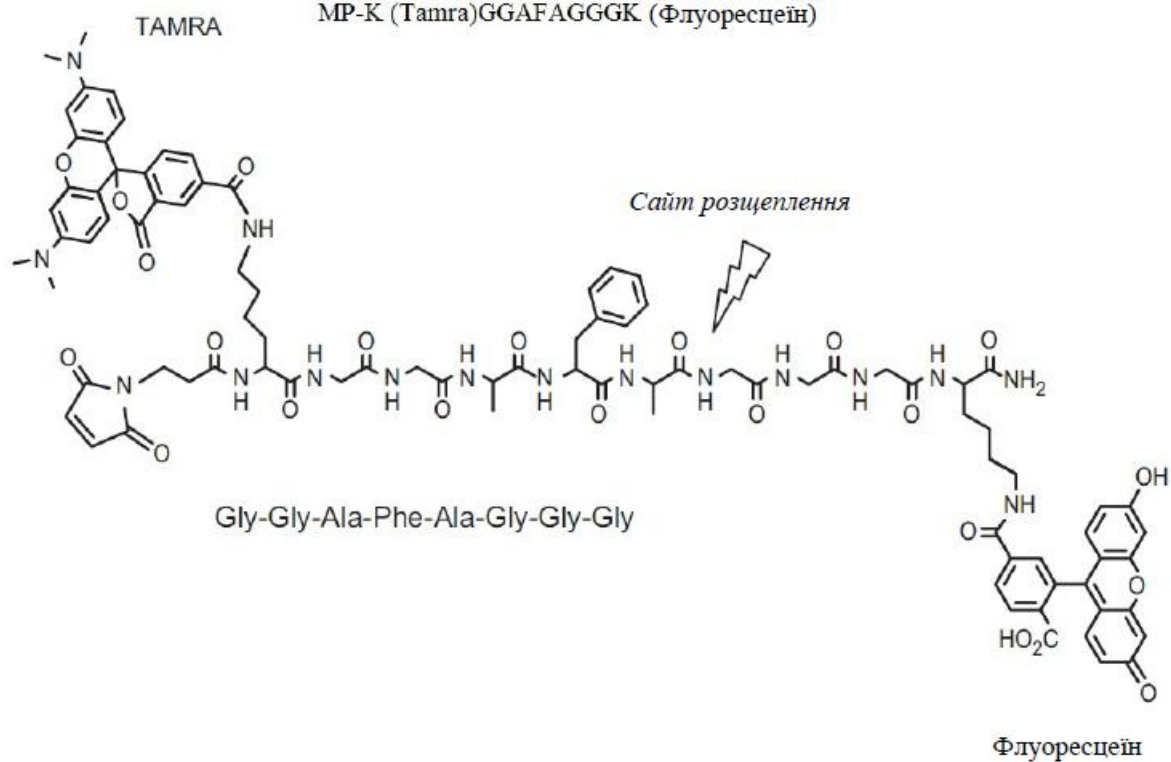


ФП. 25В

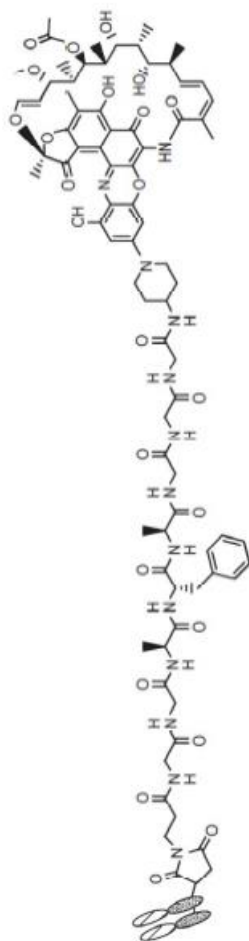


ФІГ. 26

FRET субстрат для підтвердження розщеплення
MP-K (Tamra)GGAFAAGGGK (Флуоресцеїн)

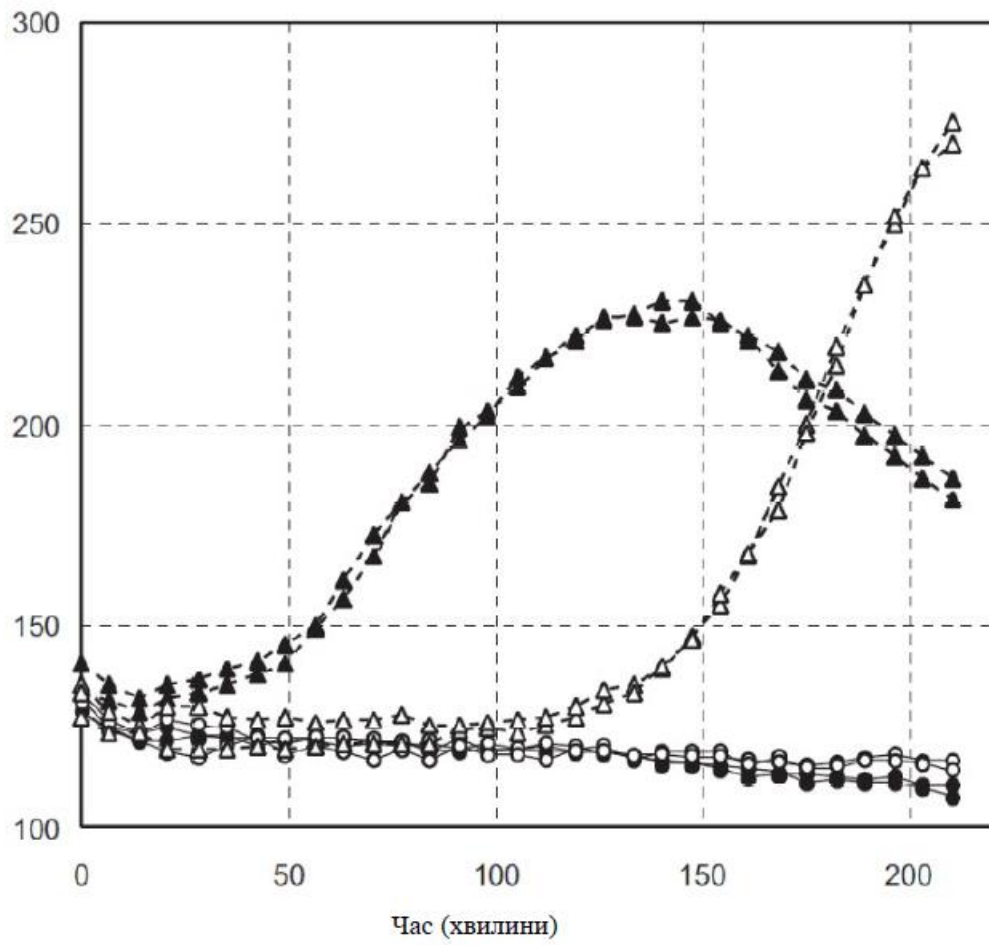


ФП. 27



ФІГ. 28

Wood46

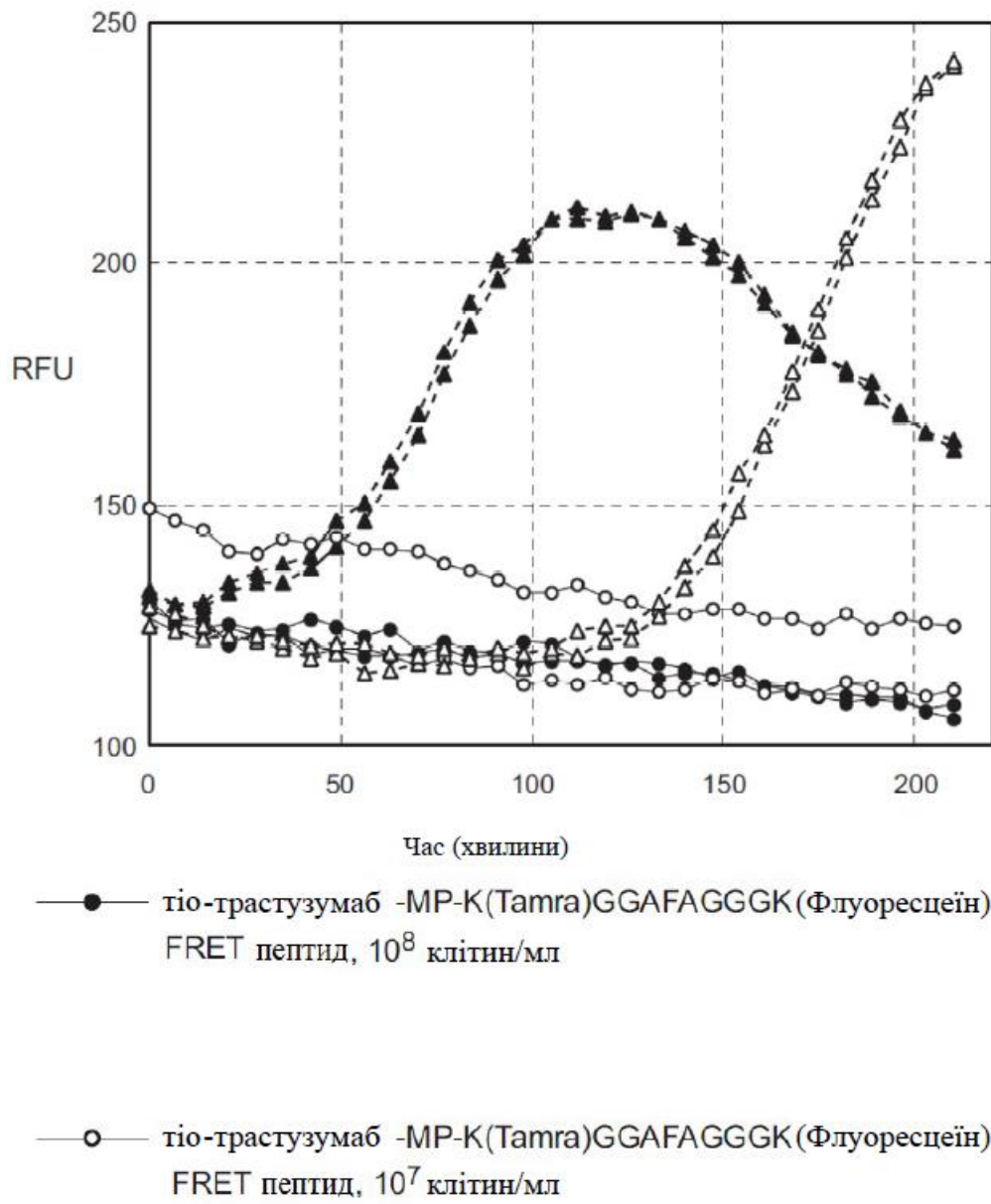


--▲-- tio -S4497-MP-K(Tamra)GGAFAGGGK(Флуоресцеїн)
FRET пептид, 10^8 клітин/мл

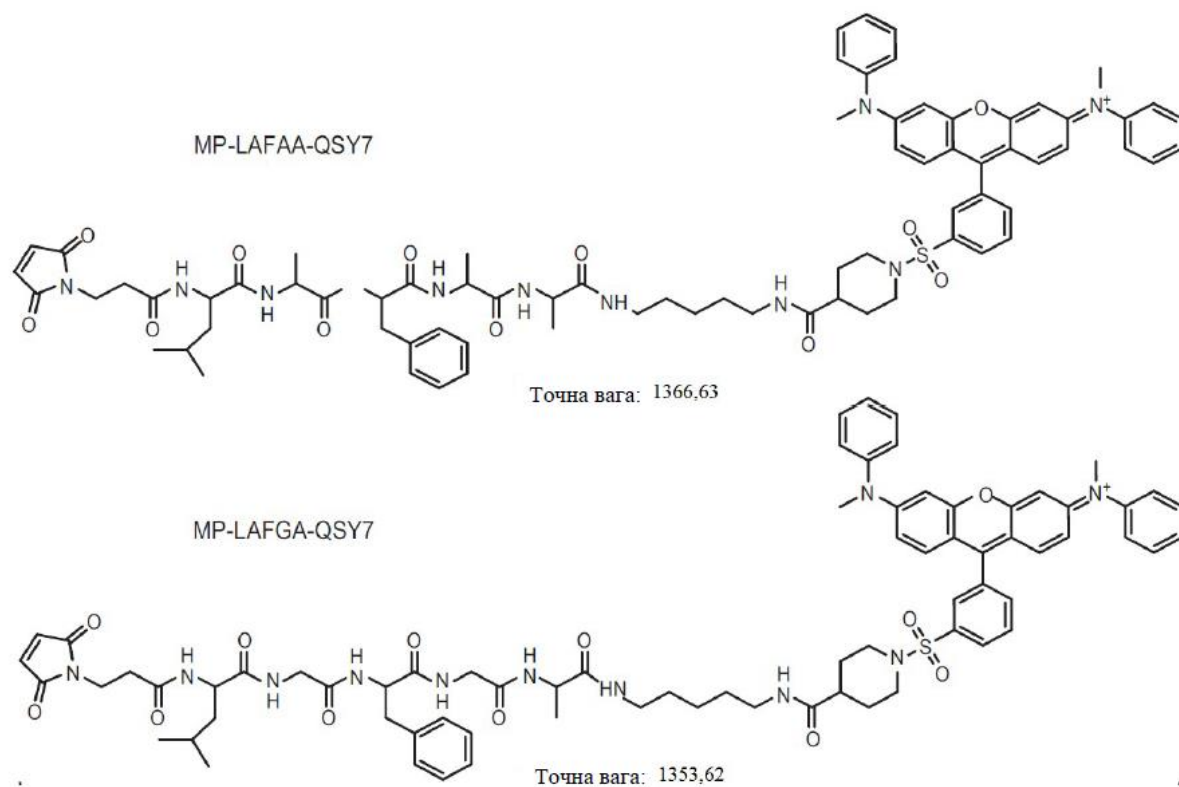
--△-- tio -S4497-MP-K(Tamra)GGAFAGGGK(Флуоресцеїн)
FRET пептид, 10^7 клітин/мл

ФІГ. 29

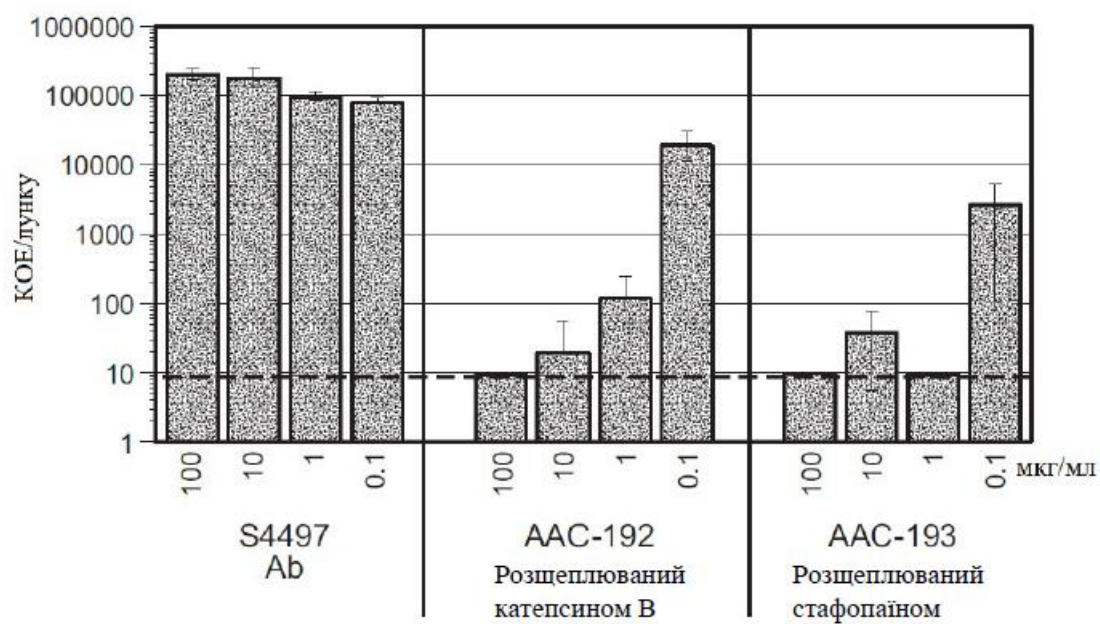
USA300



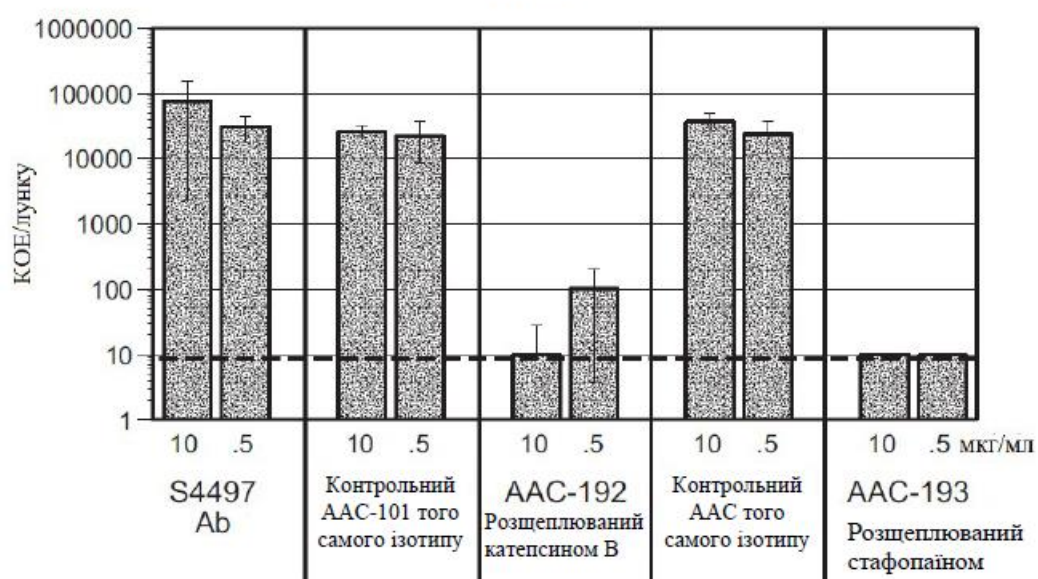
ФІГ. 30



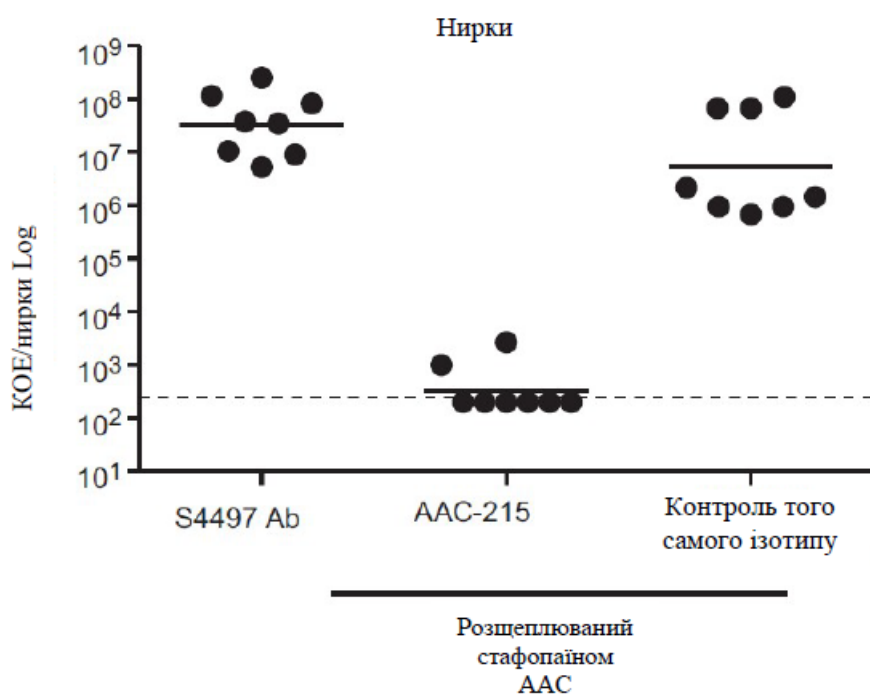
ФІГ. 31



ФІГ. 32

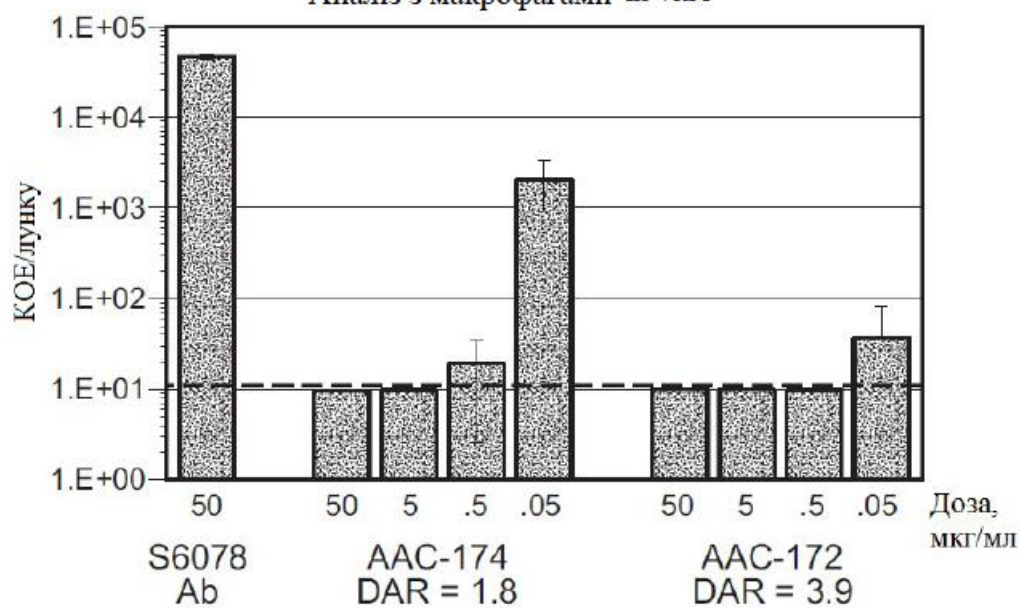


ФІГ. 33

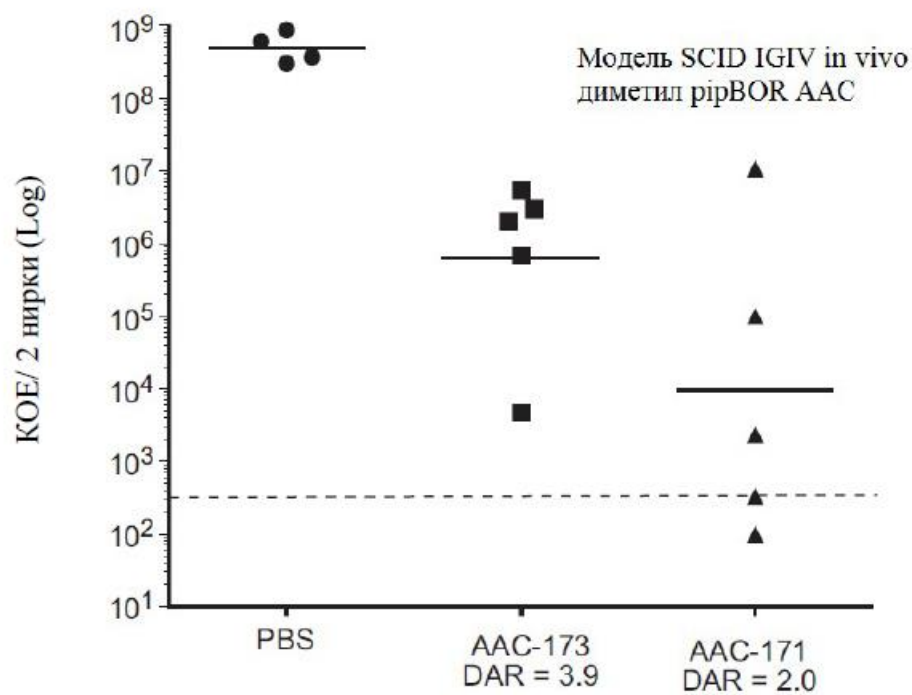


ФІГ. 36

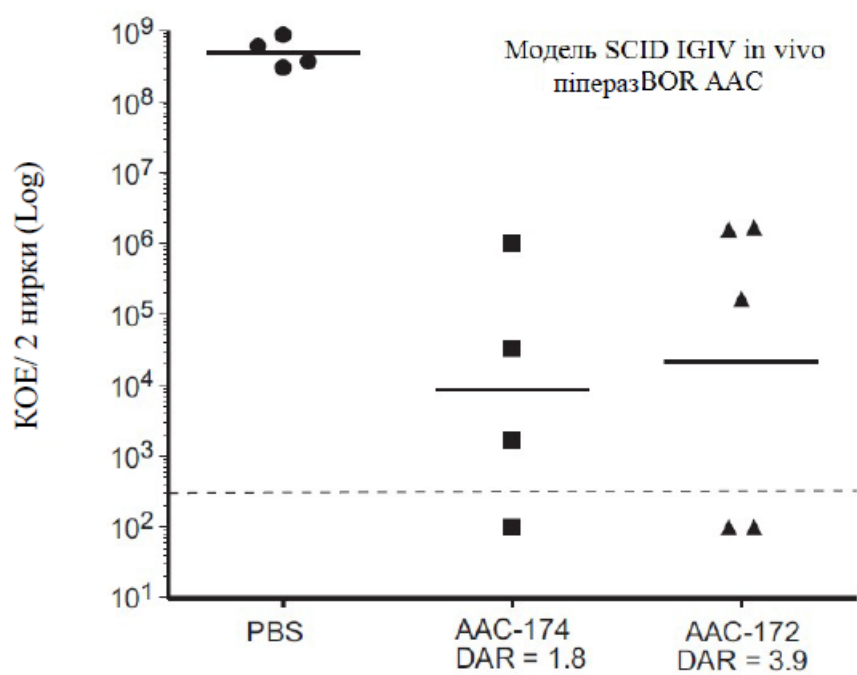
Аналіз з макрофагами *in vitro*



ФІГ. 37



ФІГ. 38



Комп'ютерна верстка М. Мацело

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601