

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **034886**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента

**2020.04.02**

(21) Номер заявки

**201691669**

(22) Дата подачи заявки

**2015.03.19**(51) Int. Cl. **C07K 14/765** (2006.01)**A61K 38/39** (2006.01)**A61K 47/48** (2006.01)**C07K 14/78** (2006.01)**C12N 15/62** (2006.01)(54) **СВЯЗЫВАЮЩИЕ СЫВОРОТОЧНЫЙ АЛЬБУМИН ДОМЕНЫ ФИБРОНЕКТИНА III ТИПА**(31) **61/968,181**(32) **2014.03.20**(33) **US**(43) **2017.01.30**(86) **PCT/US2015/021535**(87) **WO 2015/143199 2015.09.24**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**БРИСТОЛ-МАЙЕРС СКВИББ  
КОМПАНИ (US)**

(72) Изобретатель:

**Митчелл Трейси С., Госселин  
Майкл Л., Липовсек Даса, Паркер  
Рекс, Камфаузен Рэй, Дэвис  
Джонатан, Фабрицио Давид (US)**

(74) Представитель:

**Угрюмов В.М., Карпенко О.Ю.,  
Гизатуллина Е.М., Лыу Т.Н.,  
Дементьев В.Н., Глухарёва А.О.,  
Строкова О.В. (RU)**(56) **WO-A2-2011140086****WO-A1-2009133208****WO-A1-2011103105**

PETER-CHRISTIAN KLÖHN ET AL.: "IBC's 23rd Annual Antibody Engineering, 10th Annual Antibody Therapeutics International Conferences and the 2012 Annual Meeting of The Antibody Society: December 3-6, 2012, San Diego, CA", MABS, vol. 5, no. 2, 1 March 2013 (2013-03-01), pages 178-201, XP055137110, ISSN: 1942-0862, DOI:10.4161/mabs.23655, page 194, right-hand column

**WO-A1-2011130354****WO-A2-2014165093****WO-A2-2008096158****WO-A2-2009083804**

LIPOVSEK D.: "Adnectins: engineered target-binding protein therapeutics", PROTEIN ENGINEERING, DESIGN AND SELECTION, OXFORD JOURNAL, LONDON, GB [Online], vol. 24, no. 1-2, Sp. Iss. SI, 10 November 2010 (2010-11-10), pages 3-9, XP008153459, ISSN: 1741-0126, DOI:DOI:10.1093/PROTEIN/GZQ097, the whole document

SLEEP DARRELL ET AL.: "Albumin as a versatile platform for drug half-life extension", BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA) - GENERAL SUBJECTS, vol. 1830, no. 12, 29 April 2013 (2013-04-29), pages 5526-5534, XP028740219, ISSN: 0304-4165, DOI:10.1016/J.BBAGEN.2013.04.023, the whole document

(57) Изобретение относится к полипептидам, которые включают десятые домены фибронектина III типа ( $^{10}\text{Fn3}$ ), которые связываются с сывороточным альбумином, с заменами в петле "южного полюса". Настоящее изобретение дополнительно относится к гибридным молекулам, содержащим связывающий сывороточный альбумин  $^{10}\text{Fn3}$ , соединенный с гетерологичным белком, для применения в диагностических и терапевтических целях.

**B1****034886****034886****B1**

### Ссылка на родственную заявку

В соответствии с заявкой на настоящий патент испрашивается приоритет согласно предварительной заявке на выдачу патента США № 61/968181 под названием "Новые связывающие сывороточный альбумин домены фибронектина III типа (Novel Serum Albumin-Binding Fibronectin Type III Domains)", поданной 20 марта 2014 г., содержимое которой, таким образом, включено в настоящее описание с помощью ссылки во всей его полноте.

### Уровень техники

Неудовлетворительные периоды полужизни терапевтических средств часто делают необходимым их введение с высокой частотой и/или с более высокими дозами или применение составов с замедленным высвобождением для того, чтобы сохранить уровни в сыворотке, необходимые для достижения терапевтических эффектов. Кроме того, это часто связано с отрицательными побочными эффектами. Например, частые систематические введения инъекцией обеспечивают существенный дискомфорт субъекту и подвергают высокому риску, связанному с введением инфицирования, и могут предусматривать госпитализацию или частые визиты в больницу, в частности при необходимости внутривенного введения терапевтического средства. Кроме того, при долгосрочных схемах лечения ежедневные внутривенные введения инъекцией также могут приводить к существенным побочным эффектам в виде рубцевания ткани и патологии сосудов, вызванным периодическим прокалыванием сосудов. Схожие проблемы известны для всех частых системных введений терапевтических средств, таких как, например, введение инсулина больному сахарным диабетом или лекарственных средств на основе интерферона пациентам, страдающим рассеянным склерозом. Все эти факторы приводят к понижению у пациента согласия соблюдать режим и повышения затрат для системы здравоохранения.

В настоящем патенте предложены соединения, которые повышают период полужизни в сыворотке различных терапевтических средств, соединения с повышенным периодом полужизни в сыворотке и способы повышения у терапевтических средств периода их полужизни в сыворотке. Такие соединения и способы повышения у терапевтических средств периода их полужизни в сыворотке могут быть реализованы рентабельным путем, могут сохранять необходимые биофизические свойства (например, T<sub>m</sub>, практически мономерное состояние или правильную укладку) и обладать достаточно малым размером для обеспечения их проникновения в ткань.

### Краткое раскрытие настоящего изобретения

Настоящее изобретение основано, по меньшей мере частично, на открытии новых аднектинов (аднектинов РКЕ2), содержащих десятый домен фибронектина III типа (<sup>10</sup>F<sub>n3</sub>), связывающегося с сывороточным альбумином за счет петли "южного полюса", которые обеспечивают улучшенные свойства относительно аднектинов, содержащих <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> домен, связывающий сывороточный альбумин за счет петли "северного полюса".

В соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> домен, причем <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> домен содержит а) петли АВ, ВС, CD, DE, EF и FG, b) петлю CD с измененной аминокислотной последовательностью по отношению к последовательности соответствующей петле CD человеческого <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> домена и с) причем полипептид связывается с сывороточным альбумином человека с K<sub>D</sub> менее 500 нМ.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> домен дополнительно связывается с одним или несколькими из сывороточного альбумина макака-резуса, сывороточного альбумина яванского макака, сывороточного альбумина мыши и сывороточного альбумина крысы. Например, <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> домен может связываться с HSA, сывороточным альбумином макака-резус и сывороточным альбумином яванского макака, или <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> домен может связываться с HSA, сывороточным альбумином макака-резус, сывороточным альбумином яванского макака, сывороточным альбумином мыши и сывороточным альбумином крысы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> домен связывается с соответствующим сывороточным альбумином с K<sub>D</sub> менее 500 нМ, например, с K<sub>D</sub> менее 100 нМ или даже K<sub>D</sub> менее 10 нМ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> домен связывается с сывороточным альбумином в диапазоне рН от 5,5 до 7,4.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> домен связывается с доменом I-II HSA.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления период полужизни в сыворотке полипептида, содержащего <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> домен, в присутствии сывороточного альбумина человека составляет по меньшей мере 10 ч, как, например, по меньшей мере 20 ч или по меньшей мере 30 ч.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления петля CD содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле G-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-V-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-S-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-G-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-Y-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub>-X<sub>12</sub>-E (SEQ ID NO: 170), где

- (a) X<sub>1</sub> выбран из группы, состоящей из R или W;
- (b) X<sub>2</sub> выбран из группы, состоящей из H, E, D, Y или Q;
- (c) X<sub>3</sub> выбран из группы, состоящей из Q или H;
- (d) X<sub>4</sub> выбран из группы, состоящей из I, K, M, Q, L или V;
- (e) X<sub>5</sub> выбран из группы, состоящей из Y, F или N;

- (f) X<sub>6</sub> выбран из группы, состоящей из D, V или E;
- (g) X<sub>7</sub> выбран из группы, состоящей из L, W или F; (h) X<sub>8</sub> выбран из группы, состоящей из P или T;
- (i) X<sub>9</sub> выбран из группы, состоящей из L или M;
- (j) X<sub>10</sub> выбран из группы, состоящей из I или V;
- (k) X<sub>11</sub> выбран из группы, состоящей из Y или F; и
- (l) X<sub>12</sub> выбран из группы, состоящей из T, S, Q, N или A.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления (a) X<sub>1</sub> представляет собой R; (b) X<sub>2</sub> представляет собой E; (c) X<sub>3</sub> представляет собой Q; (d) X<sub>4</sub> представляет собой K; (e) X<sub>5</sub> представляет собой Y; (f) X<sub>6</sub> представляет собой D; (g) X<sub>7</sub> представляет собой L или W; (h) X<sub>8</sub> представляет собой P; (i) X<sub>9</sub> представляет собой L; (j) X<sub>10</sub> представляет собой I; (k) X<sub>11</sub> представляет собой Y и (l) X<sub>12</sub> представляет собой Q или N.

В соответствии с еще одним предпочтительным вариантом осуществления (a) X<sub>1</sub> представляет собой R; (b) X<sub>2</sub> представляет собой E; (c) X<sub>3</sub> представляет собой Q; (d) X<sub>4</sub> представляет собой K; (e) X<sub>5</sub> представляет собой Y; (f) X<sub>6</sub> представляет собой D; (g) X<sub>7</sub> представляет собой L; (h) X<sub>8</sub> представляет собой P; (i) X<sub>9</sub> представляет собой L; (j) X<sub>10</sub> представляет собой I; (k) X<sub>11</sub> представляет собой Y и (l) X<sub>12</sub> представляет собой Q.

В соответствии с еще одним предпочтительным вариантом осуществления (a) X<sub>1</sub> представляет собой R; (b) X<sub>2</sub> представляет собой E; (c) X<sub>3</sub> представляет собой Q; (d) X<sub>4</sub> представляет собой K; (e) X<sub>5</sub> представляет собой Y; (f) X<sub>6</sub> представляет собой D; (g) X<sub>7</sub> представляет собой W; (h) X<sub>8</sub> представляет собой P; (i) X<sub>9</sub> представляет собой L; (j) X<sub>10</sub> представляет собой I; (k) X<sub>11</sub> представляет собой Y и (l) X<sub>12</sub> представляет собой N.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления петля CD содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 101-125. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления петля CD содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 106 или 113.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления настоящее изобретение относится к полипептиду, содержащему <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 домен, содержащий (i) петлю CD, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую консенсусную последовательность SEQ ID NO: 170, или аминокислотную последовательность под любой одной из SEQ ID NO: 101-125, и (ii) аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична отличным от петли CD участкам под SEQ ID NO: 23-100, 184-209 и 235-260 или которая отличается от одной из SEQ ID NO: 23-100, 184-209 и 235-260 не более чем на 1, 1-2, 1-5, 1-10 или 1-20 аминокислот. В соответствии с конкретными вариантами осуществления полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 23-100, 184-209 и 235-260 или которая отличается от одной из SEQ ID NO: 23-100, 184-209 и 235-260 не более чем на 1, 1-2, 1-5, 1-10 или 1-20 аминокислот. Аминокислотные отличия могут представлять собой замены, присоединения или делеции.

В соответствии с конкретными аспектами настоящее изобретение относится к гибриднему полипептиду, содержащему десятый домен фибронектина III типа (<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3) и гетерологичный белок, причем <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 домен содержит а) петли AB, BC, CD, DE, EF и FG, б) петлю CD с измененной аминокислотной последовательностью по отношению к последовательности соответствующей петли человеческого <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 домена, и с) причем полипептид связывается с сывороточным альбумином человека с K<sub>D</sub> менее 500 нМ.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления гибридный полипептид содержит связывающий альбумин аднектин, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 23-100, 184-209 и 235-260 или которая отличается от одной из SEQ ID NO: 23-100, 184-209 и 235-260 не более чем на 1, 1-2, 1-5, 1-10 или 1-20 аминокислот. В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления гибридный полипептид содержит связывающий альбумин аднектин, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 55, 81, 190 или 241. В соответствии с еще другим предпочтительным вариантом осуществления гибридный полипептид содержит связывающий альбумин аднектин, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, 88, 197 или 248.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления гибридный полипептид содержит связывающий альбумин аднектин и гетерологичный фрагмент, причем гетерологичный фрагмент представляет собой терапевтический фрагмент.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления гетерологичный белок представляет собой полипептид, содержащий <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 домен. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 домен связывается с отличным от сывороточного альбумина целевым белком. В соответствии с одним вариантом осуществления <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 домен связывается с PCSK9 (т.е. аднектином PCSK9) и содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 167 или которая отличается от SEQ ID NO: 167 не более чем на 1, 1-2, 1-5, 1-10 или 1-20 аминокислот.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления гибридный полипептид представляет

собой тандемный аднектин PCSK9-PKE2, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 168, 169 или 261 или которая отличается от одной из SEQ ID NO: 168, 169 или 261 не более чем на 1, 1-2, 1-5, 1-10 или 1-20 аминокислот (и может содержать или не содержать N-концевой метионин).

В соответствии с конкретными вариантами осуществления период полужизни в сыворотке гибридного полипептида в присутствии сывороточного альбумина мыши составляет по меньшей мере 10 ч. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления период полужизни в сыворотке гибридного полипептида в присутствии сывороточного альбумина яванского макака составляет по меньшей мере 50 ч. В соответствии с конкретными вариантами осуществления период полужизни в сыворотке гибридного полипептида в присутствии сывороточного альбумина мыши или сывороточного альбумина яванского макака составляет 10-100 ч, как, например, 10-90, 10-80, 10-70, 10-60, 10-50, 10-40, 10-30, 10-20, 50-100, 60-100, 70-100, 80-100, 90-100, 20-90, 30-80, 40-70 или 50-60 ч.

В соответствии с конкретными аспектами настоящего изобретения относится к аднектину PKE2 или тандемному аднектину PCSK9-PKE2, содержащему аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-100, 168, 169, 184-209, 235-260 и 261.

В соответствии с конкретными аспектами настоящее изобретение относится к композиции, содержащей любой из связывающих альбумин аднектинов или гибридных белков, включая такие, которые описаны в настоящем документе, и носитель.

В соответствии с конкретными аспектами настоящее изобретение относится к выделенной молекуле нуклеиновой кислоты, кодирующей любой из связывающих альбумин аднектинов или гибридных белков, включая такие, которые описаны в настоящем документе, например, такие, которые изложены в SEQ ID NO: 126-151 и 172, к векторам экспрессии, кодирующим молекулы нуклеиновой кислоты, и к клеткам, содержащим такие молекулы нуклеиновой кислоты. Также настоящее изобретение относится к нуклеиновым кислотам, содержащим нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% идентична любой из таких нуклеотидных последовательностей, которые описаны в настоящем документе или которые отличаются от них не более чем на 1-5, 1-10, 1-50 или 1-100 нуклеотидов.

В соответствии с конкретными аспектами настоящее изобретение относится к способу получения связывающих альбумин аднектинов или гибридных белков, в том числе таких, которые описаны в настоящем документе, предусматривающему культивирование клетки, содержащей молекулы нуклеиновой кислоты, которые их кодируют, в условиях, подходящих для экспрессии аднектинов или гибридных белков, и их очистку.

#### Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана блок-схема конкурентного анализа alpha-screen, описываемого в разделе пример 6.

Фиг. 2 представляет собой график, отображающий конкуренцию различных аднектинов с человеческим рецептором FcRn за связывание с сывороточным альбумином человека (HSA).

Фиг. 3 представляет собой график, отображающий период полужизни в плазме аднектинов PKE2 2629\_E06 и 2630\_D02 у мышей WT.

Фиг. 4 представляет собой график, отображающий результаты Т-клеточной пролиферации для процента антигенности и и эффективности пролиферативных реакций на аднектины 2629\_E06 и 2630\_D02 и исходную молекулу 2270\_C01.

На фиг. 5 проиллюстрировано сравнение модульности тандемных аднектинов. Аднектин 1318\_H04 соответствует аднектину, связывающему сывороточный альбумин за счет петли "северного полюса". "X" относится к конфигурации специфичного к отличной от PKE цели аднектина (т.е. миостатину; "myo" или PCSK9). В нижней секции указана легенда для оттенков серого в каждом прямоугольном поле, которые соответствуют соотношениям тандем:моноаднектин для EC<sub>50</sub> связывания HSA, по результатам определения при помощи ИФА с непосредственным связыванием (т.е. чем темнее оттенок серого, тем сильнее связывание с HSA).

На фиг. 6 показаны сенсограммы интерферометрии биослоя тандемных аднектинов PCSK9-PKE2, связывающихся с hPCSK9, в присутствии или в отсутствии HSA.

Фиг. 7 представляет собой сенсограмму Biacore, на которой видно связывание тандемного аднектина PCSK9-PKE2 4472C06 сначала с HSA, а затем с PCSK9 после введения инъекцией соответствующих белков.

Фиг. 8 представляет собой график, на котором изображен PK профиль in vivo тандемного аднектина PCSK9-PKE2 4772\_C06 у мышей C57 B1/6 дикого типа.

На фиг. 9 показаны уровни свободного PCSK9 после введения дозы наполнителя или аднектина PCSK9-PKE2 4472\_C06 в количестве 0,5 мг/кг или 2 мг/кг у трансгенных мышей hPCSK9.

Фиг. 10 представляет собой график, на котором изображены PK профили и периоды полужизни в плазме аднектина PKE2 2629\_E06, аднектина 5190\_E01, представляющего собой тандем PCSK9-PKE2, и пгилированного PCSK9 у яванских макаков.

Фиг. 11 представляет собой график, на котором изображен период полужизни в плазме аднектина

PKE2 2270\_C01 у яванских макаков.

Фиг. 12 представляет собой график, на котором показан фармакодинамический профиль LDL-с и PCSK9 у яванских макаков после введения тандемного аднектина PCSK9-PKE2 5190\_E01 яванским макакам. На профиле видно сильное понижение LDL-с, ингибирование свободного PCSK9 и повышение общего PCSK9, при этом все они возвращаются на исходный уровень к концу исследования.

Фиг. 13 представляет собой график, на котором изображены понижающие LDL-с эффекты аднектина 5190\_E01, представляющего собой тандем PCSK9-PKE2, и препарата сравнения, представляющего собой пэгилированный аднектин PCSK9, наряду с контрольным 2629\_E06 PKE2 у яванских макаков.

На фиг. 14 показано захват цели тандемным аднектином PCSK9-PKE2 в двух различных концентрациях по сравнению с пэгилированным аднектином PCSK9 и аднектином PKE2 2629\_E06 у яванских макаков.

На фиг. 15 показаны общие уровни PCSK9 с течением времени у яванских макаков после введения тандемного аднектина PCSK9-PKE2, пэгилированного аднектина PCSK9 или аднектина PKE2 2629\_E06.

Фиг. 16 представляет собой график, на котором изображены результаты Т-клеточной пролиферации в виде процента и эффективности пролиферативных реакций на тандемные аднектины PCSK9-PKE2 4472\_F08, 4472\_E06 и 4472\_C06, а также входящий в состав аднектин PKE2 2629\_E06 и входящий в состав аднектин PCSK9 2382\_D09. Столбцы на левом краю графика относятся к контрольным белкам с низкой, средней и высокой антигенностью.

На фиг. 17 показаны аминокислотные последовательности описываемых в настоящем документе аднектинов PKE2.

На фиг. 18A-18C показаны нуклеотидные последовательности описываемых в настоящем документе аднектинов PKE2 и тандемных аднектинов PCSK9-PKE2.

### **Подробное раскрытие настоящего изобретения** **Определения**

Если не указано иное, все применяемые в настоящем документе технические и научные термины имеют такое же значение, которое обычно понимается специалистом в настоящей области. Хотя при практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения можно применять любые способы и композиции, сходные или эквивалентные описанным в настоящем документе, в настоящем документе описаны предпочтительные способы и композиции.

В контексте настоящего описания "полипептид" относится к любой последовательности из двух или более аминокислот, независимо от длины, посттрансляционной модификации или функции. В настоящем документе "полипептид", "пептид" и "белок" применяют взаимозаменяемо. Полипептиды могут включать встречающиеся в природе аминокислоты и не встречающиеся в природе аминокислоты, таких как описанные в патенте США № 6559126, который включен в настоящий документ при помощи ссылки. Полипептиды также можно модифицировать при помощи любого из ряда стандартных химических способов (например, аминокислоту можно модифицировать защитной группой; карбокси-концевую аминокислоту можно превратить в концевую амидную группу; amino концевой остаток можно модифицировать при помощи групп, например, для усиления липофильности; или полипептид можно химически гликозилировать или иначе модифицировать для повышения стабильности или периода полужизни *in vivo*). Полипептидные модификации могут включать присоединение другой структуры, такой как циклическое соединение или другая молекула, к полипептиду, а также могут включать полипептиды, которые содержат одну или несколько аминокислот в измененной конфигурации (т.е. R или S; или L или D).

В контексте настоящего описания "полипептидная цепь" относится к полипептиду, в котором каждый из его доменов присоединен к другому домену(доменам) при помощи пептидной связи(связей), а не нековалентных взаимодействий или дисульфидных связей.

"Выделенный" полипептид является полипептидом, который выявлен и отделен и/или выделен от компонента его естественной окружающей среды. Посторонние компоненты его естественной окружающей среды представляют собой материалы, которые могут препятствовать диагностическим или терапевтическим применениям полипептида и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные компоненты. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления полипептид будет очищен (1) до более 95% по массе полипептида, по результатам определения при помощи способа Лоури и наиболее предпочтительно до более 99% по массе, (2) до степени, достаточной для получения, по меньшей мере, остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с помощью секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до однородности при помощи SDS-PAGE в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с применением красителя Кумасси синего или, предпочтительно, серебрянки. Выделенный полипептид включает полипептид *in situ* в рекомбинантных клетках, так как по меньшей мере один компонент естественной окружающей среды полипептида не будет присутствовать. Тем не менее, обычно выделенный полипептид будет получен по меньшей мере за одну стадию очистки.

В контексте настоящего описания "участок" <sup>10</sup>Fn3 домена относится к любой петле (AB, BC, CD, DE, EF и FG), β-цепи (A, B, C, D, E, F и G), N-концу (соответствующему аминокислотному остаткам 1-7 из SEQ ID NO: 1) или C-концу (соответствующему аминокислотными остаткам 93-94 из SEQ ID NO: 1)

человеческого  $^{10}\text{Fn3}$  домена.

"Петля "северного полюса" относится к любой одной из петель BC, DE и FG десятого фибронектинового домена 3 типа ( $^{10}\text{Fn3}$ ) фибронектина человека.

"Петля "южного полюса" относится к любой одной из петель AB, CD и EF десятого фибронектинового домена 3 типа ( $^{10}\text{Fn3}$ ) фибронектина человека.

"Каркасный участок" относится к любому непетлевому участку человеческого  $^{10}\text{Fn3}$  домена. Каркасный участок включает  $\beta$ -цепи A, B, C, D, E, F и G, а также N-концевой участок (аминокислоты, соответствующие остаткам 1-8 из SEQ ID NO: 1) и C-концевой участок (аминокислоты, соответствующие остаткам 93-94 из SEQ ID NO: 1 и необязательно содержащие 7 аминокислот, составляющий естественный линкер между 10-м и 11-м повтором Fn3 домена в фибронектине человека).

"Процент (%) идентичности аминокислотных последовательностей" в настоящем документе определяют как процент аминокислотных остатков в потенциальной последовательности, которые идентичны аминокислотным остаткам в выбранной последовательности после выравнивания последовательностей и внесения гэпов, в случае необходимости, до достижения максимального процента идентичности последовательностей и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательностей. Выравнивание в целях определения процента идентичности аминокислотных последовательностей можно выполнить различными способами, которые известны специалисту в настоящей области, например, при помощи общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 или Megalign (DNASTAR). Специалисты в настоящей области могут определить соответствующие параметры для оценки выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для осуществления максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Применительно к настоящему описанию, однако, значения % идентичности аминокислотных последовательностей получают, как описано ниже, при помощи компьютерной программы для сравнения последовательностей ALIGN-2. Компьютерная программа для сравнения последовательностей ALIGN-2 была написана Genentech, Inc. подана с документацией пользователя в Бюро регистрации авторских прав США, город Вашингтон, округ Колумбия, 20559, где она зарегистрирована под № TXU510087 регистрации авторского права, и является общедоступной от Genentech, Inc., Южный Сан-Франциско, Калифорния. Программу ALIGN-2 необходимо скомпилировать для применения на операционной системе UNIX, предпочтительно цифровой UNIX V4.0D. Все параметры сравнения последовательностей выставлены программой ALIGN-2 и являются неизменными.

Применительно к настоящему описанию, % идентичности аминокислотных последовательностей заданной аминокислотной последовательности A к, с, или относительно заданной аминокислотной последовательности B (что альтернативно можно перефразировать как заданная аминокислотная последовательность A, которая имеет или содержит конкретный % идентичности аминокислотной последовательности к, с или относительно заданной аминокислотной последовательности B) рассчитывают следующим образом:  $100 \times \frac{X}{Y}$ , где X представляет собой число аминокислотных остатков, оцененных как идентичные соответствия программой для выравнивания последовательностей ALIGN-2 в таком программном выравнивании A и B, и где Y представляет собой общее число аминокислотных остатков в B. Следует понимать, что если длина аминокислотной последовательности A не равна длине аминокислотной последовательности B, то % идентичности аминокислотной последовательности A к B не будет равен % идентичности аминокислотной последовательности B к A.

Термины "специфически связывается", "специфичное связывание", "селективное связывание" и "селективно связывается", применяемые в контексте настоящего описания взаимозаменяемо, относятся к аднектину, который характеризуется аффинностью к сывороточный альбумин, но практически не связывается (например, менее приблизительно 10% связывание) с отличным полипептидом, что оценивают при помощи доступной в настоящей области методики, такой как без ограничения анализ Скэтчарда и/или анализы конкурентного связывания (например, конкурентный ИФА, анализ BIACORE). Этот термин также применим, например, если связывающий домен аднектина по настоящему изобретению является специфичным к сывороточному альбумину.

"Период полужизни" полипептида обычно можно определить как фактическое время до уменьшения концентрации в сыворотке полипептида на 50%, *in vivo*, например, в связи с разрушением и/или выведением из организма полипептида или секвестрации полипептида при помощи естественных механизмов. Период полужизни можно определить по сути любым известным способом, например, при помощи фармакокинетического анализа. Подходящие методики будут очевидны специалисту в настоящей области и, в целом, могут, например, предусматривать стадии введения подходящей дозы полипептида примату; забора образцов крови или других образцов от указанного примата через равные промежутки времени; определения уровня или концентрации полипептида в указанном образце крови; и вычисления по полученным таким образом (представленным графически) данным времени до уменьшения уровня или концентрации полипептида на 50% по сравнению с исходным уровнем после введения дозы. Способы определения периода полужизни можно найти, например, в работе Kenneth et al., *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists* (1986); Peters et al., *Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach* (1996); и "Pharmacokinetics", M Gibaldi & D Perron, published by Marcel Dekker, 2<sup>nd</sup> Rev. edition

(1982).

Период полужизни можно выразить при помощи параметров, таких как  $t_{1/2}$ -альфа,  $t_{1/2}$ -бета и площадь под кривой (AUC). В соответствии с настоящим описанием "повышение периода полужизни" относится к повышению любого одного из таких параметров, любых двух из таких параметров или всех трех таких параметров. В соответствии с конкретными вариантами осуществления повышение периода полужизни относится к повышению  $t_{1/2}$ -бета, независимо с повышением, или без него,  $t_{1/2}$ -альфа и/или AUC или как первого, так и второго.

Термин " $K_D$ " в контексте настоящего описания предназначен для обозначения равновесной константы диссоциации конкретного взаимодействия аднектин-белок или аффинности аднектина к белку (например, сывороточному альбумину), по результатам измерения при помощи анализа поверхностного плазмонного резонанса или анализа связывания клеток. В контексте настоящего описания "необходимая  $K_D$ " относится к  $K_D$  аднектина, которая является достаточной для предполагаемых целей. Например, необходимая  $K_D$  может относиться к  $K_D$  аднектина, необходимой для достижения функционального эффекта в анализе *in vitro*, например, клеточном люциферазном анализе.

В контексте настоящего описания термин " $k_{ass}$ " предназначен для обозначения константы скорости ассоциации для ассоциации аднектина в комплекс аднектин/белок.

В контексте настоящего описания термин " $k_{diss}$ " предназначен для обозначения константы скорости диссоциации для диссоциации аднектина из комплекса аднектин/белок.

В контексте настоящего описания термин " $IC_{50}$ " относится к концентрации аднектина, которая ингибирует реакцию, либо в анализе *in vitro*, либо в анализе *in vivo*, до уровня, который составляет 50% от максимальной ингибирующей реакции, т.е. посередине от максимальной ингибирующей реакции и реакции при отсутствии обработки.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству лекарственного средства, эффективному для лечения заболевания или нарушения у млекопитающего и/или ослабления до некоторой степени одного или нескольких связанных с нарушением симптомов.

Применяемое в контексте настоящего описания "предупреждение" заболевания или нарушения относится к уменьшению вероятности появления болезненного состояния в статистической выборке по отношению к контрольной выборке без обработки, или к задержке начала или уменьшению тяжести одного или нескольких симптомов заболевания или нарушения по отношению к контрольной выборке. Для превентивной терапии пациентов можно выбирать на основании факторов, которые известны как повышающие риск возникновения клинического болезненного состояния относительно общей популяции. В контексте настоящего описания термин "лечение" включает (а) ингибирование болезненного состояния, т.е. остановку его развития; и/или (б) облегчение болезненного состояния, т.е. достижение регрессии болезненного состояния после его выявления.

### Общий обзор

Новые описываемые в настоящем документе фибронектиновые каркасные полипептиды связываются с сывороточным альбумином различных видов и могут соединяться с дополнительной молекулой(молекулами), такой как другие  $^{10}Fn3$  домены, которые связываются с другими целями, или полипептиды, для которых повышенный период полужизни является благоприятным.

А. Общая структура фибронектиновых каркасов.

$Fn3$  относится к домену III типа из фибронектина.  $Fn3$  домен является малым, мономерным, растворимым и стабильным. Он не имеет дисульфидных связей и поэтому стабилен в восстанавливающих условиях. Общая структура  $Fn3$  напоминает укладку цепи иммуноглобулинов.  $Fn3$  домены содержат, в порядке от N-конца к C-концу, бета или бета-подобную цепь А; петлю АВ; бета или бета-подобную цепь В; петлю ВС; бета или бета-подобную цепь С; петлю CD; бета или бета-подобную цепь D; петлю DE; бета или бета-подобную цепь E; петлю EF; бета или бета-подобную цепь F; петлю FG; и бета или бета-подобную цепь G. Семь антипараллельных  $\beta$ -цепей сгруппированы в виде двух бета-листов, которые формируют стабильную сердцевину, при этом создавая две "поверхности", которые сформированы из петель, соединяющих бета или бета-подобные цепи. Петли АВ, CD и EF расположены на одной поверхности ("южный полюс"), а петли BC, DE и FG расположены на противоположной поверхности ("северный полюс"). Любые или все петли АВ, BC, CD, DE, EF и FG могут принимать участие в связывании лигандов. В фибронектине человека есть по меньшей мере 15 различных  $Fn3$  модулей, и поскольку гомология последовательностей между модулями низка, то они все имеют высокое сходство в третичной структуре.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления  $Fn3$  домен представляет собой  $Fn3$  домен, полученный из десятого модуля дикого типа домена фибронектина человека III типа ( $^{10}Fn3$ ):

VSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFVPGSKST

ATISGLKPGVDYITITVYAVTGRGDSPASSKPIISINRYT (SEQ ID NO: 1)

(петли АВ, CD и EF подчеркнуты).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нелигандные связывающие последовательности  $^{10}Fn3$ , т.е. "каркас  $^{10}Fn3$ ", могут быть изменены при условии, что  $^{10}Fn3$  сохраняет функцию

связывания лиганда и/или структурную стабильность. Сообщалось о различных мутантных каркасах  $^{10}\text{Fn3}$ . В соответствии с одним аспектом один или несколько из Asp 7, Glu 9 и Asp 23 заменены на другую аминокислоту, такую как, например, не имеющий отрицательный заряд аминокислотный остаток (например, Asn, Lys и т. п.). Сообщалось, что такие мутации оказывают эффект, способствующий большей стабильности мутантного  $^{10}\text{Fn3}$  при нейтральном pH по сравнению с формой дикого типа (см., например, публикацию патентной заявки РСТ № WO 02/04523). Было раскрыто множество дополнительных изменений в каркасе  $^{10}\text{Fn3}$ , которые являются либо благоприятными, либо нейтральными. См., например, работу Batori et al., Protein Eng., 15(12): 1015-1020 (December 2002); Koide et al., Biochemistry, 40(34): 10326-10333 (Aug. 28, 2001).

Оба варианта белков  $^{10}\text{Fn3}$  дикого типа характеризуются сходной структурой, а именно семью бета-цепочечными последовательностями домена, которые обозначены A-G, и шестью петлевыми участками (петля AB, петля BC, петля CD, петля DE, петля EF и петля FG), которые связывают семь бета-цепочечных последовательностей домена. Бета-цепи, расположенные наиболее близко к N- и C-концам, могут принимать бета-подобную конформацию в растворе. В SEQ ID NO: 1 петля AB соответствует остаткам 14-17, петля BC соответствует остаткам 23-31, петля CD соответствует остаткам 37-47, петля DE соответствует остаткам 51-56, петля EF соответствует остаткам 63-67, и петля FG соответствует остаткам 76-87.

Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления связывающий сывороточный альбумин аднектин по настоящему изобретению представляет собой  $^{10}\text{Fn3}$  полипептид, который по меньшей мере на 40, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90% идентичен человеческому  $^{10}\text{Fn3}$  домену, показанному под SEQ ID NO: 1. Основная часть изменчивости обычно будет иметь место в одной или нескольких петлях. Каждая из бета- или бета-подобных цепей  $^{10}\text{Fn3}$  полипептида может фактически состоять из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95 или 100% идентична последовательности соответствующей бета или бета-подобной цепи с SEQ ID NO: 1 при условии, что такая вариация не нарушает стабильность полипептида в физиологических условиях.

Дополнительно, также можно создать вставки и делеции в петлевых участках, при этом все еще получая высокую аффинность связывания в сыворотке у связывающих  $^{10}\text{Fn3}$  доменов. Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления одна или несколько петель, выбранных из AB, BC, CD, DE, EF и FG, могут быть удлинены или укорочены относительно соответствующей петли в человеческом  $^{10}\text{Fn3}$  дикого типа. В любом заданном полипептиде одна или несколько петель могут быть удлинены, одна или несколько петель могут быть укорочены или иметь их комбинацию. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления длина заданной петли может быть увеличена на 2-25, 2-20, 2-15, 2-10, 2-5, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-25, 10-20 или 10-15 аминокислот. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления длина данной петли может быть уменьшена на 1-15, 1-11, 1-10, 1-5, 1-3, 1-2, 2-10 или 2-5 аминокислот.

Как описано выше, аминокислотные остатки, соответствующие остаткам 14-17, 23-30, 37-47, 51-56, 63-67 и 76-87 из SEQ ID NO: 1, определяют соответственно петли AB, BC, CD, DE, EF и FG. Однако, следует понимать, что не каждое основание в петлевом участке нуждается в модификации для получения связывающего  $^{10}\text{Fn3}$  домена, обладающего сильной аффинностью к необходимой цели. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления только остатки в петле, например петле CD, модифицируют для получения  $^{10}\text{Fn3}$  доменов, связывающихся с целью с высокой аффинностью.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к полипептидам, содержащим  $^{10}\text{Fn3}$  домен, причем  $^{10}\text{Fn3}$  домен содержит петли AB, BC, CD, DE и FG и имеет по меньшей мере одну петлю, выбранную из петель AB, CD и EF, с измененной аминокислотной последовательностью относительно последовательности соответствующей петли человеческого  $^{10}\text{Fn3}$  домена с SEQ ID NO: 1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления петли изменены AB, CD и EF. В соответствии с конкретными вариантами осуществления изменена только петля AB. В соответствии с конкретными вариантами осуществления изменена только петля CD. В соответствии с конкретными вариантами осуществления изменена только петля EF. В соответствии с конкретными вариантами осуществления изменены как петля AB, так и петля CD. В соответствии с конкретными вариантами осуществления изменены как петля AB, так и петля EF. В соответствии с конкретными вариантами осуществления изменены как петля CD, так и петля EF. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления одно или несколько конкретных каркасных изменений объединены в комбинации с одним или несколькими петлевыми изменениями. Под "измененный" понимают одно или несколько изменений в аминокислотной последовательности относительно матричной последовательности (т.е. соответствующего домена дикого типа фибронектина человека) и включает аминокислотные дополнения, делеции и замены.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления каркасный фибронектиновый белок содержит  $^{10}\text{Fn3}$  домен, имеющий комбинацию из изменений петель "северного" и "южного полюса". Например, одна или несколько петель AB, CD и EF в комбинации с одной или несколькими из петель BC, DE и FG могут быть изменены относительно соответствующих петель человеческого  $^{10}\text{Fn3}$  домена с SEQ ID NO: 1.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления полипептид содержит <sup>10</sup>Fn3 домен, который содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную непетлевым участкам и/или немодифицированным петлевым участкам SEQ ID NO: 1, причем изменена по меньшей мере одна петля, выбранная из AB, CD и EF. Например, в соответствии с конкретными вариантами осуществления петля AB может иметь до 4 аминокислотных замен, до 10 аминокислотных вставок, до 3 аминокислотных делеций или их комбинации; петля CD может иметь до 6 аминокислотных замен, до 10 аминокислотных вставок, до 4 аминокислотных делеций или их комбинации; и петля EF может иметь до 5 аминокислотных замен, до 10 аминокислотных вставок, до 3 аминокислотных делеций или их комбинации; и/или петля FG может иметь до 12 аминокислотных замен, до 11 аминокислотных делеций, до 25 аминокислотных вставок или их комбинации.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления один или несколько остатков интегрин-связывающего мотива "аргинин-глицин-аспарагиновая кислота" (RGD) (аминокислоты 78-80 из SEQ ID NO: 1) могут быть заменены так, чтобы нарушить связывание с интегрином. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления петля FG полипептидов, описываемых в настоящем документе, не содержит связывающий интегрин сайт RGD. В соответствии с одним вариантом осуществления последовательность RGD заменена на последовательность полярная аминокислота - нейтральная аминокислота - кислая аминокислота (в направлении от N-конца до C-конца). В соответствии с конкретными вариантами осуществления последовательность RGD заменена на SGE. В соответствии с еще одними вариантами осуществления последовательность RGD заменена на RGE.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления каркасный фибронектиновый белок содержит <sup>10</sup>Fn3 домен, который обычно определен следующей последовательностью:

VSDVPRDLEVVA(X)<sub>u</sub>LLISW(X)<sub>v</sub>YRITY(X)<sub>w</sub>FTV(X)<sub>x</sub>ATISGL(X)<sub>y</sub>YTITVYA(X)<sub>z</sub>ISI

NYRT (SEQ ID NO: 2)

В SEQ ID NO: 2 петля AB представлена (X)<sub>u</sub>, петля BC представлена (X)<sub>v</sub>, петля CD представлена (X)<sub>w</sub>, петля DE представлена (X)<sub>x</sub>, петля EF представлена (X)<sub>y</sub> и петля FG представлена X<sub>z</sub>. X представляет собой любую аминокислоту, а нижний индекс после X представляет собой целое число аминокислот. В частности, каждый из u, v, w, x, y и z может независимо представлять собой любое число в диапазоне 2-20, 2-15, 2-10, 2-8, 5-20, 5-15, 5-10, 5-8, 6-20, 6-15, 6-10, 6-8, 2-7, 5-7 или 6-7 аминокислот. Последовательности бета-цепей (подчеркнутые) могут иметь любое число из 0-10, 0-8, 0-6, 0-5, 0-4, 0-3, 0-2 или 0-1 замен, делеций или дополнений во всех 7 каркасных участках относительно соответствующих аминокислот, показанных в SEQ ID NO: 2. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления последовательности бета-цепей могут иметь любое число из 0-10, 0-8, 0-6, 0-5, 0-4, 0-3, 0-2 или 0-1 консервативных замен во всех 7 каркасных участках относительно соответствующих аминокислот, показанных в SEQ ID NO: 2. В соответствии с конкретными вариантами осуществления гидрофобные сердцевинные аминокислотные остатки (выделенные жирным остатками в описанной выше SEQ ID NO: 2) являются фиксированными, и любые замены, консервативные замены, делеций или дополнения происходят в остатках, отличных от гидрофобных сердцевинных аминокислотных остатков. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления гидрофобные сердцевинные остатки полипептидов, описываемых в настоящем документе, не модифицированы относительно человеческого <sup>10</sup>Fn3 домена дикого типа (SEQ ID NO: 1).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления аминокислотные последовательности N-концевых и/или C-концевых участков полипептидов, описываемых в настоящем документе, могут быть модифицированы делецией, заменой или вставкой относительно аминокислотной последовательности соответствующих участков человеческого <sup>10</sup>Fn3 домена дикого типа (SEQ ID NO: 1). <sup>10</sup>Fn3 домены обычно начинаются с аминокислоты номер 1 из SEQ ID NO: 1. Однако домены с аминокислотными делециями также охватываются настоящим изобретением. Дополнительные последовательности также можно добавить к N- или C-концу <sup>10</sup>Fn3 домена, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1. Например, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления N-концевое удлинение состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из M, MG и G.

В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления альтернативный N-концевой участок, имеющий длину в 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 или 1 аминокислоту, можно добавить к N-концевому участку SEQ ID NO: 1. Иллюстративные альтернативные N-концевые участки включают (представленные при помощи однобуквенного аминокислотного кода) M, MG, G, MGVSVDVPRDL (SEQ ID NO: 3) и GVSVDVPRDL (SEQ ID NO: 4). Другие подходящие альтернативные N-концевые участки включают, например, X<sub>n</sub>SDVPRDL (SEQ ID NO: 5), X<sub>n</sub>DVPRDL (SEQ ID NO: 6), X<sub>n</sub>VPRDL (SEQ ID NO: 7), X<sub>n</sub>PRDL (SEQ ID NO: 8), X<sub>n</sub>RDL (SEQ ID NO: 9), X<sub>n</sub>DL (SEQ ID NO: 10) или X<sub>n</sub>L, где n = 0, 1 или 2 аминокислоты, причем если n = 1, то X представляет собой Met или Gly, и если n = 2, то X представляет собой Met-Gly. При добавлении Met-Gly последовательности к N-концу <sup>10</sup>Fn3 домена M обычно будет отщепляться, оставляя G на N-конце. В соответствии с конкретными вариантами осуществления альтернативный N-концевой участок содержит аминокислотную последовательность MASTSG (SEQ ID NO: 11).

В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления альтернативный C-концевой уча-

сток, имеющий длину в 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 или 1 аминокислот, можно добавить к С-концевому участку SEQ ID NO: 1. Конкретные примеры альтернативных последовательностей С-концевых участков включают, например, полипептиды, содержащие, фактически состоящие из или состоящие из EIEK (SEQ ID NO: 12), EGSGC (SEQ ID NO: 13), EIEKPCQ (SEQ ID NO: 14), EIEKPSQ (SEQ ID NO: 15), EIEKP (SEQ ID NO: 16), EIEKPS (SEQ ID NO: 17) или EIEKPC (SEQ ID NO: 18). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления альтернативный С-концевой участок содержит EIDK (SEQ ID NO: 19), и в соответствии с конкретными вариантами осуществления альтернативный С-концевой участок представляет собой или EIDKPCQ (SEQ ID NO: 20), или EIDKPSQ (SEQ ID NO: 21). Дополнительные подходящие альтернативные С-концевые участки включают изложенные в табл. 20 и SEQ ID NO: 210-220.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления последовательности С-концевого удлинения содержат остатки E и D остатки и могут составлять в длину от 8 до 50, от 10 до 30, от 10 до 20, от 5 до 10 и от 2 до 4 аминокислот. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления хвостовые последовательности включают ED-линкеры, в которых последовательность содержит тандемные повторы ED. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления хвостовая последовательность содержит 2-10, 2-7, 2-5, 3-10, 3-7, 3-5, 3, 4 или 5 повторов ED. В соответствии с конкретными вариантами осуществления ED-хвостовые последовательности также могут включать дополнительные аминокислотные остатки, такие как, например, EI, EID, ES, EC, EGS и EGC. В основе таких последовательностей лежат, отчасти, известные хвостовые последовательности аднектина, такие как EIDKPSQ (SEQ ID NO: 21), в которых были удалены остатки D и K. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления ED-хвост перед повторами ED содержит остатки E, I или EI.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления альтернативный С-концевой фрагмент, который может быть присоединен к С-концевым аминокислотам RT (т.е. аминокислотам 93-94 из SEQ ID NO: 1) любого из описываемых в настоящем документе аднектинов, содержит аминокислоты  $P_mX_n$ , где P представляет собой пролин, X является любой аминокислотой, m является целым числом, которое составляет по меньшей мере 1, и n равен 0 или представляет собой целое число, которое составляет по меньшей мере 1. В соответствии с конкретными вариантами осуществления альтернативный С-концевой фрагмент содержит аминокислоты PC. В соответствии с конкретными вариантами осуществления альтернативный С-концевой фрагмент содержит аминокислоты PI, PC, PID,

PIE, PIDK (SEQ ID NO: 221), PIEK (SEQ ID NO: 222), PIDKP (SEQ ID NO: 223), PIEKP (SEQ ID NO: 224), PIDKPS (SEQ ID NO: 225), PIEKPS (SEQ ID NO: 226), PIDKPC (SEQ ID NO: 227), PIEKPC (SEQ ID NO: 228), PIDKPSQ (SEQ ID NO: 229), PIEKPSQ (SEQ ID NO: 230), PIDKPCQ (SEQ ID NO: 231), PIEKPCQ (SEQ ID NO: 232), PНННННН (SEQ ID NO: 233) и РСНННННН (SEQ ID NO: 234).

В соответствии с конкретными вариантами осуществления фибронектиновые каркасные белки содержат  $^{10}\text{Fn3}$  домен, имеющий как альтернативную последовательность N-концевого участка, так и альтернативную последовательность С-концевого участка.

В. Связывающие сывороточный альбумин молекулы, имеющие модифицированную петлю(петли) на "южном полюсе".

$^{10}\text{Fn3}$  домены быстро выводятся из кровотока посредством фильтрации и разрушения в связи с их малым размером, составляющем приблизительно 10 кДа ( $t_{1/2}$ =15-45 мин у мышей; 3 ч у обезьян). В соответствии с конкретными аспектами в настоящей заявке предложены  $^{10}\text{Fn3}$  домены с модификациями на "южном полюсе", которые специфично связываются с сывороточным альбумином, например, сывороточным альбумином человека (HSA), для пролонгирования  $t_{1/2}$  у  $^{10}\text{Fn3}$  домена.

HSA имеет концентрацию в сыворотке, составляющую 600 мкМ, и  $t_{1/2}$ , составляющий 19 дней у людей. Продолжительный  $t_{1/2}$  HSA был отчасти объяснен за счет его рециркуляции с участием неонатального рецептора Fc (FcRn). HSA связывает FcRn в зависимости от pH после эндосомального поглощения в эндотелиальные клетки; эта взаимосвязь позволяет рециркулировать HSA обратно в кровоток, таким образом отдаляя его липосомальное разрушение. FcRn широко экспрессируется, и, согласно предположениям, рециркуляционный путь является конститутивным. В большинстве типов клеток наибольшее количество FcRn находится во внутриклеточной сортирующей эндосоме. HSA легко интернализируется при помощи неспецифического механизма пиноцитоза жидкой фазы и избегает разрушения в липосоме при помощи FcRn. При кислом pH, который имеет место в эндосоме, аффинность HSA к FcRn повышается (5 мкМ при pH 6,0). После связывания с FcRn HSA уходит с липосомного пути разрушения, подвергается транцитозу и высвобождается на поверхность клетки.

Аднектины, связывающее сывороточный альбумин за счет петли "северного полюса", называемые в настоящем документе связывающими сывороточный альбумин аднектинами "первого поколения", описаны, например, в WO 2011140086. Для того чтобы усовершенствовать связывающие сывороточный альбумин за счет петли "северного полюса" (SABA) аднектины первого поколения, среди которых некоторые не связывались с сывороточным альбумином мыши или крысы, не обладали высокой аффинностью к сывороточным альбуминам от различных видов, и не всегда были совместимы в мультивалентной плат-

форме на основе  $^{10}\text{Fn3}$ , были разработаны связывающие сывороточный альбумин за счет петли "южного полюса" (аднектины PKE2) аднектины второго поколения с модифицированными петлями "южного полюса", как описано в разделе примеры.

Таким образом, в соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к  $^{10}\text{Fn3}$  домену, имеющему (i) модификацию в аминокислотной последовательности по меньшей мере одной петли "южного полюса", выбранной из петель AB, CD и EF, относительно соответствующей петли человеческого  $^{10}\text{Fn3}$  домена дикого типа (SEQ ID NO: 1), в которой  $^{10}\text{Fn3}$  домен связывается с сывороточным альбумином (например, сывороточным альбумином человека). Модифицированная петля (петли) "южного полюса" участвует в связывании с одинаковой целью. Предусмотрены различные комбинации модифицированных петель "южного полюса". Например,  $^{10}\text{Fn3}$  может содержать одну модифицированную петлю "южного полюса", две модифицированные петли "южного полюса" или даже все три модифицированные петли "южного полюса". В соответствии с конкретными вариантами осуществления одна или несколько модифицированных петель "южного полюса" можно получить в сочетании с одной или несколькими модифицированными петлями "северного полюса" (т.е. одной или несколькими из петель BC, DE и FG). Модифицированные петли могут иметь модификации последовательности на протяжении всей петли или только в части петли. В дополнение к этому, одна или несколько из модифицированных петель могут иметь такие вставки или делеции, что длина петли будет варьировать относительно длины соответствующей петли последовательности дикого типа (т.е. SEQ ID NO: 1). В соответствии с конкретными вариантами осуществления дополнительные участки в  $^{10}\text{Fn3}$  домене (т.е. в дополнение к петлям "южного полюса"), такие как  $\beta$ -цепь, N-концевые и/или C-концевые участки, также могут быть модифицированы в последовательности относительно  $^{10}\text{Fn3}$  домена дикого типа, и такие дополнительные модификации также могут участвовать в связывании с целью. В соответствии с конкретными вариантами осуществления петля "южного полюса" является единственным модифицированным доменом. В соответствии со специфическими вариантами осуществления петля CD является единственным модифицированным доменом. В соответствии с конкретными вариантами осуществления связывающий сывороточный альбумин  $^{10}\text{Fn3}$  домен может быть модифицирован путем включения последовательности N-концевого удлинения и/или последовательности C-концевого удлинения, которые описано ранее.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к аднектинам, которые связываются с сывороточным альбумином, имеющим измененную петлю CD относительно соответствующей петли человеческого  $^{10}\text{Fn3}$  домена дикого типа, например,  $^{10}\text{Fn3}$  доменов, изложенных под SEQ ID NO: 23-100, 184-209 и 235-260. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления связывающие альбумин аднектины содержат или наоборот не содержат 6X на своем хвосте. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления связывающие альбумин аднектины соответствуют сердцевинным аднектинам, которые не имеют N-концевой лидерной последовательности и C-концевого хвоста, которые изложены под SEQ ID NO: 75-100.

В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления описанные в настоящем документе связывающие сывороточный альбумин  $^{10}\text{Fn3}$  белки связываются с сывороточным альбумином человека с  $K_D$ , составляющей менее 3, 2,5, 2, 1,5, 1 мкМ, 500 нМ, 100, 50, 10, 1 нМ, 500 пМ, 100, 100, 50 или 10 пМ.  $K_D$  может, например, находиться в диапазоне от 0,1 до 50 нМ, от 0,1 до 100 нМ, от 0,1 нМ до 1 мкМ, от 0,5 до 50 нМ, от 0,5 до 100 нМ, от 0,5 нМ до 1 мкМ, от 1 до 50 нМ, от 1 до 100 нМ или от 1 нМ до 1 мкМ.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления описанные в настоящем документе связывающие альбумин аднектины (или  $^{10}\text{Fn3}$  белки) также могут связывать сывороточный альбумин от одного или нескольких из яванского макака, макака-резус, крысы или мыши.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления описанные в настоящем документе связывающие сывороточный альбумин  $^{10}\text{Fn3}$  белки связываются с сывороточным альбумином макака-резус (RhSA) или сывороточным альбумином яванского макака (CySA) с  $K_D$ , составляющей менее 3, 2,5, 2, 1,5, 1 мкМ, 500 нМ, 100, 50, 10, 1 нМ, 500 пМ или 100 пМ.  $K_D$  может, например, находиться в диапазоне от 0,1 до 50 нМ, от 0,1 до 100 нМ, от 0,1 нМ до 1 мкМ, от 0,5 до 50 нМ, от 0,5 до 100 нМ, от 0,5 нМ до 1 мкМ, от 1 до 50 нМ, от 1 до 100 нМ или от 1 нМ до 1 мкМ.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления описанные в настоящем документе связывающие сывороточный альбумин  $^{10}\text{Fn3}$  белки связываются с сывороточным альбумином макака-резус (RhSA), сывороточным альбумином яванского макака (CySA) и сывороточный альбумин мыши (MSA) с  $K_D$ , составляющей менее 3, 2,5, 2, 1,5, 1 мкМ, 500 нМ, 100, 50, 10, 1 нМ, 500 пМ или 100 пМ.  $K_D$  может, например, находиться в диапазоне от 0,1 до 50 нМ, от 0,1 до 100 нМ, от 0,1 нМ до 1 мкМ, от 0,5 до 50 нМ, от 0,5 до 100 нМ, от 0,5 нМ до 1 мкМ, от 1 до 50 нМ, от 1 до 100 нМ или от 1 нМ до 1 мкМ.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления описанные в настоящем документе связывающие сывороточный альбумин  $^{10}\text{Fn3}$  белки связываются с сывороточным альбумином макака-резус (RhSA), сывороточным альбумином яванского макака (CySA), сывороточным альбумином мыши (MSA) и сывороточным альбумином крысы (RSA) с  $K_D$ , составляющей менее 3, 2,5, 2, 1,5, 1 мкМ, 500 нМ, 100, 50, 10, 1 нМ, 500 пМ или 100 пМ.  $K_D$  может, например, находиться в диапазоне от 0,1 до 50 нМ, от 0,1 до 100 нМ, от 0,1 нМ до 1 мкМ, от 0,5 до 50 нМ, от 0,5 до 100 нМ, от 0,5 нМ до 1 мкМ, от 1 до 50 нМ, от 1 до 100 нМ или от 1 нМ до 1 мкМ.

до 100 нМ или от 1 нМ до 1 мкМ.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления описанные в настоящем документе связывающие альбумин аднектины связываются с сывороточным альбумином в диапазоне рН от 5,5 до 7,4.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления описанные в настоящем документе связывающие альбумин аднектины связываются с доменом I-II сывороточного альбумина человека.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления период полужизни в сыворотке связывающих альбумин аднектинов по настоящему изобретению или период полужизни в сыворотке связывающих альбумин аднектинов, соединенных с гетерологичным фрагментом, например, вторым аднектином, составляет по меньшей мере 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 135, 140, 150, 160 или 200 ч. В соответствии с конкретными вариантами осуществления период полужизни в сыворотке связывающих альбумин аднектинов или период полужизни в сыворотке связывающих альбумин аднектинов, соединенных с гетерологичным фрагментом, например, вторым аднектином, составляет 2-200, 5-200, 10-200, 25-200, 50-200, 100-200, 150-200, 2-150, 2-100, 2-50, 2-25, 2-10, 2-5, 5-150, 10-100 или 25-50 ч.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления связывающие альбумин аднектины содержат последовательность, которая по меньшей мере на 40, 50, 60, 70, 75, 80 или 85% идентична <sup>10</sup>Fn3 домену дикого типа (SEQ ID NO: 1). В соответствии с одним вариантом осуществления по меньшей мере одна из петель АВ, CD или EF модифицирована относительно <sup>10</sup>Fn3 домена дикого типа. В соответствии с конкретным вариантом осуществления по меньшей мере две из петель АВ, CD или EF модифицированы относительно <sup>10</sup>Fn3 домена дикого типа. В соответствии с конкретным вариантом осуществления все три петли АВ, CD или EF модифицированы относительно <sup>10</sup>Fn3 домена дикого типа. В соответствии с конкретными вариантами осуществления связывающий сывороточный альбумин <sup>10</sup>Fn3 домен содержит последовательность, которая по меньшей мере на 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 23-100, 184-209 и 235-260.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления связывающий сывороточный альбумин <sup>10</sup>Fn3 домен (или аднектин) может содержать последовательность, которая изложена под SEQ ID NO: 2, где петля CD представлена (X)<sub>w</sub> и заменена на петлю CD из любой из 26 сердцевинных последовательностей аднектина PKE2 (т.е. SEQ ID NO: 75-100). Каркасные участки таких связывающих альбумин аднектинов могут иметь любое число в диапазоне 0-20, 0-15, 0-10, 0-8, 0-6, 0-5, 0-4, 0-3, 0-2 или 0-1 замен, консервативных замен, делеций или дополнений относительно каркасных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1. Такие каркасные модификации можно создавать при условии, что связывающий альбумин аднектин будет способен связывать сывороточный альбумин, например, HSA, с необходимой K<sub>D</sub>.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления петлевой участок CD связывающих альбумин аднектинов по настоящему изобретению можно описать при помощи консенсусной последовательности.

Таким образом, в соответствии с некоторыми вариантами осуществления петля CD определена консенсусной последовательностью G-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-V-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-S-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-G-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-Y-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub>-X<sub>12</sub>-E (SEQ ID NO: 170), где:

- (a) X<sub>1</sub> выбран из группы, состоящей из R или W;
- (b) X<sub>2</sub> выбран из группы, состоящей из H, E, D, Y или Q;
- (c) X<sub>3</sub> выбран из группы, состоящей из Q или H;
- (d) X<sub>4</sub> выбран из группы, состоящей из I, K, M, Q, L или V;
- (e) X<sub>5</sub> выбран из группы, состоящей из Y, F или N;
- (f) X<sub>6</sub> выбран из группы, состоящей из D, V или E;
- (g) X<sub>7</sub> выбран из группы, состоящей из L, W или F;
- (h) X<sub>8</sub> выбран из группы, состоящей из P или T;
- (i) X<sub>9</sub> выбран из группы, состоящей из L или M;
- (j) X<sub>10</sub> выбран из группы, состоящей из I или V;
- (k) X<sub>11</sub> выбран из группы, состоящей из Y или F; и
- (l) X<sub>12</sub> выбран из группы, состоящей из T, S, Q, N или A.

В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления:

- (a) X<sub>1</sub> представляет собой R;
- (b) X<sub>2</sub> представляет собой E;
- (c) X<sub>3</sub> представляет собой Q;
- (d) X<sub>4</sub> представляет собой K;
- (e) X<sub>5</sub> представляет собой Y;
- (f) X<sub>6</sub> представляет собой D;
- (g) X<sub>7</sub> представляет собой L или W;
- (h) X<sub>8</sub> представляет собой P;
- (i) X<sub>9</sub> представляет собой L;
- (j) X<sub>10</sub> представляет собой I;
- (k) X<sub>11</sub> представляет собой Y и

(I) X<sub>12</sub> представляет собой Q или N.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления X<sub>7</sub> представляет собой L, а X<sub>12</sub> представляет собой Q.

В соответствии с другим предпочтительным вариантом осуществления X<sub>7</sub> представляет собой W, а X<sub>12</sub> представляет собой N.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления связывающие альбумин аднектины по настоящему изобретению содержат петлю CD, имеющую последовательности, по меньшей мере на 75%, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичные последовательностям петли CD, изложенным по SEQ ID NO: 101-125, или содержат не более 1, 1-2 или 1-3 аминокислотных отличий (т.е. замену, например, делецию, добавку или консервативную замену). Каркасные участки таких связывающих альбумин аднектинов могут содержать любое число в диапазоне 0-20, 0-15, 0-10, 0-8, 0-6, 0-5, 0-4, 0-3, 0-2 или 0-1 замен, консервативных замен, делеций или дополнений относительно каркасных аминокислотных остатков из SEQ ID NO: 1. Такие каркасные модификации можно создавать при условии, что аднектины будут способны связывать сывороточный альбумин с необходимой K<sub>D</sub>.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления петля CD связывающих альбумин аднектинов по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из:

GRHVQIYSDLGPLYIYTE (SEQ ID NO: 101),  
 GRHVHIYSDWGPMYIYTE (SEQ ID NO: 102),  
 GREVQKYSVLGPLYIYTE (SEQ ID NO: 103),  
 GREVQMYSDLGPLYVYSE (SEQ ID NO: 104),  
 GREVQKFSDWGPLYIYTE (SEQ ID NO: 105),  
 GREVQKYSDLGPLYIYQE (SEQ ID NO: 106),  
 GREVHQYSDWGPMYIYNE (SEQ ID NO: 107),  
 GREVIKNSDWGTLIYIYTE (SEQ ID NO: 108),  
 GREVQKYSDLGPLYIYAE (SEQ ID NO: 109),  
 GREVHLYSDWGPMYIYTE (SEQ ID NO: 110),  
 GRHVQMYSDLGPLYIFSE (SEQ ID NO: 111),  
 GREVHMYSDFGPMYIYTE (SEQ ID NO: 112),  
 GREVQKYSWDGPLYIYNE (SEQ ID NO: 113),  
 GREVQMYSDLGPLYIYNE (SEQ ID NO: 114),  
 GREVQMYSDLGPLYIYTE (SEQ ID NO: 115),  
 GRHVQIYSDLGPLYIYNE (SEQ ID NO: 116),  
 GREVQIYSDWGPLYIYNE (SEQ ID NO: 117),  
 GREVQKYSWDGPLYIYQE (SEQ ID NO: 118),  
 GRHVHLYSEFGPMYIYNE (SEQ ID NO: 119),  
 GRDVHMYSDWGPMYIYQE (SEQ ID NO: 120),  
 GRHVQIYSDWGPLYIYNE (SEQ ID NO: 121),  
 GRYVQLYSDWGPMYIYTE (SEQ ID NO: 122),  
 GRQVQVFDLGPLYIYNE (SEQ ID NO: 123),  
 GRQVQIYSDWGPLYIYNE (SEQ ID NO: 124) и  
 GRQVQMYSWDGPLYIYAE (SEQ ID NO: 125).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления связывающий альбумин аднектин содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична любой одной из SEQ ID NO: 23-100, 184-209 и 235-260 или отличается от нее не более чем на 1, 1-2, 1-3, 1-5, 1-10 или 1-20 аминокислотных отличий, например, аминокислотных делеций, дополнений или замен (например, консервативных замен). В соответствии с конкретными вариантами осуществления связывающие альбумин молекулы содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична отличному от петли CD участку из SEQ ID NO: 23-100, 184-209 и 235-260.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления связывающий альбумин аднектин содержит аминокислотную последовательность, изложенную под любым из SEQ ID NO: 29, 55, 81, 190 и 241. В соответствии с другим предпочтительным вариантом осуществления связывающий альбумин аднектин содержит аминокислотную последовательность, изложенную под любым из SEQ ID NO: 36, 62, 88, 197 и 248.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления настоящее изобретение относится к мутантным связывающим альбумин молекулам аднектина, которые имеют цистеиновый остаток, введен-

ный в конкретное положение. Иллюстративные примеры цистеиновых мутаций представляют собой A12C, A26C, S55C, T56C и T58C (см. табл. 7 в разделе примеры). В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления цистеиновые мутации практически не изменяют у связывающего альбумин аднектина связывание с сывороточным альбумином.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления пролиновый остаток вводят в С-конец <sup>10</sup>Fn3 домена, например, как показано, например, в SEQ ID NO: 184-209 и 235-260. В соответствии с конкретными вариантами осуществления пролиновый остаток вводят в С-конец тандемного связывающего альбумин аднектина как показано, например, в SEQ ID NO: 168 и 261. Добавление пролинового остатка не исключает добавление дополнительных аминокислотных последовательностей к С-концу связывающего альбумин аднектина или тандемного связывающего альбумин аднектина.

С. Перекрестно-конкурирующие аднектины и/или аднектины, которые связываются с одинаковым сайтом связывания аднектина.

Настоящее изобретение относится к белкам, таким как аднектины, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, малые молекулы, пептиды и т. п., которые конкурируют (например, перекрестно конкурируют) за связывание с сывороточным альбумином (например, HSA) с отдельными описанными в настоящем документе аднектинами PKE2. Такие конкурирующие белки, например, аднектины, можно выявить по их способности конкурентно ингибировать связывание с сывороточным альбумином (например, HSA) у описанных в настоящем документе аднектинов в ходе стандартных анализов на связывание сывороточного альбумина. Например, можно применять стандартные анализы ИФА, в ходе которых белок рекомбинантного сывороточного альбумина иммобилизируют на планшете, один из белков флуоресцентно метят и оценивают способность немеченного белка конкурировать с меченым белком за связывание.

Далее представлены иллюстративные примеры конкурентных анализов в контексте аднектинов, конкурирующих с одним из описанных в настоящем документе белков PKE2 за связывание с сывороточным альбумином. Можно осуществить аналогичные анализы, в которых тестируют на конкурентность отличный от аднектина белок. В соответствии с одним вариантом осуществления конкурентный формат ИФА можно осуществлять для определения того, связывают ли два связывающих сывороточный альбумин аднектина перекрывающиеся сайты связывания аднектина (эпитопы) на сывороточном альбумине (например, HSA). В соответствии с одним форматом аднектин № 1 наносят на планшет, который затем блокируют и промывают. В этот планшет добавляют либо только сывороточный альбумин, либо сывороточный альбумин, предварительно инкубированный с насыщающей концентрацией аднектина № 2. После соответствующего периода инкубации планшет промывают и зондируют при помощи поликлонального антитела к сывороточному альбумину с последующей детекцией при помощи конъюгата стрептавидин-HRP и стандартных процедур проявления при помощи тетраметилбензида. Если сигнал OD является одинаковым с или без предварительной инкубации с аднектином № 2, то два аднектина связываются независимо друг от друга, и их сайты связывания аднектина не перекрываются. Однако, если сигнал OD для лунок, в которые были внесены смеси сывороточного альбумина/аднектина № 2, ниже для лунок, в которые был внесен только сывороточный альбумин, то связывание аднектина № 2 подтверждает как блокирующее связывание аднектина № 1 с сывороточным альбумином.

В качестве альтернативы, аналогичный эксперимент проводят при помощи поверхностного плазмонного резонанса (SPR, например, BIAcore). Аднектин № 1 иммобилизируют на поверхности чипа для SPR с последующими введениями инъекцией либо только сывороточного альбумина, либо сывороточного альбумина, предварительно инкубированного с насыщающей концентрацией аднектина № 2. Если сигнал связывания для смесей сывороточного альбумина/аднектина № 2 является одинаковым или выше, чем только у сывороточного альбумина, то два аднектина связываются независимо друг от друга, и их сайты связывания аднектина не перекрываются. Однако, если сигнал связывания для смесей сывороточного альбумина/аднектина № 2 ниже сигнала связывания только для сывороточного альбумина, то связывание аднектина № 2 подтверждает как блокирующее связывание аднектина № 1 с сывороточным альбумином. Особенностью таких экспериментов является применение насыщающих концентраций аднектина № 2. Если сывороточный альбумин не насыщается аднектином № 2, то указанные выше заключения не сохраняются. Такие же эксперименты можно применять для определения того, связываются ли любые два связывающих сывороточных альбумин белка с перекрывающимися сайтами связывания аднектина.

Оба приведенных выше в качестве примера анализа также можно осуществлять в обратном порядке, при котором иммобилизируют аднектин № 2 и в планшет добавляют сывороточный альбумин - аднектин № 1. В качестве альтернативы, аднектин № 1 и/или № 2 можно заменить на моноклональное антитело и/или растворимый гибридный белок рецептора-Fc.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления конкурентное связывание можно определить при помощи сэндвич-анализа НТР.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления конкурентным аднектином является аднектин, который связывает тот же сайт связывания аднектина на сывороточном альбумине, что и описанный в настоящем документе конкретный аднектин PKE2. Для определения того, связывается ли ад-

нектин с тем же сайтом связывания аднектина, что и эталонный аднектин, можно применять стандартные методики картирования, такие как протеазное картирование, мутационный анализ, рентгеновская кристаллография и 2-мерный ядерный магнитный резонанс (см., например, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)).

Потенциальные конкурирующие связывающие альбумин белки, например, аднектины, могут ингибировать связывание аднектинов PKE2 по настоящему изобретению с сывороточным альбумином (например, HSA) по меньшей мере на 50%, по меньшей мере 55%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 65%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%. % конкурирования можно определить при помощи описанных выше способов.

#### D. Мультивалентные/тандемные аднектины.

Настоящее изобретение относится к мультивалентным белкам, которые содержат два или более  $^{10}\text{Fn3}$  доменов, специфически связывающихся с целью (аднектины). Например, мультивалентный белок может содержать 2, 3 или более  $^{10}\text{Fn3}$  доменов, которые ковалентно связаны. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления мультивалентный белок является биспецифичным или димерным белком, содержащим два  $^{10}\text{Fn3}$  домена. В соответствии с конкретными вариантами осуществления мультивалентный белок содержит первый  $^{10}\text{Fn3}$  домен, который связывается с сывороточным альбумином (например, сывороточным альбумином человека), и второй  $^{10}\text{Fn3}$  домен, который связывается со второй целевой молекулой (например, PCSK9). Если как первая, так и вторая целевые молекулы являются сывороточным альбумином, то первый и второй  $^{10}\text{Fn3}$  домены могут связываться с одинаковыми или отличными эпитопами. Кроме того, если первая и вторая целевые молекулы являются одинаковыми, то участки модификации в  $^{10}\text{Fn3}$  домене, который ассоциирован с целевым связыванием, могут быть одинаковыми или отличаться. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления такой  $^{10}\text{Fn3}$  домен мультивалентного фибронектинового белкового каркаса связывается с необходимой целью с  $K_D$  менее 500, 100, 50, 1 нМ, 500 пМ, 100 пМ или менее. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления такой  $^{10}\text{Fn3}$  домен мультивалентного фибронектинового белкового каркаса связывается с необходимой целью с  $K_D$  от 1 пМ до 1 мкМ, от 100 пМ до 500 нМ, от 1 до 500 нМ или от 1 до 100 нМ. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления такой  $^{10}\text{Fn3}$  домен мультивалентного фибронектинового белкового каркаса специфично связывается с целью, которая не связывается  $^{10}\text{Fn3}$  доменом дикого типа, в частности человеческим  $^{10}\text{Fn3}$  доменом дикого типа.

$^{10}\text{Fn3}$  домены в мультивалентном фибронектиновом каркасном белке могут соединяться полипептидным линкером. Иллюстративные полипептидные линкеры включают полипептиды с 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3 или 1-2 аминокислотами. Подходящие линкеры для соединения  $^{10}\text{Fn3}$  доменов являются линкерами, которые позволяют разделить домены для независимой друг от друга укладки с образованием трехмерной структуры, которая обеспечивает высокоаффинное связывание с целевой молекулой. Конкретные примеры подходящих линкеров включают глицин-сериновые линкеры, глицин-пролиновые линкеры, пролин-аланиновые линкеры, а также линкеры с аминокислотной последовательностью PSTPPTSPSTPPTSPS (SEQ ID NO: 152). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер представляет собой глицин-сериновый линкер. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер представляет собой глицин-сериновый линкер. Такие линкеры содержат глициновые и сериновые остатки и могут иметь длину от 8 до 50, от 10 до 30 и от 10 до 20 аминокислот. Примеры включают линкеры с аминокислотной последовательностью (GS)<sub>7</sub> (SEQ ID NO: 153), G(GS)<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 154) и G(GS)<sub>7</sub>G (SEQ ID NO: 155). Другие линкеры содержат глутаминовую кислоту и включают, например, (GSE)<sub>5</sub> (SEQ ID NO: 156) и GGSEGGSE (SEQ ID NO: 157). Другие иллюстративные глицин-сериновые линкеры включают (GS)<sub>4</sub> (SEQ ID NO: 158) (GGGG)<sub>7</sub> (SEQ ID NO: 159) (GGGG)<sub>5</sub> (SEQ ID NO: 160) и (GGGG)<sub>3</sub>G (SEQ ID NO: 161). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления линкер представляет собой глицин-пролиновый линкер. Такие линкеры содержат глициновые и пролиновые остатки и могут иметь длину от 3 до 30, от 10 до 30 и от 3 до 20 аминокислот. Примеры включают линкеры с аминокислотной последовательностью (GP)<sub>3</sub>G (SEQ ID NO: 162), (GP)<sub>5</sub>G (SEQ ID NO: 163) и GPG. В соответствии с конкретными вариантами осуществления линкер может представлять собой пролин-аланиновый линкер с длиной от 3 до 30, от 10 до 30 и от 3 до 20 аминокислот. Примеры пролин-аланиновых линкеров включают, например, (PA)<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 164), (PA)<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 165) и (PA)<sub>9</sub> (SEQ ID NO: 166). Предполагают, что оптимальную длину линкера и аминокислотный состав можно определить путем постановки стандартного эксперимента при помощи способов, хорошо известных в настоящей области техники. В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления линкер не содержит пары Asp-Lys (DK).

В соответствии с конкретными вариантами осуществления линкер имеет аминокислотную последовательность

PSPEPPTPEP (SEQ ID NO: 173),

PSPEPPTPEPPSPEPPTPEP (SEQ ID NO: 174), PSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEP (SEQ

ID NO: 175) или PSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEP (SEQ ID NO: 176).

Обычно линкер может содержать аминокислотную последовательность (PSPEPPTPEP)<sub>n</sub>(SEQ ID NO: 262), где n равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 1-5 или 1-10. В соответствии с конкретными вариантами осуществления линкер имеет аминокислотную последовательность EEEEDE (SEQ ID NO: 177), EEEEEDEE (SEQ ID NO: 178), EEEEEDEEEDDEE (SEQ ID NO: 179), EEEEEDEEEDDEEEDDEE (SEQ ID NO: 180)

Обычно линкер может содержать последовательность (EEEEDE)<sub>n</sub>E (SEQ ID NO: 263), где n равен 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 1-5 или 1-10. В соответствии с конкретными вариантами осуществления линкер имеет аминокислотную последовательность RGGEEKKKEKEEQEERETKTP (SEQ ID NO: 181). Такие линкеры можно применять для соединения связывающего альбумин аднектина с другим полипептидом (например, другим аднектином). Иллюстративные применения линкера PSPEPPTPEP (SEQ ID NO: 173) показаны ниже. N-концевой аднектин, соединенный с C-концевым полипептидом:

...NYRTPG**PSPEPPTPEP**-полипептид (SEQ ID NO: 182)

N-концевой полипептид, соединенный с C-концевым аднектином:

полипептид-**PSPEPPTPEP**GVSDV...(SEQ ID NO: 183)

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления мультивалентный аднектин представляет собой тандемный аднектин, содержащий первый <sup>10</sup>Fn3 домен, который связывается с сывороточным альбумином (например, аднектин PKE2), и второй <sup>10</sup>Fn3 домен, который связывается с конкретной целью. Тандемные аднектины могут иметь конфигурацию связывающий альбумин аднектин-X и X-связывающий альбумин аднектин, где X является специфичным к цели <sup>10</sup>Fn3 доменом. Специалисту в настоящей области хорошо известны способы тестирования функциональной активности и оценки биологических свойств таких тандемных молекул аднектина.

В соответствии с одним аспектом настоящее изобретение относится к гибриднему полипептиду, содержащему первый десятый домен фибронектина III типа (<sup>10</sup>Fn3) и второй <sup>10</sup>Fn3 домен, где первый <sup>10</sup>Fn3 домен содержит а) петли AB, BC, CD, DE, EF и FG, б) петлю CD с измененной аминокислотной последовательностью по отношению к последовательности соответствующей петли человеческого <sup>10</sup>Fn3 домена, и с) причем полипептид связывается с сывороточным альбумином человека с K<sub>D</sub> менее 500 нМ. "Первый" домен и "второй" домен могут находиться в N-C-концевой или C-N-концевой ориентации.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, например, мультивалентных аднектинов, первый <sup>10</sup>Fn3 домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 23-100, 184-209 и 235-260 или отличается от нее не более чем на 1, 1-2, 1-5, 1-10 или 1-20 аминокислот, например, аминокислотных делеций, дополнений или замен (например, консервативных аминокислотных замен).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления первый <sup>10</sup>Fn3 домен содержит аминокислотную последовательность под любым из SEQ ID NO: 23-100, 184-209 и 235-260.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления первый <sup>10</sup>Fn3 домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 29, 55, 81, 190 или 241. В соответствии с другим предпочтительным вариантом осуществления первый домен <sup>10</sup>Fn3 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 36, 62, 88, 197 или 248.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления мультивалентный аднектин содержит второй <sup>10</sup>Fn3 домен, который представляет собой <sup>10</sup>Fn3 домен, специфично связывающийся с целевым белком, отличным от сывороточного альбумина.

В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления второй <sup>10</sup>Fn3 домен специфично связывается с PCSK9.

Таким образом, в соответствии с одним вариантом осуществления второй <sup>10</sup>Fn3 домен содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична SEQ ID NO: 168 или 261 или отличается от нее не более чем на 1, 1-2, 1-5, 1-10 или 1-20 аминокислот, например, аминокислотных делеций, дополнений или замен (например, консервативных аминокислотных замен). Дополнительные подходящие <sup>10</sup>Fn3 домены, которые связываются с PCSK9, раскрыты, например, в WO 2011/130354, содержание которой включено в настоящий документ при помощи ссылки.

В соответствии с одним вариантом осуществления второй <sup>10</sup>Fn3 домен имеет аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 168 или 261.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления настоящее изобретение относится к связывающему PCSK9 и сывороточный альбумин тандемному аднектину, содержащему аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 168 или 261, а также к связывающим PCSK9 и сывороточный альбумин тандемным аднектинам с аминокислотными последовательностями, которые по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны им или отличаются от них не более чем на 1, 1-2, 1-5, 1-10 или 1-20 аминокислот, например, аминокислотных делеций, дополнений или замен (например, консервативных аминокислотных замен), причем тандемный аднектин сохраняет связывание с PCSK9 и сывороточным альбумином.

В соответствии с одним вариантом осуществления настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей связывающий PCSK9 и сывороточный альбумин tandemный аднектин, содержащей последовательность нуклеиновой кислоты, изложенную под SEQ ID NO: 172, а также последовательности нуклеиновой кислоты, которые по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичны ей, причем кодируемый связывающий PCSK9 и сывороточный альбумин tandemный аднектин сохраняет связывание с PCSK9 и сывороточным альбумином. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нуклеотидные замены не изменяют получаемую в результате транскрибируемую аминокислотную последовательность (т.е. молчащие мутации).

В соответствии с одним аспектом основанные на связывании сывороточного альбумина tandemные аднектины (например, tandemный аднектин PCSK9-PKE2), описываемые в настоящем документе, связываются с сывороточным альбумином человека с  $K_D$ , составляющей менее 3, 2,5, 2, 1,5, 1 мкМ, 500 нМ, 100, 50, 10, 1 нМ, 500 пМ, 100, 100, 50 или 10 пМ.  $K_D$  может, например, находиться в диапазоне от 0,1 до 50 нМ, от 0,1 до 100 нМ, от 0,1 нМ до 1 мкМ, от 0,5 до 50 нМ, от 0,5 до 100 нМ, от 0,5 нМ до 1 мкМ, от 1 до 50 нМ, от 1 до 100 нМ или от 1 нМ до 1 мкМ.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления основанные на связывании сывороточного альбумина tandemные аднектины (например, tandemный аднектин PCSK9-PKE2), описываемые в настоящем документе, также могут связываться с сывороточным альбумином от одного или нескольких из яванского макака, макака-резус, крысы или мыши.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления основанные на связывании сывороточного альбумина tandemные аднектины (например, tandemный аднектин PCSK9-PKE2), описываемые в настоящем документе, связываются с сывороточным альбумином макака-резус (RhSA) или сывороточным альбумином яванского макака (CySA) с  $K_D$ , составляющей менее 3, 2,5, 2, 1,5, 1 мкМ, 500 нМ, 100, 50, 10, 1 нМ, 500 пМ или 100 пМ.  $K_D$  может, например, находиться в диапазоне от 0,1 до 50 нМ, от 0,1 до 100 нМ, от 0,1 нМ до 1 мкМ, от 0,5 до 50 нМ, от 0,5 до 100 нМ, от 0,5 нМ до 1 мкМ, от 1 до 50 нМ, от 1 до 100 нМ или от 1 нМ до 1 мкМ.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления основанные на связывании сывороточного альбумина tandemные аднектины (например, tandemный аднектин PCSK9-PKE2), описываемые в настоящем документе, связываются с сывороточным альбумином макака-резус (RhSA), сывороточным альбумином яванского макака (CySA) и сывороточным альбумином мыши (MSA) с  $K_D$ , составляющей менее 3, 2,5, 2, 1,5, 1 мкМ, 500 нМ, 100, 50, 10, 1 нМ, 500 пМ или 100 пМ.  $K_D$  может, например, находиться в диапазоне от 0,1 до 50 нМ, от 0,1 до 100 нМ, от 0,1 нМ до 1 мкМ, от 0,5 до 50 нМ, от 0,5 до 100 нМ, от 0,5 нМ до 1 мкМ, от 1 до 50 нМ, от 1 до 100 нМ или от 1 нМ до 1 мкМ.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления основанные на связывании сывороточного альбумина tandemные аднектины (например, tandemный аднектин PCSK9-PKE2), описываемые в настоящем документе, связываются с сывороточным альбумином макака-резус (RhSA), сывороточным альбумином яванского макака (CySA), сывороточным альбумином мыши (MSA) и сывороточным альбумином крысы (RSA) с  $K_D$ , составляющей менее 3, 2,5, 2, 1,5, 1 мкМ, 500 нМ, 100, 50, 10, 1 нМ, 500 пМ или 100 пМ.  $K_D$  может, например, находиться в диапазоне от 0,1 до 50 нМ, от 0,1 до 100 нМ, от 0,1 нМ до 1 мкМ, от 0,5 до 50 нМ, от 0,5 до 100 нМ, от 0,5 нМ до 1 мкМ, от 1 до 50 нМ, от 1 до 100 нМ или от 1 нМ до 1 мкМ.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления основанные на связывании сывороточного альбумина tandemные аднектины (например, tandemный аднектин PCSK9-PKE2), описываемые в настоящем документе, связываются с сывороточным альбумином в диапазоне pH от 5,5 до 7,4.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления основанные на связывании сывороточного альбумина tandemные аднектины (например, tandemный аднектин PCSK9-PKE2), описываемые в настоящем документе, связываются с доменом I-II сывороточного альбумина человека.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления основанные на связывании сывороточного альбумина tandemные аднектины (например, tandemный аднектин PCSK9-PKE2), описываемые в настоящем документе, имеют период полужизни в сыворотке в присутствии альбумина человека, сывороточного альбумина яванского макака, сывороточного альбумина макака-резус, сывороточного альбумина мыши и/или сывороточного альбумина крысы, составляющем по меньшей мере 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 ч или по меньшей мере приблизительно 300 ч. В соответствии с конкретными вариантами осуществления основанные на связывании сывороточного альбумина tandemные аднектины (например, tandemный аднектин PCSK9-PKE2), описываемые в настоящем документе, имеют период полужизни в сыворотке в присутствии альбумина человека, сывороточного альбумина яванского макака, сывороточного альбумина макака-резус, сывороточного альбумина мыши и/или сывороточного альбумина крысы, составляющий 1-300 ч, например 1-250, 1-200, 1-150, 1-100, 1-90, 1-80, 1-70, 1-60, 1-50, 1-40, 1-30, 1-20, 1-10, 1-5, 5-300, 10-300, 20-300, 30-300, 40-300, 50-300, 60-300, 70-300, 80-300, 90-300, 100-300, 150-300, 200-300, 250-300, 5-250, 10-200, 50-150 или 80-120 ч.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления период полужизни в сыворотке партнерского аднектина в основанном на связывании сывороточного альбумина tandemном аднектине (например, аднектин PCSK9 в случае tandemного аднектина PCSK9-PKE2) повышен относительно периода

полужизни в сыворотке партнерского аднектина без конъюгации со связывающим сывороточный альбумин аднектином. В соответствии с конкретными вариантами осуществления период полужизни в сыворотке основанного на связывании сывороточного альбумина tandemного аднектина по меньшей мере на 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 180, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1500, 1800, 1900, 2000, 2500 или 3000% дольше относительно периода полужизни в сыворотке партнерского аднектина без конъюгации со связывающим сывороточный альбумин аднектином. В соответствии с конкретными вариантами осуществления период полужизни в сыворотке основанного на связывании сывороточного альбумина tandemного аднектина на 20-3000%, например 40-3000, 60-3000, 80-3000, 100-3000, 120-3000, 150-3000, 180-3000, 200-3000, 400-3000, 600-3000, 800-3000, 1000-3000, 1200-3000, 1500-3000, 1800-3000, 1900-3000, 2000-3000, 2500-3000, 20-2500, 20-2000, 20-1900, 20-1800, 20-1500, 20-1200, 20-1000, 20-800, 20-600, 20-400, 20-200, 20-180, 20-150, 20-120, 20-100, 20-80, 20-60, 20-40, 50-2500, 100-2000, 150-1500, 200-1000, 400-800 или 500-700% дольше относительно периода полужизни в сыворотке партнерского аднектина без конъюгации со связывающим сывороточный альбумин аднектином. В соответствии с конкретными вариантами осуществления период полужизни в сыворотке основанного на связывании сывороточного альбумина tandemного аднектина по меньшей мере в 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раз, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 10 раз, 12 раз, 13 раз, 15 раз, 17 раз, 20 раз, 22 раза, 25 раз, 27 раз, 30 раз, 35 раз, 40 раз или 50 раз больше периода полужизни в сыворотке партнерского аднектина без конъюгации со связывающим сывороточный альбумин аднектином. В соответствии с конкретными вариантами осуществления период полужизни в сыворотке основанного на связывании сывороточного альбумина tandemного аднектина в 1,5-50 раз, например в 1,5-40 раз, 1,5-35 раз, 1,5-30 раз, 1,5-27 раз, 1,5-25 раз, 1,5-22 раза, 1,5-20 раз, 1,5-17 раз, 1,5-15 раз, 1,5-13 раз, 1,5-12 раз, 1,5-10 раз, 1,5-9 раз, 1,5-8 раз, 1,5-7 раз, 1,5-6 раз, 1,5-5 раз, 1,5-4,5 раза, 1,5-4 раза, 1,5-3,5 раза, 1,5-3 раза, 1,5-2,5 раза, 1,5-2 раза, 2-50 раз, 2,5-50 раз, 3-50 раз, 3,5-50 раз, 4-50 раз, 4,5-50 раз, 5-50 раз, 6-50 раз, 7-50 раз, 8-50 раз, 10-50 раз, 12-50 раз, 13-50 раз, 15-50 раз, 17-50 раз, 20-50 раз, 22-50 раз, 25-50 раз, 27-50 раз, 30-50 раз, 40-50 раз, 2-40 раз, 5-35 раз, 10-20 раз или 10-15 раз больше периода полужизни в сыворотке партнерского аднектина без конъюгации со связывающим сывороточный альбумин аднектином. В соответствии с конкретными вариантами осуществления период полужизни в сыворотке основанного на связывании сывороточного альбумина tandemного аднектина составляет по меньшей мере 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 135, 140, 150, 160 или 200 ч. В соответствии с конкретными вариантами осуществления период полужизни в сыворотке основанного на связывании сывороточного альбумина tandemного аднектина составляет 2-200, 2,5-200, 3-200, 4-200, 5-200, 6-200, 7-200, 8-200, 9-200, 10-200, 15-200, 20-200, 25-200, 30-200, 35-200, 40-200, 50-200, 60-200, 70-200, 80-200, 90-200, 100-200, 125-200, 150-200, 175-200, 190-200, 2-190, 2-175, 2-150, 2-125, 2-100, 2-90, 2-80, 2-70, 2-60, 2-50, 2-40, 2-35, 2-30, 2-25, 2-20, 2-15, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 5-175, 10-150, 15-125, 20-100, 25-75 или 30-60 ч.

Е. Конъюгаты связывающих сывороточный альбумин аднектинов.

В соответствии с конкретными аспектами настоящего изобретения относится к конъюгатам, содержащим связывающий сывороточный альбумин аднектин и по меньшей мере один дополнительный фрагмент (например, терапевтический фрагмент). Дополнительный фрагмент может быть пригоден для любой диагностической, визуализационной или терапевтической цели.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления связывающий сывороточный альбумин аднектин гибридизирован со вторым фрагментом, который представляет собой малую органическую молекулу, нуклеиновую кислоту, пептид или белок. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления связывающий сывороточный альбумин аднектин гибридизирован с терапевтическим фрагментом, который нацелен на рецепторы, лиганды рецепторов, белки вирусной оболочки, белки иммунной системы, гормоны, ферменты, антигены или сигнальные белки клеток. Гибрид можно сформировать путем присоединения второго фрагмента к любому концу связывающего сывороточный альбумин аднектина, т.е. связывающий сывороточный альбумин аднектин-терапевтическая молекула или терапевтическая молекула-связывающий сывороточный альбумин аднектин.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления период полужизни в сыворотке фрагмента, гибридизированного со связывающим сывороточный альбумин аднектином повышен относительно периода полужизни в сыворотке фрагмента без гибридизации со связывающим сывороточный альбумин аднектином. В соответствии с конкретными вариантами осуществления период полужизни в сыворотке гибрида связывающего сывороточный альбумин аднектина по меньшей мере на 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 180, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1500, 1800, 1900, 2000, 2500 или 3000% дольше относительно периода полужизни в сыворотке фрагмента без гибридизации со связывающим сывороточный альбумин аднектином. В соответствии с конкретными вариантами осуществления период полужизни в сыворотке гибрида связывающего сывороточный альбумин аднектина на 20-3000%, например 40-3000, 60-3000, 80-3000, 100-3000, 120-3000, 150-3000, 180-3000, 200-3000, 400-3000, 600-3000, 800-3000, 1000-3000, 1200-3000, 1500-3000, 1800-3000, 1900-3000, 2000-3000, 2500-3000, 20-2500, 20-2000, 20-1900, 20-1800, 20-1500, 20-1200, 20-1000, 20-800, 20-600, 20-400, 20-200, 20-180, 20-150, 20-120, 20-100, 20-80, 20-60, 20-40, 50-2500, 100-2000, 150-1500, 200-1000, 400-800 или 500-700% дольше относительно периода полужизни в сыворотке фрагмента без гибридизации со связывающим сывороточный альбумин аднекти-

ном. В соответствии с конкретными вариантами осуществления период полужизни в сыворотке гибрида аднектина PKE2 по меньшей мере в 1,5 раза, 2 раза, 2,5 раза, 3 раза, 3,5 раза, 4 раза, 4,5 раза, 5 раз, 6 раз, 7 раз, 8 раз, 10 раз, 12 раз, 13 раз, 15 раз, 17 раз, 20 раз, 22 раза, 25 раз, 27 раз, 30 раз, 35 раз, 40 раз или 50 раз больше периода полужизни в сыворотке фрагмента без гибридизации со связывающим сывороточный альбумин аднектином. В соответствии с конкретными вариантами осуществления период полужизни в сыворотке гибрида аднектина PKE2 в 1,5-50 раз, например 1,5-40 раз, 1,5-35 раз, 1,5-30 раз, 1,5-27 раз, 1,5-25 раз, 1,5-22 раза, 1,5-20 раз, 1,5-17 раз, 1,5-15 раз, 1,5-13 раз, 1,5-12 раз, 1,5-10 раз, 1,5-9 раз, 1,5-8 раз, 1,5-7 раз, 1,5-6 раз, 1,5-5 раз, 1,5-4,5 раза, 1,5-4 раз, 1,5-3,5 раза, 1,5-3 раза, 1,5-2,5 раза, 1,5-2 раза, 2-50 раз, 2,5-50 раз, 3-50 раз, 3,5-50 раз, 4-50 раз, 4,5-50 раз, 5-50 раз, 6-50 раз, 7-50 раз, 8-50 раз, 10-50 раз, 12-50 раз, 13-50 раз, 15-50 раз, 17-50 раз, 20-50 раз, 22-50 раз, 25-50 раз, 27-50 раз, 30-50 раз, 40-50 раз, 2-40 раз, 5-35 раз, 10-20 раз или 10-15 раз больше периода полужизни в сыворотке фрагмента без гибридизации со связывающим сывороточный альбумин аднектином. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления период полужизни в сыворотке гибрида связывающего сывороточный альбумин аднектина составляет по меньшей мере 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 135, 140, 150, 160 или 200 ч. В соответствии с конкретными вариантами осуществления период полужизни в сыворотке гибрида связывающего сывороточный альбумин аднектина составляет 2-200, 2,5-200, 3-200, 4-200, 5-200, 6-200, 7-200, 8-200, 9-200, 10-200, 15-200, 20-200, 25-200, 30-200, 35-200, 40-200, 50-200, 60-200, 70-200, 80-200, 90-200, 100-200, 125-200, 150-200, 175-200, 190-200, 2-190, 2-175, 2-150, 2-125, 2-100, 2-90, 2-80, 2-70, 2-60, 2-50, 2-40, 2-35, 2-30, 2-25, 2-20, 2-15, 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5, 2-4, 2-3, 5-175, 10-150, 15-125, 20-100, 25-75 или 30-60 ч.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления гибридные белки связывающего сывороточный альбумин аднектина связываются с HSA с  $K_D$ , составляющей менее 3, 2,5, 2, 1,5, 1 мкМ, 500 нМ, 100, 50, 10, 1 нМ, 500 пМ, 100, 100, 50 или 10 пМ.  $K_D$  может, например, находиться в диапазоне от 0,1 до 50 нМ, от 0,1 до 100 нМ, от 0,1 нМ до 1 мкМ, от 0,5 до 50 нМ, от 0,5 до 100 нМ, от 0,5 нМ до 1 мкМ, от 1 до 50 нМ, от 1 до 100 нМ или от 1 нМ до 1 мкМ.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления терапевтический фрагмент может быть напрямую или опосредовано связан со связывающим сывороточный альбумин аднектином при помощи описанного в настоящем документе полимерного линкера. Полимерные линкеры можно применять для оптимального изменения расстояния между каждым компонентом гибрида для создания белкового гибрида с одной или несколькими из следующих характеристик: 1) уменьшенные или увеличенные стерические затруднения связывания одного или нескольких белковых доменов при связывании с представляющим интерес белком, 2) повышенная стабильность или растворимость белка, 3) пониженная агрегация белка и 4) повышенная общая avidность или аффинность белка.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления описанные в настоящем документе гибриды связаны со связывающим сывороточный альбумин аднектином с помощью полипептидного линкера, имеющего сайт узнавания протеазами, который расщепляется протеазой в крови или целевой ткани. Такие варианты осуществления можно применять для высвобождения терапевтического белка для лучшей доставки или улучшения терапевтических свойств или более эффективной продуктивности.

Дополнительные линкеры или спэйсеры можно внести на С-конце  $^{10}\text{Fn3}$  домена между  $^{10}\text{Fn3}$  доменом и полипептидным линкером.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления терапевтический фрагмент присоединен к связывающему сывороточный альбумин аднектину посредством биосовместимого полимера, такого как полимерный сахар. Полимерный сахар может включать сайт ферментативного расщепления, который расщепляется ферментом в крови или целевой ткани. Такие варианты осуществления можно применять для высвобождения терапевтических белков для лучшей доставки или улучшения терапевтических свойств или более эффективной продуктивности.

Описываемые в настоящем документе гибридные молекулы связывающего сывороточный альбумин аднектина пригодны для повышения периода полужизни терапевтического фрагмента путем создания гибрида между терапевтическим фрагментом и связывающим сывороточный альбумин аднектином. Такие гибридные молекулы можно применять для лечения состояний, которые отвечают на биологическую активность содержащегося в гибриде терапевтического фрагмента. Настоящее изобретение относится к применению гибридных молекул связывающего сывороточный альбумин Fn3 при заболеваниях, вызванных нарушением регуляции любого из приведенных белков или молекул.

В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления терапевтический фрагмент, который соединен (либо на С-конце, либо на N-конце) со связывающим сывороточный альбумин аднектином, представляет собой VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2, VEGF-R3, Her-1, Her-2, Her-3, EGF-I, EGF-2, EGF-3, альфа3, cMet, ICOS, CD40L, LFA-I, c-Met, ICOS, LFA-I, IL-6, B7.1, W1.2, OX40, IL-1b, TACI, IgE, BAFF или BLys, TPO-R, CD19, CD20, CD22, CD33, CD28, IL-I-R1, TNF-альфа, TRAIL-R1, рецептор комплемента 1, FGfа, остеопонтин, витронектин, эфрин A1-A5, эфрин B1-B3, альфа-2-макроглобулин, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CCL13, CCL14, CCL15, CXCL16, CCL16, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, PDGF, TGFb, GMCSF, SCF, p40 (IL12/IL23), IL1b, IL1a, IL1ra, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL8, IL10, IL12, IL15, IL23, Fas, FasL, лиганд Flt3,

41BB, ACE, ACE-2, KGF, FGF-7, SCF, нетрин 1,2, IFN $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ , каспаза-2,3,7,8,10, ADAM S1,S5,8,9,15,TS1,TS5; адипонектин, ALCAM, ALK-I, APRIL, аннексин V, ангиогенин, амфирегулин, ангиопоэтин-1,2,4, B7-1/CD80, B7-2/CD86, B7-H1, B7-H2, B7-H3, Bcl-2, BACE-I, BAK, BCAM, BDNF, bNGF, bECGF, BMP2,3,4,5,6,7,8; CRP, кадгерин 6, 8, 11; катепсин A,B,C,D,E,L,S,V,X; CD1 1a/LFA-1, LFA-3, GP2b3a, рецептор GH, F белок RSV, IL-23 (p40, p19), IL-12, CD80, CD86, CD28, CTLA-4, альфа4-бета1, альфа4-бета7, TNF/лимфотоксин, IgE, CD3, CD20, IL-6, IL-6R, BLYS/BAFF, IL-2R, HER2, EGFR, CD33, CD52, дигоксин, Rho (D), белок вируса ветряной оспы, белок вируса гепатита, белок CMV, белок возбудителя столбняка, белок вируса коровьей оспы, антитоксин против змеиного яда, ботулинический белок, Trail-R1, Trail-R2, сMet, представители семейства TNF-R, такие как LA NGF-R, CD27, CD30, CD40, CD95, рецептор а/б лимфотоксина, WsI-I, TL1A/TNFSF15, BAFF, BAFF-R/TNFRSF13C, TRAIL R2/TNFRSF10B, TRAIL R2/TNFRSF10B, Fas/TNFRSF6 CD27/TNFRSF7, DR3/TNFRSF25, HVEM/TNFRSF14, TROY/TNFRSF19, CD40 лиганд/TNFSFS, BCMA/TNFRSF17, CD30/TNFRSF8, LIGHT/TNFSF14, 4-1BB/TNFRSF9, CD40/TNFRSF5, GITR/[гамма]TNFRSF 18, остеопротегерин/TNFRSF1 IB, RANK/TNFRSF1 IA, TRAIL R3/TNFRSF10C, TRAIL/TNFSF10, TRANCE/RANK L/TNFSF11, 4-1BB лиганд/TNFSF9, TWEAK/TNFSF12, CD40 лиганд/TNFSFS, Fas лиганд/TNFSF6, RELT/TNFRSF19L, APRIL/TNFSF13, DcR3/TNFRSF6B, TNF RI/TNFRSF1A, TRAIL R1/TNFRSF10A, TRAIL R4/TNFRSF10D, CD30 лиганд/TNFSFS, GITR лиганд/TNFSF18, TNFSF18, TACI/TNFRSF13B, NGF R/TNFRSF16, OX40 лиганд/TNFSF4, TRAIL R2/TNFRSF10B, TRAIL R3/TNFRSF10C, TWEAK R/TNFRSF12, BAFF/BLyS/TNFSF13, DR6/TNFRSF21, TNF-альфа/TNFSF1 A, про-TNF-альфа/TNFSF1A, лимфотоксин бета R/TNFRSF3, химера лимфотоксин бета R (LT $\beta$ R)/Fc, TNF RI/TNFRSF1A, TNF-бета/TNFSF1B, PGRP-S, TNF RI/TNFRSF1A, TNF RII/TNFRSF1B, EDA-A2, TNF-альфа/TNFSF1A, EDAR, XEDAR, TNF RI/TNFRSF1A.

В соответствии с иллюстративными вариантами осуществления терапевтический фрагмент, который соединен (либо на С-конце, либо на N-конце) со связывающим сывороточный альбумин аднектином, представляет собой любой из приведенных далее белков или связывающихся с ним белков: 4EBP1, 14-3-3 дзета, 53BP1, 2B4/SLAMF4, CCL21/6Скин, 4-1BB/TNFRSF9, 8D6A, 4-1BB лиганд/TNFSF9, 8-оксо-dG, 4-амино-1,8-нафталимид, A2B5, аминоксипептидаза LRAP/ERAP2, A33, аминоксипептидаза N/ANPEP, Aag, аминоксипептидаза P2/XPNPEP2, ABCG2, аминоксипептидаза P1/XPNPEP1, ACE, аминоксипептидаза PILS/ARTS1, ACE-2, амнионлесс, актин, амфирегулин, бета-актин, АМПК альфа 1/2, активин А, АМПК альфа 1, активин АВ, АМПК альфа 2, активин В, АМПК бета 1, активин С, АМПК бета 2, активин RIA/ALK-2, андроген R/NR3C4, активин RIB/ALK-4, ангиогенин, активин RIIA, ангиопоэтин-1, активин RIIВ, ангиопоэтин-2, ADAMS, ангиопоэтин-3, ADAM9, ангиопоэтин-4, ADAM10, ангиопоэтин-подобный фактор 1, ADAM12, ангиопоэтин-подобный фактор 2, ADAM15, ангиопоэтин-подобный фактор 3, TACE/ADAM17, ангиопоэтин-подобный фактор 4, ADAM19, ангиопоэтин-подобный фактор 7/CDT6, ADAM33, ангиостатин, ADAMTS4, аннексин A1/аннексин I, ADAMTS5, аннексин A7, ADAMTS1, аннексин A10, ADAMTSL-1/пунктин, аннексин V, адипонектин/Asp30, ANP, AEBSF, Ар-сайт, агрекан, APAF-I, агрин, APC, AgRP, APE, AGTR-2, APJ, AIF, APLP-I, Akt, APLP-2, Akt1, аполипопротеин A1, Akt2, аполипопротеин B, Akt3, APP, сывороточный альбумин, APRIL/TNFSF13, ALCAM, ARC, ALK-I, артемин, ALK-7, арилсульфатаза AJARSA, щелочная фосфатаза, ASAH2/N-ацилсфингозин амидогидролаза-2, альфа 2u-глобулин, ASC, альфа-1-кислый гликопротеин, ASGR1, альфа-фетопропротеин, ASK1, ALS, АТМ, амелобластический ATRIP, AMICA/JAML, Aurora A, AMIGO, Aurora B, AMIG02, аксин-1, AMIG03, AxI, аминоксипептидаза/ACY1, азуроцидин/CAP37/HBP, аминоксипептидаза A/ENPEP, B4GALT1, BIM, B7-1/CD80, 6-биотин-17-NAD, B7-2/CD86, BLAME/SLAMF8, B7-H1/PD-L1, CXCL13/BLC/BCA-1, B7-H2, BLIMP1, B7-H3, BIK, B7-H4, BMI-I, BACE-I, BMP-1/PCP, BACE-2, BMP-2, Bad, BMP-3, BAFF/TNFSF13B, BMP-3b/GDF-10, BAFF R/TNFRSF 13C, BMP-4, Bag-1, BMP-5, BAK, BMP-6, BAMBI/NMA, BMP-7, BARD 1, BMP-8, Вах, BMP-9, BCAM, BMP-10, Bcl-10, BMP-15/GDF-9B, Bcl-2, BMPR-IA/ALK-3, Bcl-2 родственный белок A1, BMPR-IB/ALK-6, Bcl-w, BMPR-II, Bcl-x, BNIP3L, Bcl-xL, BOC, BCMA/TNFRSF17, BOK, BDNF, BPDE, бензамид, брахиурия, общая бета-цепь, B-Raf, бета IG-H3, CXCL14/BRAK, бета-целлюлин, BRCA1, бета-дефензин 2, BRCA2, BID, BTLA, бигликан, Bub-1, BIK-подобный белок-убийца, c-jun, CD90/Thy1, c-Rel, CD94, CCL6/C10, CD97, C1qR1/CD93, CD151, C1qTNF1, CD160, C1qTNF4, CD163, C1qTNF5, CD164, компонент комплемента C1r, CD200, компонент комплемента C1s, CD200 R1, компонент комплемента C2, CD229/SLAMF3, компонент комплемента C3a, CD23/Fc эпсилон R11, компонент комплемента C3d, CD2F-10/SLAMF9, компонент комплемента C5a, CD5L, кадгерин-4/R-кадгерин, CD69, кадгерин-6, CDC2, кадгерин-8, CDC25A, кадгерин-11, CDC25B, кадгерин-12, CDCP1, кадгерин-13, CDO, кадгерин-17, CDX4, E-кадгерин, CEACAM-1/CD66a, N-кадгерин, CEACAM-6, P-кадгерин, Serberus 1, VE-кадгерин, CFTR, кальбиндин D, cGMP, кальциневрин A, Chem R23, кальциневрин B, хемерин, калретикулин-2, наборы образцов хемокинов, СаМ-киназа II, хитиназа 3-подобный фактор 1, сAMP, хитотриозидаза/CHIT1, каннабиноид R1, Chk1, каннабиноид R2/CB2/CNR2, Chk2, CAR/NR1I3, CHL-1/L1CAM-2, карбоангидраза I, холинацетилтрансфераза/CbAT, карбоангидраза II, хондролектин, карбоангидраза III, хордин, карбоангидраза IV, хордин-подобный фактор 1, карбоангидраза VA, хордин-подобный фактор 2, карбоангидраза VB, CINC-I, карбоангидраза VI, CINC-2, карбоангидраза VII, CINC-3, карбоангидраза VIII, класпин, карбоангидраза IX, клаудин-6, кар-

боангидраза X, CLC, карбоангидраза XII, CLEC-1, карбоангидраза XIII, CLEC-2, карбоангидраза XIV, CLECSF 13/CLEC4F, карбоксиметиллизин, CLECSF8, карбоксипептидаза A1/CPA1, CLF-I, карбоксипептидаза A2, CL-P1/COLEC12, карбоксипептидаза A4, кластерин, карбоксипептидаза B1, кластерин-подобный фактор 1, карбоксипептидаза E/CPE, CMG-2, карбоксипептидаза XI, CMV UL146, кардиотрофин-1, CMV UL147, карнозиндипептидаза 1, CNP, Caronte, CNTF, CART, CNTF R альфа, каспаза, фактор коагуляции II/тромбин, каспаза-1, фактор коагуляции II 1/тканевой фактор, каспаза-2, фактор коагуляции VII, каспаза-3, фактор коагуляции X, каспаза-4, фактор коагуляции XI, каспаза-6, фактор коагуляции XIV/белок C, каспаза-7, СОСО, каспаза-8, когезин, каспаза-9, коллаген I, каспаза-10, коллаген II, каспаза-12, коллаген IV, каспаза-13, общая гамма-цепь/IL-2 R гамма, пептидные ингибиторы каспаз, СОМР/тромбоспондин-5, каталаза, компонент комплемента C1qLP, бета-катенин, компонент комплемента C1qA, катепсин 1, компонент комплемента C1qC, катепсин 3, фактор D комплемента, катепсин 6, фактор I комплемента, катепсин А, МASP3 комплемента, катепсин В, коннексин 43, катепсин С/DPPI, контактин-1, катепсин D, контактин-2/TAG1, катепсин Е, контактин-4, катепсин F, контактин-5, катепсин H, корин, катепсин L, корнулин, катепсин O, CORS26/ClqTNF.3, катепсин S, кортикальные стволовые клетки крысы, катепсин V, кортизол, катепсин XITJ?, COUP-TF I/NR2F1, CBP, COUP-TF II/NR2F2, CCI, COX-I, CCK-A R, COX-2, CCL28, CRACC/SLAMF7, CCR1, С-реактивный белок, CCR2, креатинкиназа, мышечная/СКММ, CCR3, креатинин, CCR4, CREB, CCR5, CREG, CCR6, CRELD1, CCR7, CRELD2, CCR8, CRHBP, CCR9, CRHR-I, CCR10, CRIM1, CD155/PVR, Cripto, CD2, CRISP-2, CD3, CRISP-3, CD4, Crossveinless-2, CD4+/45RA-, CRTAM, CD4+/45RO, CRTH-2, CD4+/CD62L-/CD44, CRY1, CD4+/CD62L+/CD44, Cryptic, CD5, CSB/ERCC6, CD6, CCL27/STACK, CD8, CTGF/CCN2, CD8+/45RA-, CTLA-4, CD8+/45RO-, кубилин, CD9, CX3CR1, CD14, CXADR, CD27/TNFRSF7, CXCL16, CD27 лиганд/TNFRSF7, CXCR3, CD28, CXCR4, CD30/TNFRSF8, CXCR5, CD30 лиганд/TNFRSF8, CXCR6, CD31/PECAM-1, циклофилин А, CD34, Cyt61/CCN1, CD36/SR-B3, цистатин А, CD38, цистатин В, CD40/TNFRSF5, цистатин С, CD40 лиганд/TNFRSF5, цистатин D, CD43, цистатин Е/М, CD44, цистатин F, CD45, цистатин H, CD46, цистатин H2, CD47, цистатин S, CD48/SLAMF2, цистатин SA, CD55/DAF, цистатин SN, CD58/LFA-3, цитохром С, CD59, апоцитохром С, CD68, голоцитохром с, CD72, цитокератин 8, CD74, цитокератин 14, CD83, цитокератин 19, CD84/SLAMF5, цитонин, D6, DISP1, DAN, Dkk-1, DANCE, Dkk-2, DARPP-32, Dkk-3, DAX1/NR0B1, Dkk-4, DCC, DLEC, DCIR/CLEC4A, DLL1, DCAR, DLL4, DcR3/TNFRSF6B, d-люциферин, DC-SIGN, ДНК-лигаза IV, DC-SIGNR/CD299, ДНК-полимераза бета, DcTRAIL R1/TNFRSF23, DNAM-I, DcTRAIL R2/TNFRSF22, DNA-ПКcs, DDR1, DNER, DDR2, допа-декарбоксилаза/DDC, DEC-205, DPCR-I, декапентаплегический транскрипт, DPP6, декорин, DPP A4, дектин-1/CLEC7A, DPPA5/ESG1, дектин-2/CLEC6A, DPPII/QPP/DPP7, DEP-1/CD148, DPPIV/CD26, Desert Hedgehog, DR3/TNFRSF25, десмин, DR6/TNFRSF21, десмоглеин-1, DSCAM, десмоглеин-2, DSCAM-L1, десмоглеин-3, DSPG3, Dishevelled-1, Dtk, Dishevelled-3, динамин, EAR2/NR2F6, EphA5, ECE-I, EphA6, ECE-2, EphA7, ECF-L/CHI3L3, EphA8, ECM-I, EphB1, Ecotin, EphB2, EDA, EphB3, EDA-A2, EphB4, EDAR, EphB6, EDG-I, эфрин, EDG-5, эфрин-A1, EDG-8, эфрин-A2, eEF-2, эфрин-A3, EGF, эфрин-A4, EGFR, эфрин-A5, EGR1, эфрин-B, EG-VEGF/PK1, эфрин-B1, eIF2 альфа, эфрин-B2, eIF4E, эфрин-B3, Elk-1, эпиген, EMAP-II, эпиморфин/синтаксин 2, EMMPRIN/CD147, эфирегулин, CXCL5/ENA, EPR-1/Ха рецептор, эндокан, ErbB2, эндоглин/CD105, ErbB3, эндогликан, ErbB4, эндонуклеаза III, ERCC1, эндонуклеаза IV, ERCC3, эндонуклеаза V, ERK1/ERK2, эндонуклеаза VIII, ERK1, эндорепеллин/перлекан, ERK2, эндостатин, ERK3, эндотелии-1, ERK5/BMK1, Engrailed-2, ERR альфа/NR3B1, EN-RAGE, ERR бета/NR3B2, энтеропептидаза/энтерокиназа, ERR гамма/NR3B3, CCL1 1/эотаксин, эритропоэтин, CCL24/эотаксин-2, эритропоэтин R, CCL26/эотаксин-3, ESAM, EpCAM/TROP-1, ER альфа/NR3A1, EPCR, ER бета/NR3A2, Eph, экзонуклеаза III, EphA1, экзостозин-подобный фактор 2/EXTL2, EphA2, экзостозин-подобный фактор 3/EXTL3, EphA3, FABP1, FGF-BP, FABP2, FGF R1-4, FABP3, FGF R1, FABP4, FGF R2, FABP5, FGF R3, FABP7, FGF R4, FABP9, FGF R5, фактор В комплемента, Fgf, FADD, FHR5, FAM3A, фибронектин, FAM3B, фиколин-2, FAM3C, фиколин-3, FAM3D, FITC, белок активации фибробластов альфа/FAP, FKBP38, Fas/TNFRSF6, Flap, Fas лиганд/TNFRSF6, FLIP, FATP1, FLRG, FATP4, FLRT1, FATP5, FLRT2, Fc гамма R1/CD64, FLRT3, Fc гамма RIIb/CD32b, Flt-3, Fc гамма RIII/CD32c, Flt-3 лиганд, Fc гамма RIIA/CD32a, фоллистатин, Fc гамма RIII/CD16, фоллистатин-подобный фактор 1, FcRH1/IRTA5, FosB/G0S3, FcRH2/IRTA4, FoxD3, FcRH4/IRTA1, FoxJ1, FcRH5/IRTA2, FoxP3, Fc рецептор-подобный фактор 3/CD16-2, Fpg, FEN-I, FPR1, фетуин А, FPRL1, фетуин В, FPRL2, FGF кислый, CX3CL1/фракталкин, FGF основной, Frizzled-1, FGF-3, Frizzled-2, FGF-4, Frizzled-3, FGF-5, Frizzled-4, FGF-6, Frizzled-5, FGF-8, Frizzled-6, FGF-9, Frizzled-7, FGF-10, Frizzled-8, FGF-11, Frizzled-9, FGF-12, Frk, FGF-13, sFRP-1, FGF-16, sFRP-2, FGF-17, sFRP-3, FGF-19, sFRP-4, FGF-20, фурин, FGF-21, FXR/NR1H4, FGF-22, Fyn, FGF-23, G9a/ENMT2, GFR альфа-3/GDNF R альфа-3, GABA-A-R альфа 1, GFR альфа-4/GDNF R альфа-4, GABA-A-R альфа 2, G1TR/TNFRSF18, GABA-A-R альфа 4, G1TR лиганд/TNFRSF18, GABA-A-R альфа 5, GLI-I, GABA-A-R альфа 6, GLI-2, GABA-A-R бета 1, GLP/ENMT1, GABA-A-R бета 2, GLP-I R, GABA-A-R бета 3, глюкагон, GABA-A-R гамма 2, глюкозамин-(N-ацетил)-6-сульфатаза/GNS, GABA-B-R2, GluR1, GAD1/GAD67, GluR2/3, GAD2/GAD65, GluR2, GADD45 альфа, GluR3, GADD45 бета, Glut1, GADD45 гамма, Glut2, галектин-1, Glut3, галектин-2, Glut4, галектин-3, Glut5, галектин-3 BP, глутаредоксин 1, галектин-4, глицин R, галектин-7, гликофорин А, галектин-8, глипикан 2, галектин-9,

глипикан 3, GalNAc4S-6ST, глипикан 5, GAP-43, глипикан 6, GAPDH, GM-CSF, Gas1, GM-CSF R альфа, Gas6, GMF-бета, GASP-1/WFIKKNRP, gp130, GASP-2/WFIKKN, гликогенфосфорилаза BB/GPBB, GATA-I, GPR15, GATA-2, GPR39, GATA-3, GPVI, GATA-4, GR/NR3C1, GATA-5, Gr-1/Ly-6G, GATA-6, гранулин, GBL, гранзим А, GCNF/NR6A1, гранзим В, CXCL6/GCP-2, гранзим D, G-CSF, гранзим G, G-CSF R, гранзим H, GDF-I, GRASP, GDF-3 GRB2, GDF-5, Gremlin, GDF-6, GRO, GDF-7, CXCL1/GRO альфа, GDF-8, CXCL2/GRO бета, GDF-9, CXCL3/GRO гамма, GDF-11, гормон роста, GDF-15, гормон роста R, GDNF, GRP75/HSPA9B, GFAP, GSK-3 альфа/бета, GFI-I, GSK-3 альфа, GFR альфа-1/GDNF R альфа-1, GSK-3 бета, GFR альфа-2/GDNF R альфа-2, EZFIT, H2AX, гистидин, H60, HM74A, HAI-I, HMGA2, HAI-2, HMGB1, HAI-2A, TCF-2/FINF-1 бета, HAI-2B, HNF-3 бета/FoxA2, HAND1, HNF-4 альфа/NR2A1, NAPLN1, HNF-4 гамма/NR2A2, трипсин-подобная протеаза воздухоносных путей/HAT, HO-1/HMOX1/HSP32, HB-EGF, HO-2/HMOX2, CCL 14a/HCC-1, HPRG, CCL14b/HCC-3, Hrk, CCL16/HCC-4, HRP-I, альфа HCG, HS6ST2, Hck, HSD-I, HCR/CRAM-A/B, HSD-2, HDGF, HSP 10/EPF, гемоглобин, HSP27, Herpassocin, HSP60, HES-1, HSP70, HES-4, HSP90, HGF, HTRA/протеаза Do, активатор HGF, HTRA1/PRSS11, HGF R, HtrA2/Omi, HIF-I альфа, HVEM/TNFRSF14, HIF-2 альфа, гиалуронан, HIN-1/секретоглобулин 3A1, 4-гидроксинафенал, Hip, CCL1/I-309/TCA-3, IL-10, cIAP (общая), IL-10 R альфа, cIAP-1/HAIP-2, IL-10 R бета, cIAP-2/HAIP-1, IL-11, IBSP/сиалопротеин II, EL-11 R альфа, ICAM-1/CD54, IL-12, ICAM-2/CD102, IL-12/IL-23 p40, ICAM-3/CD50, IL-12 R бета 1, ICAM-5, IL-12 R бета 2, ICAT, IL-13, ICOS, IL-13 R альфа 1, идуронат-2-сульфатаза/EOS, IL-13 R альфа 2, EFN, IL-15, IFN-альфа, IL-15 R альфа, IFN-альфа 1, IL-16, IFN-альфа 2, IL-17, IFN-альфа 4b, IL-17 R, IFN-альфа A, IL-17 RC, IFN-альфа B2, IL-17 RD, IFN-альфа C, IL-17B, IFN-альфа D, IL-17B R, IFN-альфа F, IL-17C, IFN-альфа G, IL-17D, IFN-альфа H2, IL-17E, IFN-альфа I, IL-17F, IFN-альфа J1, IL-18/L-1F4, IFN-альфа K, IL-18 BPa, IFN-альфа WA, IL-18 BPc, IFN-альфа/бета R1, IL-18 BPd, IFN-альфа/бета R2, IL-18 R альфа/IL-1 R5, IFN-бета, IL-18 R бета/IL-1 R7, IFN-гамма, IL-19, IFN-гамма R1, IL-20, IFN-гамма R2, IL-20 R альфа, IFN-омега, IL-20 R бета, IgE, IL-21, IGFBP-I, IL-21 R, IGFBP-2, IL-22, IGFBP-3, IL-22 R, IGFBP-4, IL-22BP, IGFBP-5, IL-23, IGFBP-6, IL-23 R, IGFBP-L1, IL-24, IGFBP-rp1/IGFBP-7, IL-26/AK155, IGFBP-rPIO, IL-27, IGF-I, EL-28A, IGF-I R, IL-28B, IGF-II, IL-29/EFN-лямбда 1, IGF-II R, IL-31, IgG, EL-31 RA, IgM, IL-32 альфа, IGSF2, IL-33, IGSF4A/SynCAM, ILT2/CD85J, IGSF4B, ILT3/CD85k, IGSF8, ILT4/CD85d, IgY, ILT5/CD85a, IkB-бета, ILT6/CD85e, IKK альфа, Indian Hedgehog, IKK эpsilon, INSRR, EKK гамма, инсулин, IL-1 альфа/IL-IF1, инсулин R/CD220, IL-1 бета/IL-1F2, проинсулин, IL-1ra/IL-1F3, инсулизин/EDE, IL-1F5/IL1 дельта, интегрин альфа 2/CD49b, IL-1F6/IL1 эpsilon, интегрин альфа 3/CD49c, IL-1F7/FIL1 дзета, интегрин альфа 3 бета 1/VLA-3, IL-1F8/FIL1 эта, интегрин альфа 4/CD49d, IL-1F9/IL-1 H1, интегрин альфа 5/CD49e, IL-1F10/IL-1HY2, интегрин альфа 5 бета 1, IL-I RI, интегрин альфа 6/CD49f, IL-I RII, интегрин альфа 7, IL-I R3/IL-1 R AcP, интегрин альфа 9, IL-I R4/ST2, интегрин альфа E/CD103, IL-I R6/IL-1 R rp2, интегрин альфа L/CD1 Ia, IL-I R8, интегрин альфа L бета 2, IL-I R9, интегрин альфа M/CD1 Ib, IL-2, интегрин альфа M бета 2, IL-2 R альфа, интегрин альфа V/CD51, IL-2 R бета, интегрин альфа V бета 5, IL-3, интегрин альфа V бета 3, IL-3 R альфа, интегрин альфа V бета 6, IL-3 R бета, интегрин альфа XJCD1 Ic, IL-4, интегрин бета 1/CD29, IL-4 R, интегрин бета 2/CD18, IL-5, интегрин бета 3/CD61, IL-5 R альфа, интегрин бета 5, IL-6, интегрин бета 6, IL-6 R, интегрин бета 7, IL-7, CXCL10/EP-10/CRG-2, IL-7 R альфа/CD 127, IRAKI, CXCR1/IL-8 RA, IRAK4, CXCR2/IL-8 RB, ERS-I, CXCL8/IL-8, Islet-1, IL-9, CXCL1 1/I-TAC, IL-9 R, Jagged 1, JAM-4/IGSF5, Jagged 2, JNK, JAM-A, JNK1/JNK2, JAM-B/VE-JAM, JNK1, JAM-C, JNK2, кининоген, калликреин 3/PSA, каниностагин, калликреин 4, KER/CD158, калликреин 5, KER2D1, калликреин 6/нейрозин, KIR2DL3, калликреин 7, KIR2DL4/CD158d, калликреин 8/нейропсин, KIR2DS4, калликреин 9, KIR3DL1, калликреин плазмы/KLKB1, KER3DL2, калликреин 10, Kirrel2, калликреин 11, KLF4, калликреин 12, KLF5, калликреин 13, KLF6, калликреин 14, Klotho, калликреин 15, Klotho бета, KC, KOR, Keapl, Kremen-1, KeI1, Kremen-2, KGF/FGF-7, LAG-3, LINGO-2, LAIR1, липин 2, LAIR2, липокалин-1, ламинин альфа 4, липокалин-2/NGAL, ламинин гамма 1,5-липоксигеназа, ламинин I, LXR альфа/NR1H3, ламинин S, LXR бета/NR1H2, ламинин-1, ливин, ламинин-5, LEX, LAMP, LMIR1/CD300A, лангерин, LMIR2/CD300c, LAR, LMIR3/CD300LF, латексин, LMIR5/CD300LB, лайилин, LMIR6/CD300LE, LBP, LM02, LDL R, LOX-1/SR-E1, LECT2, LRH-1/NR5A2, LEDGF, LRIG1, Lefty, LRIG3, Lefty-1, LRP-I, Lefty-A, LRP-6, легумаин, LSEctin/CLEC4G, лептин, люмикан, лептин R, CXCL15/Lungkine, лейкотриен B4, XCL1/лимфотактин, лейкотриен B4 R1, лимфотоксин, LEF, лимфотоксин бета/TNFSF3, LIF R альфа, лимфотоксин бета R/TNFRSF3, LIGHT/TNFSF14, Лун, лимитны, Лур, LIMP2/SR-B2, гомолог лизилоксидазы 2, LIN-28, LYVE-I, LINGO-I, альфа-2-макроглобулин, CXCL9/MIG, MAD2L1, мимекан, MAdCAM-1, миндин, MafB, минералокортикоид R/NR3C2, MafF, CCL3L1/MIP-1 альфа-изоформа LD78 бета, MafG, CCL3/MIP-1 альфа, MafK, CCL4L1/LAG-1, MAG/Siglec-4-a, CCL4/MIP-1 бета, MANF, CCL15/MEP-1 дельта, MAP2, CCL9/10/MIP-1 гамма, MAPK, MIP-2, марапсин/панкреазин, CCL19/MIP-3 бета, MARCKS, CCL20/MIP-3 альфа, MARCO, MIP-I, Mash1, MIP-II, матрилин-2, MIP-III, матрилин-3, MIS/AMH, матрилин-4, MIS RII, матриптаза/ST14, MIXL1, MBL, MKK3/MKK6, MBL-2, MKK3, меланокортин 3R/MC3R, MKK4, MCAM/CD146, MKK6, MCK-2, MKK7, Mcl-I, MKP-3, MCP-6, MLH-I, CCL2/MCP-1, MLK4 альфа, MCP-11, MMP, CCL8/MCP-2, MMP-1, CCL7/MCP-3/MARC, MMP-2, CCL13/MCP-4, MMP-3, CCL12/MCP-5, MMP-7, M-CSF, MMP-8, M-CSF R, MMP-9, MCV-типа II, MMP-IO, MD-I, MMP-I 1, MD-2, MMP-12, CCL22/MDC, MMP-13, MDL-

1/CLEC5A, MMP-14, MDM2, MMP-15, MEA-1, MMP-16/MT3-MMP, MEK1/MEK2, MMP-24/MT5-MMP, MEK1, MMP-25/MT6-MMP, MEK2, MMP-26, мелузин, MMR, MEPE, MOG, меприн-альфа, CCL23/MPIF-1, меприн-бета, M-Ras/R-Ras3, Mer, Mrel 1, мезотелин, метеорин MRP1, MSK1/MSK2, метионинаминопептидаза 1, MSK1, метионинаминопептидаза, MSK2, метионинаминопептидаза 2, MSP, MFG-E8, MSP R/Ron, MFRP, Mug, MgcRacGAP, MULT-I, MGL2, Musashi-1, MGMT, Musashi-2, MIA, MuSK, MICA, ДНК-гликозилаза MutY, MICB, MyD88, M1CL/CLEC12A, миелопероксидаза, микроглобулин бета 2, миокардин, мидкин, миоцилин, MIF, миоглобин, NAIP NGFI-B гамма/NR4A3, Nanog, NgR2/NgRH1, CXCL7/NAP-2, NgR3/NgRH2, Nbsl, нидоген-1/энтактин, NCAM-1/CD56, нидоген-2, NCAM-L1, синтаза оксида азота, нектин-1, нитротирозин, нектин-2/CD1 12, NKG2A, нектин-3, NKG2C, нектин-4, NKG2D, неогенин, NKp30, неприлизин/CD10, NKp44, неприлизин-2/ММЕЛ1/ММЕЛ2, NKp46/NCR1, нестин, NKp80/KLRF1, NETO2, NKX2.5, нетрин-1, NMDA R, NR1 субъединица, нетрин-2, NMDA R, NR2A субъединица, нетрин-4, NMDA R, NR2B субъединица, нетрин-Gla, NMDA R, NR2C субъединица, нетрин-G2a, N-Me-6,7-diOH-TIQ, нейрегулин-1/NRG1, Nodal, нейрегулин-3/NRG3, Noggin, нейритин, рецептор Nogo, NeuroD1, Nogo-A, нейрофасцин, NOMO, нейрогенин-1, Nore, нейрогенин-2, норрин, нейрогенин-3, eNOS, нейролизин, iNOS, нейрофизин II, nNOS, нейропилин-1, Notch-1, нейропилин-2, Notch-2, нейропозитин, Notch-3, нейротримин, Notch-4, нейртурин, NOV/CCN3, NFAM1, NRAGE, NF-H, NrCAM, NFkB1, NRL, NFkB2, NT-3, NF-L, NT-4, NF-M, NTB-A/SLAMF6, NG2/MCSP, NTH1, NGF R/TNFRSF16, нуклеостемин, бета-NGF, Nurr-1/NR4A2, NGFI-B альфа/NR4A1, OAS2, орексин B, OBCAM, OSCAR, OCAM, OSF-2/периостин, OCIL/CLEC2d, онкостатинM/OSM, OCILRP2/CLEC21, OSMR бета, Oct-3/4, остеоактивин/GPNMB, OGG1, остеоадгерин, Olig 1, 2, 3, остеокальцин, Olig1, остеокрин, Olig2, остеооптин, Olig3, остеопротегерин/TNFRSF1 IB, олигодендроцитный маркер 01, Otx2, олигодендроцитный маркер 04, OV-6, OMgp, OX40/TNFRSF4, оптицин, OX40 лиганд/TNFSF4, орексин A, OAS2, орексин B, OBCAM, OSCAR, OCAM, OSF-2/периостин, OCIL/CLEC2d, онкостатинM/OSM, OCILRP2/CLEC2i, OSM R бета, Oct-3/4, остеоактивин/GPNMB, OGG1, остеоадгерин, Olig 1, 2, 3, остеокальцин, Olig1, остеокрин, Olig2, остеооптин, Olig3, остеопротегерин/TNFRSF1 IB, олигодендроцитный маркер 01, Otx2, олигодендроцитный маркер 04, OV-6, OMgp, OX40/TNFRSF4, оптицин, OX40 лиганд/TNFSF4, орексин A, RACK1, Ret, Rad1, REV-ERB альфа/NR1D1, Rad17, REV-ERB бета/NR1D2, Rad51, Rex-1, Rae-1, RGM-A, Rae-1 альфа, RGM-B, Rae-1 бета, RGM-C, Rae-1 дельта, Rheb, Rae-1 эпсилон, рибосомальный белок S6, Rae-1 гамма, RIP1, Raf-1, ROBO1, RAGE, ROBO2, Ra1A/Ra1B, ROBO3, Ra1A, ROBO4, Ra1B, ROR/NR1F1-3 (общий), RANK/TNFRSF1 1A, ROR альфа/NR1F1, CCL5/RANTES, ROR гамма/NR1F3, Rap1A/B, RTK-подобный "сиротский" рецептор 1/ROR1, RAR альфа/NR1B1, RTK-подобный "сиротский" рецептор 2/ROR2, RAR бета/NR1B2, RP105, RAR гамма/NR1B3, RP A2, Ras, RSK (общий), RBP4, RSK1/RSK2, RECK, RSK1, Reg 2/PAP, RSK2, Reg I, RSK3, Reg II, RSK4, Reg III, Р-спондин I, Reg IIIa, Р-спондин 2, Reg IV, Р-спондин 3, релаксин-1, RUNX1/CBFA2, релаксин-2, RUNX2/CBFA1, релаксин-3, RUNX3/CBFA3, RELM альфа, RXR альфа/NR2B1, RELM бета, RXR бета/NR2B2, RELT/TNFRSF19L, RXR гамма/NR2B3, резистин, S100A10, SLITRK5, S100A8, SLPI, S100A9, SMAC/Diablo, S100B, Smad1, S100P, Smad2, SALL1, Smad3, дельта-саркогликан, Smad4, Sca-1/Ly6b, Smad5, SCD-I, Smad7, SCF, Smad8, SCFR/c-kit, SMC1, SCGF, альфа-гладкомышечный актин, SCL/Tall, SMUG1, SCP3/SYCP3, Snail, CXCL12/SDF-1, натриево-кальциевый обменник 1, SDNSF/MCFD2, Soggy-1, альфа-секретаза, Sonic Hedgehog, гамма-секретаза, S или CS1, бета-секретаза, S или CS3, E-селектин, сортилин, L-селектин, SOST, P-селектин, SOX1, семафорин 3A, SOX2, семафорин 3C, SOX3, семафорин 3E, SOX7, семафорин 3F, SOX9, семафорин 6A, SOX10, семафорин 6B, SOX 17, семафорин 6C, SOX21 семафорин 6D, SPARC, семафорин 7 A, SPARC-подобный фактор 1, сепараза, SP-D, серин/треониновой фосфатазы субстрат I, спинезин, серпин A1, F-спондин, серпин A3, SR-AI/MSR, серпин A4/каллистатин, Src, серпин A5/ингибитор белка C, SREC-I/SR-F1, серпин A8/ангиотензиноген, SREC-II, серпин B5, SSEA-I, серпин C1/антитромбин-III, SSEA-3, серпин D1/гепариновый кофактор II, SSEA-4, серпин E1/PAI-1, ST7/LRP12, серпин E2, стабиллин-1, серпин F1, стабиллин-2, серпин F2, станниокальцин 1, серпин G1/C1-ингибитор, станниокальцин 2, серпин I2, STAT1, сывороточный амилоид A1, STAT2, SF-1/NR5A1, STAT3, SGK, STAT4, SHBG, STAT5a/b, SHIP, STAT5a, SHP/NR0B2, STAT5b, SHP-I, STATE, SHP-2, VE-статин, SIGIRR, Stella/Dppa3, Siglec-2/CD22, STRO-I, Siglec-3/CD33, вещество P, Siglec-5, сульфамидаза/SGSH, Siglec-6, сульфатаза-модифицирующий фактор 1/SUMF1, Siglec-7, сульфатаза-модифицирующий фактор 2/SUMF2, Siglec-9, SUMO1, Siglec-10, SUMO2/3/4, Siglec-11, SUMO3, Siglec-F, супероксиддисмутаза, SIGNR1/CD209, супероксиддисмутаза-1/Cu[0099]--Zn SOD, SIGNR4, супероксиддисмутаза-2/Mn-SOD, SIRP бета 1, супероксиддисмутаза-3/EC-SOD, SKI, сурвивин, SLAM/CD150, синапсин I, транспозаза "спящей красавицы", синдекан-1/CD 138, Slit3, синдекан-2, SLITRK1, синдекан-3, SLITRK2, синдекан-4, SLITRK4, TAC1/TNFRSF13B, TMEFF 1/томорегулин-1, TAO2, TMEFF2, TAPP1, TNF-альфа/TNFSF 1A, CCL17/TARC, TNF-бета/TNFSF1B, Tau, TNF R1/TNFRSF1A, TC21/R-Ras2, TNF RII/TNFRSF1B, TCAM-1, TOR, TCCR/WSX-1, TP-I, TC-PTP, TP63/TP73L, TDG, TR, CCL25/TECK, TR альфа/NR1A1, тенасцин C, TR бета 1/NR1A2, тенасцин R, TR2/NR2C1, TER-119, TR4/NR2C2, TERT, TRA-1-85, тестикан 1/SPOCK1, TRADD, тестикан 2/SPOCK2, TRAF-1, тестикан 3/SPOCK3, TRAF-2, TFPI, TRAF-3, TFPI-2, TRAF-4, TGF-альфа, TRAF-6, TGF-бета, TRAIL/TNFSF10, TGF-бета 1, TRAILR1/TNFRSF10A, LAP (TGF-бета 1), TRAIL

R2/TNFRSF10B, латентный TGF-бета 1, TRAIL R3/TNFRSF10C, TGF-бета 1.2, TRAIL R4/TNFRSF10D, TGF-бета 2, TRANCE/TNFSF1 1, TGF-бета 3, Tfr (трансферрин R), TGF-бета 5, апотрансферрин, латентный TGF-бета bp1, холотрансферрин, латентный TGF-бета bp2, траппин-2/элафин, латентный TGF-бета bp4, TREM-1, TGF-бета R1/ALK-5, TREM-2, TGF-бета R11, TREM-3, TGF-бета RIIb, TREML1/TLT-1, TGF-бета RIII, TRF-I, термолизин, TRF-2, тиоредоксин-1, TRH-расщепляющий эктофермент/TRHDE, тиоредоксин-2, TRIMS, тиоредоксин-80, трипептидилпептидаза I, тиоредоксин-подобный фактор 5/TRP14, TrkA, THOP1, TrkB, тромбомодулин/CD141, TrkC, тромбозитин, TROP-2, тромбозитин R, пептид 3 тропонина I, тромбоспондин-1, тропонин T, тромбоспондин-2, TROY/TNFRSF 19, тромбоспондин-4, трипсин 1, тимопоэтин, трипсин 2/PRSS2, тимусный хемокин-1, трипсин 3/PRSS3, Tie-1, триптаза-5/Prss32, Tie-2, триптаза альфа/TPS1, TIM-I/KIM-I/HAVCR, триптаза бета-1/MCPT-7, TIM-2, триптаза бета-2/TPSB2, TIM-3, триптаза эпсилон/BSSP-4, TIM-4, триптаза гамма-1/TPSG1, TIM-5, триптофангидроксилаза, TIM-6, TSC22, TIMP-I, TSG, TIMP-2, TSG-6, TIMP-3, TSK, TIMP-4, TSLP, TL1A/TNFSF15, TSLR, TLR1, TSP50, TLR2, бета-III тубулин, TLR3, TWEAK/TNFSF12, TLR4, TWEAK R/TNFRSF 12, TLR5, Tyk2, TLR6, фосфотиозин, TLR9, тирозингидроксилаза, TLX/NR2E1, тирозинфосфатазный субстрат I, убиквитин, UNC5H3, Ugi, UNC5H4, UGRP1, UNG, ULBP-I, uPA, ULBP-2, uPAR, ULBP-3, URB, UNC5H1, UVDE, UNC5H2, ваннилоид R1, VEGF R, VASA, VEGF R1/Fit-1, вазохибин, VEGF R2/KDR/Flk-1, вазорин, VEGF R3/FU-4, вазостатин, версикан, Vav-1, VG5Q, VCAM-1, VHR, VDR/NR1H1, виментин, VEGF, витронектин, VEGF-B, LDLR, VEGF-C, vWF-A2, VEGF-D, синуклеин-альфа, Ku70, WASP, Wnt-7b, WIF-I, Wnt-8a WISP-1/CCN4, Wnt-8b, WNK1, Wnt-9a, Wnt-1, Wnt-9b, Wnt-3a, Wnt-10a, Wnt-4, Wnt-10b, Wnt-5a, Wnt-11, Wnt-5b, wntNS3, Wnt7a, XCR1, XPE/DDB1, XEDAR, XPE/DDB2, Xg, XPF, XIAP, XPG, XPA, XPV, XPD, XRCC1, Yes, YY1, EphA4.

Особенный интерес представляют различные ионные каналы человека. Неограничивающие примеры включают В субъединицу 5-гидрокситриптаминового 3 рецептора, предшественника 5-гидрокситриптаминового 3 рецептора, субъединицу С 5-гидрокситриптаминового рецептора 3, белок AAD 14, предшественник альфа-субъединицы белка ацетилхолинового рецептора, предшественник бета-субъединицы белка ацетилхолинового рецептора, предшественник дельта-субъединицы белка ацетилхолинового рецептора, предшественник эпсилон-субъединицы белка ацетилхолинового рецептора, сплайс-вариант b чувствительного к кислой среде ионного канала 3, сплайс-вариант с чувствительного к кислой среде ионного канала 3, чувствительный к кислой среде ионный канал 4, АДФ-рибозопирофосфатазу, митохондриальный предшественник, альфа1 А-потенциалзависимый кальциевый канал, амилорид-чувствительный катионный канал 1, нейрональный, амилорид-чувствительный катионный канал 2, нейрональный амилорид-чувствительный катионный канал 4, изоформу 2, амилорид-чувствительный натриевый канал, альфа-субъединицу амилорид-чувствительного натриевого канала, бета-субъединицу амилорид-чувствительного натриевого канала, дельта-субъединицу амилорид-чувствительного натриевого канала, гамма-субъединицу амилорид-чувствительного натриевого канала, аннексин A7, Apical-подобный белок, АТФ-чувствительный калиевый канал входящего выпрямления тока 1, АТФ-чувствительный калиевый канал входящего выпрямления тока 10, АТФ-чувствительный калиевый канал входящего выпрямления тока 11, АТФ-чувствительный калиевый канал входящего выпрямления тока 14, АТФ-чувствительный калиевый канал входящего выпрямления тока 15, АТФ-чувствительный калиевый канал входящего выпрямления тока 8, альфа12.2 субъединицу кальциевого канала, альфа12.2 субъединицу кальциевого канала, альфа1Е субъединицу кальциевого канала, сплайс-вариант дельта19 дельта40 дельта46, альфа субъединицу 1 активируемого кальцием калиевого канала, бета-субъединицу 1 активируемого кальцием калиевого канала, бета-субъединицу 2 активируемого кальцием калиевого канала, бета-субъединицу 3 активируемого кальцием калиевого канала, кальций-зависимый канал переноса ионов хлора-1, катионный канал TRPM4B, CDNA FLJ90453 fis, клон NT2RP3001542, с высокой степенью сходства с доменом тетрамеризации калиевого канала, содержащий белок 6, CDNA FLJ90663 fis, клон PLACE 1005031, с высокой степенью сходства с белком 5 внутриклеточного канала ионов хлора, бета-субъединицу CGMP-зависимого катионного канала, белок канала ионов хлора, белок 2 канала ионов хлора, белок 3 канала ионов хлора, белок 4 канала ионов хлора, белок 5 канала ионов хлора, белок 6 канала ионов хлора, белок канала ионов хлора C1C-Ka, белок канала ионов хлора C1C-Kb, белок канала ионов хлора, белок 6 внутриклеточный канал ионов хлора скелетной мышцы, белок 3 внутриклеточного канала ионов хлора, белок 4 внутриклеточного канала ионов хлора, белок 5 внутриклеточного канала ионов хлора, белок CHRNA3, белок Clcn3e, белок CLCNKB, белок CNGA4, куллин-5, зависимый от циклической GMP калиевый канал, зависимый от циклических нуклеотидов катионный канал 4, зависимый от циклических нуклеотидов катионный канал альфа 3, зависимый от циклических нуклеотидов катионный канал бета 3, зависимый от циклических нуклеотидов канал нейронов рецепторов обоняния, регулятор трансмембранной проводимости, вызывающий муковисцидоз, тяжелая цепь В-245 цитохрома, предшественник альфа-2/дельта субъединицы дигидропиридин-чувствительного калиевого канала L-типа, предшественник FXYP домен-содержащего регулятора транспорта ионов 3, предшественник FXYP домен-содержащего регулятора транспорта ионов 5, предшественник FXYP домен-содержащего регулятора транспорта ионов 6, предшественник FXYP домен-содержащего регулятора транспорта ионов 7, предшественник

FX1D домен-содержащего регулятора транспорта ионов 8, G-белок-активируемый калиевый канал входящего выпрямления тока 1, G-белок-активируемый калиевый канал входящего выпрямления тока 2, G-белок-активируемый калиевый канал входящего выпрямления тока 3, G-белок-активируемый калиевый канал входящего выпрямления тока 4, предшественник субъединицы рецептора гамма-аминомасляной кислоты альфа-1, предшественник субъединицы рецептора гамма-аминомасляной кислоты альфа-2, предшественник субъединицы рецептора гамма-аминомасляной кислоты альфа-3, предшественник субъединицы рецептора гамма-аминомасляной кислоты альфа-4, предшественник субъединицы рецептора гамма-аминомасляной кислоты альфа-5, предшественник субъединицы рецептора гамма-аминомасляной кислоты альфа-6, предшественник субъединицы рецептора гамма-аминомасляной кислоты бета-1, предшественник субъединицы рецептора гамма-аминомасляной кислоты бета-2, предшественник субъединицы рецептора гамма-аминомасляной кислоты бета-3, предшественник дельта-субъединицы рецептора гамма-аминомасляной кислоты, предшественник субъединицы рецептора гамма-аминомасляной кислоты эпсилон, предшественник субъединицы рецептора гамма-аминомасляной кислоты гамма-1, предшественник субъединицы рецептора гамма-аминомасляной кислоты гамма-3, предшественник субъединицы рецептора пи гамма-аминомасляной кислоты, предшественник субъединицы рецептора rho-1 гамма-аминомасляной кислоты, предшественник субъединицы рецептора rho-2 гамма-аминомасляной кислоты, предшественник субъединицы рецептора тета гамма-аминомасляной кислоты, каинатный рецептор GluR6, предшественник глутаматного рецептора 1, предшественник глутаматного рецептора 2, предшественник глутаматного рецептора 3, предшественник глутаматного рецептора 4, глутаматный рецептор 7, глутаматный рецептор В, предшественник субъединицы глутаматного рецептора дельта-1, предшественник ионотропного каинатного глутаматного рецептора 1, предшественник ионотропного каинатного глутаматного рецептора 2, предшественник ионотропного каинатного глутаматного рецептора 3, предшественник ионотропного каинатного глутаматного рецептора 4, предшественник ионотропного каинатного глутаматного рецептора 5, предшественник субъединицы 3А глутаматного [NMDA] рецептора, предшественник субъединицы 3В глутаматного [NMDA] рецептора, предшественник субъединицы эпсилон 1 глутаматного [NMDA] рецептора, предшественник субъединицы эпсилон 2 глутаматного [NMDA] рецептора, предшественник субъединицы эпсилон 4 глутаматного [NMDA] рецептора, предшественник субъединицы дзета 1 глутаматного [NMDA] рецептора, предшественник цепи альфа-1 глицинового рецептора, предшественник цепи альфа-2 глицинового рецептора, предшественник цепи альфа-3 глицинового рецептора, предшественник бета-цепи глицинового рецептора, субъединицу 1 рибонуклеопротеидного комплекса H/ACA, высокоаффинную бета-субъединицу рецептора иммуноглобулина эпсилон, гипотетический белок DKFZp31310334, гипотетический белок DKFZp761M1724, гипотетический белок FLJ12242, гипотетический белок FLJ14389, гипотетический белок FLJ14798, гипотетический белок FLJ14995, гипотетический белок FLJ16180, гипотетический белок FLJ16802, гипотетический белок FLJ32069, гипотетический белок FLJ37401, гипотетический белок FLJ38750, гипотетический белок FLJ40162, гипотетический белок FLJ41415, гипотетический белок FLJ90576, гипотетический белок FLJ90590, гипотетический белок FLJ90622, гипотетический белок KCTD15, гипотетический белок MGC15619, инозитол-1,4,5-трифосфатный рецептор 1-го типа, инозитол-1,4,5-трифосфатный рецептор 2-го типа, инозитол-1,4,5-трифосфатный рецептор 3-го типа, белок 4 активируемого кальцием калиевого канала со средней проводимостью, калиевый канал входящего выпрямления тока 13, калиевый канал входящего выпрямления тока 16, калиевый канал входящего выпрямления тока 4, отрицательный регулятор K(+) канала входящего выпрямления тока Kir2.2v, субъединицу KA2a каинатного рецептора, белок KCNH5, белок KCTD 17, белок KCTD2, ассоциированный с кератиноцитами трансмембранный белок 1, взаимодействующий с Kv каналом белок 4, мелестатин 1, мембранный белок MLC1, белок MGC 15619, муколипин-1, муколипин-2, муколипин-3, ассоциированный с множественной лекарственной устойчивостью белок 4, предшественник субъединицы 2С N-метил-D-аспартатного рецептора, гомолог НАДФН-оксидазы 1, Nav1.5, предшественник субъединицы альфа-10 нейронального белка ацетилхолинового рецептора, предшественник субъединицы альфа-2 нейронального белка ацетилхолинового рецептора, предшественник субъединицы альфа-3 нейронального белка ацетилхолинового рецептора, предшественник субъединицы альфа-4 нейронального белка ацетилхолинового рецептора, предшественник субъединицы альфа-5 нейронального белка ацетилхолинового рецептора, предшественник субъединицы альфа-6 нейронального белка ацетилхолинового рецептора, предшественник субъединицы альфа-7 нейронального белка ацетилхолинового рецептора, предшественник субъединицы альфа-9 нейронального белка ацетилхолинового рецептора, предшественник субъединицы бета-2 нейронального белка ацетилхолинового рецептора, предшественник субъединицы бета-3 нейронального белка ацетилхолинового рецептора, предшественник субъединицы бета-4 нейронального белка ацетилхолинового рецептора, субъединица альфа-2D нейронального потенциалзависимого кальциевого канала, белок 1 пуриnergического рецептора P2X, белок 2 пуриnergического рецептора P2X, белок 3 пуриnergического рецептора P2X, белок 4 пуриnergического рецептора P2X, белок 5 пуриnergического рецептора P2X, белок 6 пуриnergического рецептора P2X, белок 7 пуриnergического рецептора P2X, калиевый канал клеток поджелудочной железы TALK-Ib, калиевый канал клеток поджелудочной железы TALK-Ic, калиевый канал клеток поджелудочной железы TALK-Id, предшественник фосфолеммана, плазмолипин, связанный с поликистозным забо-



VIII типа натриевого канала, альфа-субъединицу белка X типа натриевого канала, альфа-субъединицу белка XI типа натриевого канала, активируемый натрием и хлором АТФ-чувствительный калиевый канал, гамма-цепь натрий/калиевой транспортной АТФазы, катионный канал спермы 1, катионный канал спермы 2, изоформа 4, синтаксин-1В1, член 1 подсемейства А катионного канала транзиентного рецепторного потенциала, член 2 подсемейства М катионного канала транзиентного рецепторного потенциала, член 3 подсемейства М катионного канала транзиентного рецепторного потенциала, член 6 подсемейства М катионного канала транзиентного рецепторного потенциала, член 7 подсемейства М катионного канала транзиентного рецепторного потенциала, член 1 подсемейства V катионного канала транзиентного рецепторного потенциала, член 2 подсемейства V катионного канала транзиентного рецепторного потенциала, член 3 подсемейства V катионного канала транзиентного рецепторного потенциала, член 4 подсемейства V катионного канала транзиентного рецепторного потенциала, член 5 подсемейства V катионного канала транзиентного рецепторного потенциала, член 6 подсемейства V катионного канала транзиентного рецепторного потенциала, эпсилон-сплайс-вариант белка 4 канала транзиентного рецепторного потенциала, гамма-сплайс-вариант белка 7 канала транзиентного рецепторного потенциала, фактор некроза опухоли, альфа-индуцируемый белок 1, эндотелиальный, белок 2 двухпорового кальциевого канала, белок VDAC4, белок Kv3.2b потенциалзависимого калиевого канала, бета1В субъединицу потенциалзависимого натриевого канала, потенциалзависимый анионный канал, белок 2 потенциалзависимого анионного канала, белок 1 потенциалзависимого анион-селективного канала, белок 2 потенциалзависимого анион-селективного канала, белок 3 потенциалзависимого анион-селективного канала, гамма-1 субъединицу потенциалзависимого кальциевого канала, гамма-2 субъединицу потенциалзависимого кальциевого канала, гамма-3 субъединицу потенциалзависимого кальциевого канала, гамма-4 субъединицу потенциалзависимого кальциевого канала, гамма-5 субъединицу потенциалзависимого кальциевого канала, гамма-6 субъединицу потенциалзависимого кальциевого канала, гамма-7 субъединицу потенциалзависимого кальциевого канала, гамма-8 субъединицу потенциалзависимого кальциевого канала, альфа-1С субъединицу потенциалзависимого кальциевого канала L-типа, альфа-1D субъединицу потенциалзависимого кальциевого канала L-типа, альфа-1S субъединицу потенциалзависимого кальциевого канала L-типа, бета-1 субъединицу потенциалзависимого кальциевого канала L-типа, бета-2 субъединицу потенциалзависимого кальциевого канала L-типа, бета-3 субъединицу потенциалзависимого кальциевого канала L-типа, бета-4 субъединицу потенциалзависимого кальциевого канала L-типа, альфа-1В субъединицу потенциалзависимого кальциевого канала N-типа, альфа-1А субъединицу потенциалзависимого кальциевого канала P/Q-типа, альфа-1Е субъединицу потенциалзависимого кальциевого канала R-типа, альфа-1G субъединицу потенциалзависимого кальциевого канала T-типа, альфа-1H субъединицу потенциалзависимого кальциевого канала T-типа, альфа-1I субъединицу потенциалзависимого кальциевого канала L-типа, бета-1 субъединицу потенциалзависимого калиевого канала, бета-2 субъединицу потенциалзависимого калиевого канала, бета-3 субъединицу потенциалзависимого калиевого канала, KCNA7 потенциалзависимого калиевого канала. Также многообещающей целью является семейство Nav1.x человеческих потенциалзависимых натриевых каналов. Это семейство включает, например, каналы Nav1.6 и Nav1.8. В соответствии с конкретными вариантами осуществления терапевтический белок может представлять собой сопряженный с G-белком рецептор (GPCR). Иллюстративные GPCR включают без ограничения родопсин-подобные рецепторы класса А, такие как мускариновый (Muse.) ацетилхолиновый позвоночных 1 типа, Muse, ацетилхолиновый позвоночных 2 типа, Muse, ацетилхолиновый позвоночных 3 типа, Muse, ацетилхолиновый позвоночных 4 типа; адренорецепторы: альфа-адренорецепторы 1 типа, альфа-адренорецепторы 2 типа, бета-адренорецепторы 1 типа, бета-адренорецепторы 2 типа, бета-адренорецепторы 3 типа, допаминовый позвоночных 1 типа, допаминовый позвоночных 2 типа, допаминовый позвоночных 3 типа, допаминовый позвоночных 4 типа, гистаминовый 1 типа, гистаминовый 2 типа, гистаминовый 3 типа, гистаминовый 4 типа, серотониновый 1 типа, серотониновый 2 типа, серотониновый 3 типа, серотониновый 4 типа, серотониновый 5 типа, серотониновый 6 типа, серотониновый 7 типа, серотониновый 8 типа, другие типы серотониновых рецепторов, следового амина, ангиотензиновый 1 типа, ангиотензиновый 2 типа, бомбезиновый, брадикининовый, C5a анафилотоксина, Fmet-leu-phe, APJ-подобный, интерлейкина-8 типа А, интерлейкина-8 типа В, интерлейкина-8 других типов, C--С хемокиновый 1-11 типа и других типов, C--Х--С хемокиновый (2-6 и других типов), C--Х3--С хемокиновый, холецистокининовый ССК, ССК типа А, ССК типа В, ССК других типов, эндотелиновый, меланокортиновый (меланоцит-стимулирующего гормона, адренотропного гормона, гормона меланокортин), антигена Duffy, пролактин-высвобождающего пептида (GPR10), нейропептида Y (1-7 типа), нейропептида Y, нейропептида Y других типов, нейротензина, опиоидные (типа D, К, М, X), соматостатиновые (1-5 типа), тахикининовые (вещества Р (NK1), вещества К (NK2), нейромедина К (NK3), тахикинин-подобного фактора 1, тахикинин-подобного фактора 2, вазопрессин/вазотоциновые (1-2 типа), вазотоциновые, окситоцин/мезотоциновые, конопрессиновый, галанин-подобного фактора, рецептор фактора, подобного протеиназа-активирующему, орексинов и нейропептидов FF.QRFP, подобный хемокиновому рецептору, рецептор нейромедин U-подобного фактора (нейромедина U, PRXamide), белковых гормонов (фолликуло-

стимулирующего гормона, лютропин-хориогонадотропного гормона, тиротропина, гонадотропина I типа, гонадотропина II типа), (род)опсина, родопсина позвоночных (1-5 типа), родопсина позвоночных 5 типа, родопсина членистоногих, родопсина членистоногих 1 типа, родопсина членистоногих 2 типа, родопсина членистоногих 3 типа, родопсина моллюсков, родопсина, обонятельные (семейства II обонятельных рецепторов 1-13 типа), простагландина (простагландина E2 подтипа подтипа EP1, простагландина E2/D2 подтипа EP2, простагландина E2 подтипа EP3, простагландина E2 подтипа EP4, простагландина F2-альфа, простаглицина, тромбксана, аденозина 1-3 типа, пуриnergические рецепторы, пуриnergический рецептор P2RY1-4,6,1 1 GPR91, пуриnergический рецептор P2RY5,8,9,10 GPR35,92,174, пуриnergический рецептор P2RY12-14 GPR87 (УДФ-глюкозы), каннабиноида, тромбоцит-активирующего фактора, гонадотропин-высвобождающего гормона, гонадотропин-высвобождающего гормона I типа, гонадотропин-высвобождающего гормона II типа, фактора, подобного адипокинетическому гормону, коразонина, тиротропин-высвобождающего гормона и секретагога, тиротропин-высвобождающего, гормона роста секретагога, фактора, подобного гормону роста секретагога, запускающего линьку гормона (ETHR), мелатонина, лизофинголипида и LPA (EDG), сфингозин 1-фосфата Edg-1, лизофосфатидиловой кислоты Edg-2, сфингозин 1-фосфата Edg-3, лизофосфатидиловой кислоты Edg-4, сфингозин 1-фосфата Edg-5, сфингозин 1-фосфата Edg-6, лизофосфатидиловой кислоты Edg-7, сфингозин 1-фосфата Edg-8, другой рецептор Edg лейкотриена B4, рецептор BLT1 лейкотриена B4, рецептор BLT2 лейкотриена B4, сиротский рецептор класса/другого типа, предполагаемых нейротрансмиттеров, SREB, протоонкогена Mas и Mas-родственных факторов (MRG), GPR45-подобного, цистеинил-лейкотриена, сопряженного с G-белком рецептор желчных кислот, рецептор свободных кислот (GP40, GP41, GP43), секретиноподобного фактора класса B, кальцитонина, кортикотропин-рилизинг фактора, желудочного ингибиторного пептида, глюкагоана, гормона высвобождающего гормон роста, паратиреоидного гормона, PACAP, секретина, вазоактивного интестинального полипептида, латрофилина, латрофилина 1 типа, латрофилина 2 типа, латрофилина 3 типа, ETL рецепторы, мозгоспецифичного ингибитора ангиогенеза (BAI), Methuselah-подобных белков (MTH), кадгерина EGF LAG (CELSR), сверхбольшой сопряженный с G-белком рецептор, метаботропного глутамата класса C/феромона, метаботропного глутамата группы I-III, фактора, подобной кальций-чувствительному, внеклеточного кальций-чувствительного фактора, феромона, фактора, подобного кальций-чувствительному, другого типа, рецепторы предполагаемых феромонов, GABA-B, GABA-B 1 подтипа, GABA-B 2 подтипа, GABA-B-подобного фактора, сиротского GPCR5, сиротского GPCR6, белков гена bride of sevenless (BOSS), рецепторы вкуса (T1R), грибного феромона класса D, фактора, подобного фактору грибного феромона A (STE2.STE3), фактора, подобного грибному феромону класса B (BAR,BBR,RCB,PRA), цАМФ-рецепторы класса E, белков глазного альбинизма, белков семейства Frizzled/Smoothed, фактора frizzled группы A (Fz 1, и 2, и 4, и 5, и 7-9), фактора frizzled группы B (Fz 3 и 6), фактора frizzled группы C (другие), сошниково-носовые рецепторы, хеморецепторы нематод, рецепторы пахнущих веществ насекомых и опсинов класса Z простейших/бактерий/грибов.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления описанные в настоящем документе связывающие сывороточный альбумин Fn3 гибриды могут включать любой из следующих активных полипептидов: BOTOX, миоблок, нейроблок, диспорт (или другие серотипы ботулинических нейротоксинов), аглюкозидазу-альфа, даптомицин, YH-16, хорионический гонадотропин-альфа, филграстим, цетрореликс, интерлейкин-2, альдеслейкин, тецелейкин, денилейкин-дифтиток, интерферон-альфа-n3 (инъекционный), интерферон-альфа-n1, DL-8234, интерферон, Suntory (гамма-Ia), интерферон-гамма, тимозин-альфа 1, тасонермин, DigiFab, ViperaTAb, EchiTAb, CroFab, несиритид, абатацепт, алефацепт, Ребиф, эптотерминальфа, терипаратид (при остеопорозе), кальцитонин инъекционный (при заболевании костей), кальцитонин (назальный, при остеопорозе), этанерцепт, гемоглобин глутамер 250 (бычий), дротрекогин альфа, коллагеназу, карперитид, рекомбинантный эпидермальный фактор роста человека (местный гель, для заживления ран), DWP-401, дарбэпоэтин альфа, эпоэтин омега, эпоэтин бета, эпоэтин альфа, дезирудин, лепирудин, бивалирудин, нонаког альфа, мононин, эптаког альфа (активированный), рекомбинантный фактор VTII+VWF, рекомбинат, рекомбинантный фактор VTII, фактор VIII (рекомбинантный), альфанат, октоког альфа, фактор VIII, палифермин, индикиназу, тенектеплазу, альтеплазу, памитеплазу, ретеплазу, натеплазу, монтеплазу, фоллитропин альфа, rFSH, hpFSH, микафунгин, пэгфилграстим, ленограстим, нартограстим, сермолин, глюкагон, эксенатид, прамлинтид, имиглуцеразу, галсульфазу, лейкотропин, молграмостим, трипторелина ацетат, гистрелин (подкожный имплант, гидрон), деслорелин, гистрелин, нафарелин, депо лейпролида с замедленным высвобождением (ATRIGEL), имплант с лейпролидом (DUROS), гозерелин, соматотропин, эутропин, KP-102 program, соматотропин, соматотропин, мекасермин (при нарушении роста), энфувиртид, Org-33408, инсулин гларгин, инсулин глулизин, инсулин (ингалируемый), инсулин лиспро, инсулин детемир, инсулин (трансбуккальный, RapidMist), мекасермин ринфабат, анакинра, целмолейкин, 99 mTc-апцитид инъекционный, миелопид, бетасерон, глатирамера ацетат, гепон, сарграмостим, опрелвекин, человеческие лейкоцитарные альфа-интерфероны, билив, инсулин (рекомбинантный), рекомбинантный человеческий инсулин, инсулин аспарт, мекасермин, роферон-A, интерферон-альфа 2, альфаферон, интерферон альфакоп-1, интерферон-альфа, Авонекс - рекомбинантный лютеинизирующий гормон человека, дорназу альфа, трафермин, зиконотид, талтирелин, диботерминальфа, атосибан, бекаптермин, эптифибатид, земайру, CTC-111, шанвак-B, вакцину против HPV (тетра-

валентную), NOV-002, октреотид, ланреотид, анцестим, агалсидазу бета, агалсидазу альфа, ларонидазу, презатид ацетат меди (гель для местного применения), расбуриказу, ранибизумаб, активмун, пегинтрон, трикомин, рекомбинантный инъекционный гипосенсибилизирующий фактор против аллергена клеща домашней пыли, рекомбинантный человеческий паратиреоидный гормон (PTH) 1-84 (подкожный, при остеопорозе), эпоэтин дельта, трансгенный антитромбин III, грандитропин, витразу, рекомбинантный инсулин, интерферон-альфа (пероральную пастилку), GEM-2 IS, вапреотид, идурсульфазу, омапатрилат, рекомбинантный сывороточный альбумин, цертолизумаб пегол, глюкокарпидазу, человеческий рекомбинантный ингибитор эстеразы C1 (при болезни Квинке), ланотеплазу, рекомбинантный человеческий гормон роста, энфувиртид (для безыгольной инъекции, Biojector 2000), VGV-I, интерферон (альфа), люцинактант, авиптадил (ингалируемый, при заболевании легких), икатибант, экаллантид, омиганан, Augograb, пексиганана ацетат, ADI-PEG-20, LDI-200, дегареликс, цинтредекина бесудотокс, FavId, MDX-1379, ISAtx-247, лираглутид, терипаратид (при остеопорозе), тифакогин, AA-4500, липосомный лосьон T4N5, катумаксамаб, DWP-413, ART-123, хризалин, десмотеплазу, амедиплазу, корифоллитропин альфа, TH-9507, тедуглутид, диамид, DWP-412, гормон роста (инъекция с замедленным высвобождением), рекомбинантный G-CSF, инсулин (ингалируемый, AIR), инсулин (ингалируемый, Technosphere), инсулин (ингалируемый, AERx), RGN-303, DiaPep277, интерферон бета (при инфекции вирусом гепатита С (HCV)), интерферон-альфа-n3 (пероральный), белатацепт, трансдермальный пластырь с инсулином, AMG-531, MBP-8298, ксерцепт, опебакан, AIDS VAX, GV-1001, LymphoScan, ранпирназу, липоксилан, лусупултид, MP52 (бета-трикальцийфосфатный носитель, для регенерации кости), вакцина против меланомы, сипулейцел-Т, СТР-37, инседжиа, витеспен, человеческий тромбин (замороженный, при кровотечении в ходе оперативного вмешательства), тромбин, TransMID, алфимепразу, пуриказу, терлипрессин (внутривенный, при гепаторенальном синдроме), EUR-1008M, рекомбинантный FGF-I (инъекционный, при заболевании сосудов), BDM-E, ротигапид, ETC-216, P-113, MBI-594AN, дурамицин (ингалируемый, при муковисцидозе), SCV-07, OPI-45, эндостатин, ангиостатин, АВТ-510, концентрат ингибитора Боумана-Бирка, ХМР-629, аннексин V 99 mTc-Hunic, кахалалид F, СТСЕ-9908, теверликс (с продленным высвобождением), озареликс, ромидепсин, BAY-50-4798, интерлейкин-4, PRX-321, пепскан, ибоктадекин, rh-лактоферрин, TRU-015, IL-21, ATN-161, циленгитид, альбуферон, Biphasix, IRX-2, омега-интерферон, РСК-3145, САР-232, пасиреотид, huN901-DM1, иммунотерапевтическую вакцину против карциномы яичника, SB-249553, Oncovax-CL, OncoVax-P, BLP-25, CerVax-16, вакцину на основе мультиэпитопного пептида против меланомы (MART-I, gp100, тирозиназа), немифитид, гААТ (ингалируемый), гААТ (при дерматологических заболеваниях), CGRP (ингалируемый, при астме), пегсунерцепт, тимозин бета-4, плитидепсин, GTP-200, рамопланин, GRASPA, OBI-I, AC-100, кальцитонин лососевых рыб (пероральный, eligen), кальцитонин (пероральный, при остеопорозе), эксаморелин, капроморелин, Cardeva, велафермин, 1311-ГМ-601, КК-220, TP-10, уларитид, депелестат, гематид, хризалин (для местного применения), rNAPc2, рекомбинантный фактор VIII (пэгилированный липосомальный), bFGF, пэгилированный рекомбинантный вариант стафилокиназы, V-10153, SonoLysis Prolyse, NeuroVax, CZEN-002, терапевтическое средство для неогенеза островковых клеток, rGLP-1, BIM-51077, LY-548806, эксенатид (с контролируемым высвобождением, Medisorb), AVE-0010, GA-GCB, аверолин, AOD-9604, линаклотида ацетат, CETi-I, гемоспан, VAL (инъекционный), быстродействующий инсулин (инъекционный, Viadel), интраназальный инсулин, инсулин (ингалируемый), инсулин (пероральный, eligen), рекомбинантный метиониллептин человека, питракинру (подкожная инъекция, при экземе), питракинру (ингалируемый сухой порошок, при астме), Multikine, RG-1068, MM-093, NBI-6024, AT-001, PI-0824, Org-39141, Cpn1O (при аутоиммунных заболеваниях/воспалении), талактоферрин (для местного применения), гEV-131 (для офтальмологического применения), гEV-131 (при респираторном заболевании), пероральный рекомбинантный человеческий инсулин (при сахарном диабете), RPI-78M, опрелвекин (пероральный), CYT-99007, STLA4-Ig, DTY-001, валатеграст, интерферон-альфа-n3 (для местного применения), IRX-3, RDP-58, тауферон, стимулируемую солями желчных кислот липазу, мериспазу, щелочную фосфатазу, EP-2104R, меланотан-II, бремеланотид, ATL-104, рекомбинантный человеческий микроплазмин, AX-200, SEMAX, ACV-I, Xen-2174, CJC-1008, динорфин А, SI-6603, LAB GHRH, AER-002, BGC-728, вакцину против малярии (виросомы, PeviPRO), ALTU-135, вакцину против парвовируса В 19, вакцину против гриппа (рекомбинантную нейраминидазу), вакцину против малярии/HBV, вакцину против сибирской язвы, Vass-5q, Vass-4x, вакцину против ВИЧ (пероральную), вакцину против HPV, столбнячный токсид, YSPSL, CHS-13340, PTH(1-34) липосомальный крем (Novasome), остаболин-С, аналог PTH (для местного применения, при псориазе), MBRI-93.02, вакцину на основе МТВ72F (против туберкулеза), вакцину на основе MVA-Ag85 А (при туберкулезе), FAR-404, BA-210, вакцину на основе рекомбинантного F1V чумы, AG-702, OxSODro1, rBetV1, Der-p1/Der-p2/Der-p7 целенаправленную против аллергена вакцину (при аллергии, вызванной клещом домашней пыли), пептидный антиген PR1 (при лейкозе), вакцину на основе мутантного gas, вакцину на основе липопептида HPV-16 E7, вакцину против лабиринтина (при аденокарциноме), вакцину против CML, вакцину на основе WT1-пептида (при злокачественной опухоли), IDD-5, CDX-110, Pentrys, норелин, CytoFab, P-9808, VT-111, икрокапид, телбермин (для дерматологического применения, при язве диабетической стопы), рупинтривир, ретикулозу, rGRF, P1A, альфа-галактозидазу А, ACE-011, ALTU-140, CGX-1160, ангиотензиновую терапевтическую вакцину, D-4F, ETC-642, APP-

018, rhMBL, SCV-07 (пероральный, при туберкулезе), DRF-7295, ABT-828, ErbB2-специфический иммунотоксин (против злокачественной опухоли), DT388IL-3, TST-10088, PRO-1762, комботокс, пептиды, связывающиеся с рецептором холецистокинина-В/гастрина, 1 11n-hEGF, AE-37, трастузумаб-DM1, антагонист G, IL-12 (рекомбинантный), PM-02734, IMP-321, rhIGF-1BP3, BLX-883, CUV-1647 (для местного применения), радиоиммунотерапевтические средства на основе L-19 (при злокачественной опухоли), Re-188-P-2045, AMG-386, DC/540/KLN-вакцину (при злокачественной опухоли), VX-001, AVE-9633, AC-9301, NY-ESO-I-вакцину (пептиды), NA17.A2-пептиды, вакцину против меланомы (терапевтическое средство для сенсibilизации антигеном), вакцину против злокачественной опухоли предстательной железы, CBP-501, рекомбинантный человеческий лактоферрин (при синдроме сухого глаза), FX-06, AP-214, WAP-8294A2 (инъекционный), ACP-NIP, SUN-11031, пептид YY [3-36] (при ожирении, интраназальный), FGLL, атацицепт, BR3-Fc, BN-003, BA-058, человеческий паратиреоидный гормон 1-34 (назальный, при остеопорозе), F-18-CCR1, AT-1001 (при глютеиновой болезни/сахарном диабете), JPD-003, PTH(7-34) липосомальный крем (Novasome), дурамицин (для офтальмологического применения, при синдроме сухого глаза), CAB-2, CTCE-0214, гликопегилированный эритропоэтин, EPO-Fc, CNTO-528, AMG-114, JR-013, фактор XIII, аминокандин, PN-951, 716155, SUN-E7001, TH-0318, BAY-73-7977, тевереликс (с немедленным высвобождением), EP-51216, hGH (с контролируемым высвобождением, Biosphere), OGP-I, сифувиртид, TV-4710, ALG-889, Org-41259, rhCCIO, F-991, тимопентин (при заболевании легких), r(m)CRP, избирательный для печени инсулин, субалин, L 19-IL-2 гибридный белок, элафин, NMK-150, ALTU-139, EN-122004, rhTPO, агонист тромбопоэтинового рецептора (при тромбоцитопенических нарушениях), AL-108, AL-208, антагонисты фактора роста нервов (при боли), SLV-317, CGX-1007, INNO-105, пероральный терипаратид (eligen), GEM-OS1, AC-162352, PRX-302, вакцину на основе гибридного белка LFn-p24 (Therapore), EP-1043, вакцину для детей против *S. pneumoniae*, вакцину против малярии, вакцину против *Neisseria meningitidis* группы B, вакцину для новорожденных против стрептококков группы B, вакцину против сибирской язвы, вакцину против HCV (gpE1+gpE2+MF-59), средство терапии против отита среднего уха, вакцину против HCV (коровый антиген+ISCOMATRIX), hPTH(1-34) (для трансдермального применения, ViaDerm), 768974, SYN-101, PGN-0052, авискумин, BIM-23190, вакцину против туберкулеза, мультиэпитопный тирозиназный пептид, вакцину против злокачественной опухоли, энкастим, APC-8024, G1-5005, ACC-001, TTS-CD3, ориентированный на сосуды TNF (солидные опухоли), десмопрессин (для трансбуккального введения с контролируемым высвобождением), онерцепт, TP-9201.

#### Дополнительные модификации.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления связывающие сывороточный альбумин молекулы и гибриды с ними могут дополнительно включать посттрансляционные модификации. Иллюстративные посттрансляционные модификации белка включают фосфорилирование, ацетилирование, метилирование, АДФ-рибозилирование, убиквитинирование, гликозилирование, карбонилирование, сумоилирование, биотинилирование или присоединение полипептидной боковой цепи или гидрофобной группы. В результате, модифицированные связывающие сывороточный альбумин молекулы и гибриды с ними могут содержать неаминокислотные элементы, такие как липиды, поли- или моносахариды и фосфаты. Предпочтительной формой гликозилирования является сиалирование, при котором с полипептидом происходит конъюгирование одной или нескольких фрагментов сиаловой кислоты. Фрагменты сиаловой кислоты улучшают растворимость и период полужизни в сыворотке, при этом также уменьшая возможную иммуногенность белка. См., например, работу Raju et al., *Biochemistry*. 2001 Jul. 31; 40(30):8868-76. Эффекты от таких неаминокислотных элементов на функциональные свойства связывающих сывороточный альбумин молекул или гибридов с ними можно протестировать по их способности связывать конкретный сывороточный альбумин (например, HSA или RhSA) и/или по функциональной роли, придаваемой конкретным отличным от <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 фрагментом, в контексте гибрида.

#### F. Методика гибридизации нуклеиновой кислоты и белка.

В соответствии с одним аспектом в настоящей заявке предложены фибронектиновые каркасные белки, содержащие домен фибронектина III типа, который связывается с HSA. Одним способом быстрого получения и тестирования F<sub>n</sub>3 доменов со свойствами специфического связывания является методика гибридизации нуклеиновой кислоты и белка от Adnexus, Bristol-Myers Squibb Company. Такую методику *in vitro* экспрессии и мечения, называемую PROfusion, которая предусматривает использование гибридов нуклеиновой кислоты и белка (гибридов РНК и ДНК с белком), можно применять для выявления новых полипептидов и аминокислотных мотивов, которые важны для связывания с белками. Методика гибридизации нуклеиновой кислоты и белка представляет собой методику, при помощи которой ковалентно связывают белок с кодирующим его носителем генетической информации. Для подробного описания методики гибридизации РНК и белка и способов скрининга библиотек фибронектиновых каркасных белков см. Szostak et al., патенты США № : 6258558, 6261804, 6214553, 6281344, 6207446, 6518018; публикации PCT № WO 00/34784, WO 01/64942, WO 02/032925; и работу Roberts and Szostak, *Proc Natl. Acad. Sci.* 94: 12297-12302, 1997, которые включены в настоящий документ при помощи ссылки.

#### G. Варианты осуществления векторов и полинуклеотидов.

Также в настоящее раскрытие включены последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие

любой из описанных в настоящем документе белков. Специалисты в настоящей области поймут, что в связи с вырожденностью кодона по третьему основанию почти каждая аминокислота в кодирующей нуклеотидной последовательности может быть представлена несколькими триплетами. Кроме того, изменения в парах минорных оснований могут привести к консервативной замене в кодируемой аминокислотной последовательности, но без предполагаемого практического изменения биологической активности генного продукта. Следовательно, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую описанный в настоящем документе белок, может быть немного модифицирована в последовательности и все еще кодировать свой соответствующий генный продукт. Некоторые иллюстративные нуклеиновые кислоты, кодирующие описанные в настоящем документе связывающие сывороточный альбумин молекулы и гибриды с ними, включают нуклеиновые кислоты с последовательностями, изложенными под SEQ ID NO: 126-151. Также настоящим изобретением охватываются последовательности нуклеиновой кислоты, которые по меньшей мере на 50%, например по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичны SEQ ID NO: 126-151, и предпочтительно кодируют белок, который связывается с сывороточным альбумином, а для нуклеиновых кислот, кодирующих тандемный аднектин PCSK9-PKE2, предпочтительно чтобы они связывались с сывороточным альбумином и PCSK9. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления нуклеотидные замены вводят так, чтобы не изменять получаемую в результате транскрибируемую аминокислотную последовательность.

Нуклеиновые кислоты, кодирующие любой из различных раскрываемых в настоящем документе белков или полипептидов, можно синтезировать химическими способами. Частоту использования кодона можно подобрать так, чтобы повысить экспрессию в клетке. Такая частота использования кодона будет зависеть от выбранного типа клетки. Специализированные паттерны частоты использования кодона были разработаны для *E. coli* и других бактерий, а также для клеток млекопитающих, клеток растений, дрожжевых клеток и клеток насекомых. См., например: Mayfield et al., *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003 100(2):438-42; Sinclair et al. *Protein Expr Purif*. 2002 (1):96-105; Connell ND. *Curr Opin Biotechnol*. 2001 (5):446-9; Makndes et al., *Microbiol. Rev*. 196 60(3):512-38; и Sharp et al., *Yeast*. 1991 7(7):657-78.

Общие методики для манипуляции с нуклеиновыми кислотами известны специалисту в настоящей области, а также описаны, например, в работе Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2 ed., 1989, или F. Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology* (Green Publishing and Wiley-Interscience: New York, 1987) и периодических дополнениях, которые включены в настоящий документ при помощи ссылки. ДНК, кодирующая белок, функционально связана с подходящими транскрипционными или трансляционными элементами, происходящими от генов млекопитающих, вирусов или насекомых. Такие регуляторные элементы включают транскрипционный промотор, необязательную операторную последовательность для контроля транскрипции, последовательность, кодирующую подходящие сайты связывания с рибосомой на мРНК, и последовательности, которые контролируют окончание транскрипции и трансляции. Дополнительно включают способность реплицироваться у хозяина, обычно придаваемую точкой начала репликации, и ген для отбора, облегчающий распознавание трансформантов. Подходящие регуляторные элементы хорошо известны из уровня техники.

Описанные в настоящем документе белки и гибридные белки можно получить в виде гибридного белка с гетерологичным полипептидом, который предпочтительно представляет собой сигнальную последовательность или другой полипептид со специфическим сайтом расщепления на N-конце зрелого белка или полипептида. Выбранная гетерологичная сигнальная последовательность предпочтительно является такой, чтобы она распознавалась и процессировалась (т.е. отщеплялась сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином. Для прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не процессируют нативную сигнальную последовательность, сигнальную последовательность замещают прокариотической сигнальной последовательностью, выбранной, например, из группы, состоящей из лидерных последовательностей щелочной фосфатазы, пенициллиназы, 1 пр или термостабильного энтеротоксина П. Для секреции у дрожжей нативную сигнальную последовательность можно заместить, например, лидерной последовательностью дрожжевой инвертазы, лидерной последовательностью фактора (в том числе лидерными последовательностями альфа-факторов *Saccharomyces* и *Kluveromyces*) или лидерной последовательностью кислой фосфатазы, лидерной последовательностью глюкоамилазы *S. albicans* или сигнальной последовательностью, описанной в публикации PCT № WO 90/13646. При экспрессии в клетках млекопитающих пригодны сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидерные последовательности, например, сигнальная последовательность gD простого герпеса. ДНК для таких участков-предшественников можно лигировать в рамке считывания с ДНК, кодирующей белок.

Векторы экспрессии, применяемые в эукариотических клетках-хозяевах (например, дрожжевых, грибных, насекомых, растений, животных, человека или ядросодержащих клетках других многоклеточных организмов), также будут содержать последовательности, необходимые для окончания транскрип-

ции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно доступны на 5' и, изредка 3', нетранслируемых участках эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти участки содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые в виде полиаденилированных фрагментов в нетранслируемой части мРНК, кодирующей мультвалентное антитело. Одним пригодным компонентом для окончания транскрипции является участок полиаденилирования бычьего гормона роста. См. публикацию РСТ № WO 94/11026 и раскрытый в ней вектор экспрессии.

Рекомбинантная ДНК также может включать последовательность белковой метки любого типа, которая может быть полезна для очистки белка. Примеры белковых меток включают без ограничения гистидиновую метку, метку FLAG, метку тус, метку HA или метку GST. Подходящие для применения с бактериальными, грибными, дрожжевыми клетками-хозяевами и клетками-хозяевами млекопитающих векторы клонирования и экспрессии можно найти в работе Cloning Vectors: A Laboratory Manual, (Elsevier, New York, 1985), соответствующее раскрытие которой, таким образом, включено с помощью ссылки.

Конструкцию экспрессии вводят в клетку-хозяина при помощи способа, подходящего для клетки-хозяина, что будет очевидно специалисту в настоящей области. Из уровня техники известен ряд способов введения нуклеиновых кислот в клетки-хозяева, в том числе без ограничения электропорация; трансфекция с использованием хлорида кальция, хлорида рубидия, фосфата кальция, DEAE-декстрана или других веществ; бомбардировка микрочастицами; липофекция и инфекция (в которой вектором является инфекционный агент).

Подходящие клетки-хозяева включают прокариоты, дрожжевые клетки, клетки млекопитающих или бактериальные клетки. Подходящие бактерии включают грамположительные организмы, например, *E.coli* или *Bacillus spp.* Для получения полипептидов также можно использовать дрожжи, предпочтительно из видов рода *Saccharomyces*, таких как *S. cerevisiae*. Для экспрессии рекомбинантных белков также можно использовать различные системы культуры клеток млекопитающих или насекомых. Бакуловирусные системы для получения гетерологичных белков в клетках насекомых рассмотрены в работе Luckow и Summers, (*Bio/Technology*, 6:47, 1988). В некоторых случаях будет необходимо получение белков в клетках позвоночных, например для гликозилирования, а размножение клеток позвоночных в культуре (тканевой) уже стало стандартной процедурой. Примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих включают эндотелиальные клетки, клетки почек обезьян COS-7, CV-1, L-клетки, C127, 3T3, клетки яичника китайского хомячка (CHO), человеческие эмбриональные клетки почек, линии клеток HeLa, 293, 293T и ВНК. Для многих применений малый размер белковых мультимеров, описанных в настоящем документе, делает *E.coli* предпочтительным способом экспрессии.

Н. Получение белка.

Клетки-хозяева трансформируют описанными в настоящем документе векторами экспрессии или клонирования для получения белка и культивируют в традиционных питательных средах, надлежащим образом модифицированных для индукции промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих необходимые последовательности.

Клетки-хозяева, применяемые для получения фибронектиновых каркасных белков или гибридов с ними, можно культивировать в различных средах. Для культивирования клеток-хозяев подходят коммерчески доступные среды, такие как Ham's F10 (Sigma), минимальная питательная среда ((MEM), (Sigma)), RPMI-1640 (Sigma) и среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко ((DMEM), (Sigma)). Кроме того, любую из описанных в работе Ham et al., *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes et al., *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), патентах США № 4767704, 4657866, 4927762, 4560655 или 5122469; WO 90/03430; WO 87/00195 или патенте США № Re. 30985 сред можно применять в качестве культуральной среды для клеток-хозяев. Любую из таких сред можно при необходимости дополнить гормонами и/или другими факторами роста (такими как инсулин, трансферрин или эпидермальный фактор роста), солями (такими как хлорид натрия, кальций, магний и фосфат), буферами (такими как HEPES), нуклеотидами (такими как аденозин и тимидин), антибиотиками (такими как лекарственное средство GENTAMYCIN™), микроэлементами (определяемыми как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне) и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Также можно включить любые другие необходимые добавки в соответствующих концентрациях, которые будут известны специалистам в настоящей области. Условия культивирования, такие как температура, pH и т. п., являются такими, которые в прошлом уже были использованы с клетками-хозяевами, выбранными для экспрессии, и будут известны рядовому специалисту в настоящей области.

Раскрываемые в настоящем документе фибронектиновые каркасные белки или гибриды с ними также можно получить с помощью бесклеточных систем трансляции. Для этих целей нуклеиновые кислоты, кодирующие фибронектиновый каркасный белок, должны быть модифицированы так, чтобы сделать возможной *in vitro* транскрипцию для получения мРНК и для обеспечения бесклеточной трансляции мРНК в конкретной используемой бесклеточной системе (эукариотической, такой как бесклеточная система трансляции млекопитающих или дрожжей, или прокариотической, такой как бактериальная бесклеточная система трансляции).

Фибронектиновые каркасные белки или гибриды с ними также можно получить с помощью хими-

ческого синтеза (например, с помощью способов, описанных в работе *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2<sup>nd</sup> ed., 1984, The Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Модификации в фибронектиновом каркасном белке также можно получить с помощью химического синтеза.

Раскрываемые в настоящем документе фибронектиновые каркасные белки или гибриды с ними можно очистить с помощью способов выделения/очистки для белков, которые в целом известны в области химии белков. Неограничивающие примеры включают экстракцию, рекристаллизацию, высаливание (например, при помощи сульфата аммония или сульфата натрия), центрифугирование, диализ, ультрафильтрацию, адсорбционную хроматографию, ионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию, нормально-фазовую хроматографию, обращенно-фазовую хроматографию, гель-фильтрацию, эксклюзионную хроматографию, аффинную хроматографию, электрофорез, противоточное распределение или любую комбинацию из них. После очистки фибронектиновые каркасные белки можно подвергнуть обмену в различных буферах и/или сконцентрировать при помощи любого из ряда известных в настоящей области техники способов, в том числе без ограничения фильтрации и диализа.

Очищенный фибронектиновый каркасный белок или гибриды с ним предпочтительно является по меньшей мере на 85% чистым, более предпочтительно по меньшей мере на 95% чистым и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 98% чистым. Независимо от конкретного числового значения степени чистоты фибронектиновый каркасный белок является достаточно чистым для применения в качестве фармацевтического продукта.

#### I. Визуализационные, диагностические и другие области применения.

Предлагаемые в настоящем документе связывающие сывороточный альбумин <sup>10</sup>Fn3 гибриды можно применять для лечения ряда заболеваний и нарушений, исходя из особенности гетерогенной молекулы, гибридной со связывающимся с сывороточным альбумином <sup>10</sup>Fn3 доменом. Области применения для связывающих сывороточный альбумин <sup>10</sup>Fn3 гибридов специалист в настоящей области сможет определить, исходя из сведений, известных из уровня техники, и приведенной в настоящем документе информации. В настоящем документе подробно описаны применения для различных связывающих сывороточный альбумин <sup>10</sup>Fn3 гибридных белков. Связывающие сывороточный альбумин <sup>10</sup>Fn3 гибриды можно вводить любому субъекту-млекопитающему или пациенту-млекопитающему, в том числе в организм человека или другие организмы.

Связывающие сывороточный альбумин молекулы и гибридные молекулы, описанные в настоящем документе, можно пометить детектируемой меткой и применять для вхождения в контакт с клетками, экспрессирующими, например, белок, связанный гибридной молекулой для визуализационных или диагностических областей применения. Можно использовать любой известный в настоящей области техники способ конъюгирования белка с детектируемым фрагментом, включая такие способы, которые описаны в работе Hunter, et al., *Nature* 144:945 (1962); David, et al., *Biochemistry* 13:1014 (1974); Pain, et al., *J. Immunol. Meth.* 40:219 (1981); и в работе Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.* 30:407 (1982).

В соответствии с конкретными вариантами осуществления описанные в настоящем документе связывающие сывороточный альбумин молекулы и гибридные молекулы дополнительно присоединяют к метке, которую можно детектировать (например, меткой может быть радиоактивный изотоп, флуоресцентное соединение, фермент или ферментный кофактор). Меткой может быть радиоактивное средство, такое как: радиоактивные тяжелые металлы, такие как хелаты железа, радиоактивные хелаты гадолиния или марганца, излучатели позитронов кислорода, азота, железа, углерода или галлия, <sup>43</sup>K, <sup>52</sup>Fe, <sup>57</sup>Co, <sup>67</sup>Cu, <sup>67</sup>Ga, <sup>68</sup>Ga, <sup>123</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>132</sup>I или <sup>99</sup>Tc. В соответствии с конкретными вариантами осуществления метка может представлять собой флуоресцентное или хемилюминесцентное соединение, такое как флуоресцинизиотиоцианат, родамин или люциферин; или фермент, такой как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза или пероксидаза хрена. Связывающую сывороточный альбумин молекулу или гибридную молекулу, прикрепленную к такому фрагменту, можно применять в качестве визуализирующего средства и вводить в количестве, эффективном для диагностического применения на млекопитающих, таких как человек, а затем детектирования локализации и накопления визуализирующего средства. Локализацию и накопление визуализирующего средства можно детектировать с помощью радиосцинтиграфии, визуализации ядерного магнитного резонанса, компьютерной томографии или позитронно-эмиссионной томографии. Специалисту в настоящей области техники будет очевидно, что количество подлежащего введению радиоизотопа зависит от конкретного радиоизотопа. Рядовые специалисты в настоящей области смогут легко определить количество подлежащего введению визуализирующего средства, исходя из удельной радиоактивности и энергии заданного радионуклида, используемого в качестве активного фрагмента.

Связывающие сывороточный альбумин молекулы и гибридные молекулы также пригодны в качестве средств для аффинной очистки. В соответствии с таким способом белки иммобилизируют на подходящей подложке, такой как смола или фильтровальная бумага Сефадекс, с помощью способов, которые хорошо известны из уровня техники. Такие белки можно использовать в любом известном аналитическом способе, таком как анализы конкурентного связывания, прямой и непрямой сэндвич-анализы и иммунопреципитационные анализы (Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, p. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)).

Ж. Биофизическая и биохимическая характеристика.

Связывание связывающего сывороточный альбумин аднектина, описанного в настоящем документе, с сывороточным альбумином (например, HSA) можно оценить при помощи констант равновесия (например, диссоциации,  $K_D$ ) и при помощи констант скорости реакции (например, константы скорости ассоциации,  $k_{on}$ , и константы скорости диссоциации,  $k_{off}$ ). Связывающий сывороточный альбумин аднектин (например, PKE2-моно- или тандемный аднектин) обычно будет связываться с целевой молекулой с  $K_D$  менее 500, 100, 10, 1 нМ, 500 пМ, 200 или 100 пМ, хотя могут допускаться более высокие значения  $K_D$ , если  $k_{off}$  является достаточно низкой или  $k_{on}$  является достаточно высокой.

In vitro анализы аффинности связывания.

PKE2-аднектин, который связывается с сывороточным альбумином (например, HSA), можно выявить с помощью различных in vitro анализов. В соответствии с конкретными вариантами осуществления такие анализы являются высокопроизводительными анализами, которые осуществляют одновременный скрининг множества потенциальных аднектинов.

Иллюстративные анализы для определения аффинности связывания аднектина с его целью включают без ограничения жидкофазные способы, такие как анализ кинетического исключения (KinExA) (Blake et al., JBC 1996; 271:27677-85; Drake et al., Anal Biochem 2004; 328:35-43), анализы на основе поверхностного плазменного резонанса (SPR) с применением системы Biacore (Уппсала, Швеция) (Welford et al., Opt. Quant. Elect 1991; 23:1; Morton and Myszk, Methods in Enzymology 1998; 295:268) и гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF) (Newton et al., J Biomol Screen 2008; 13:674-82; Patel et al., Assay Drug Dev Technol 2008; 6:55-68).

В соответствии с конкретными вариантами осуществления биомолекулярные взаимодействия можно отслеживать в реальном времени с помощью системы Biacore, которая использует SPR для обнаружения изменений угла резонанса света на поверхности тонкой золотой пленки на стеклянной подложке вследствие изменений коэффициента преломления у поверхности на величину до 300 нм. Анализ Biacore (например, описанный в примере 2) позволяет получить константы скорости ассоциации, константы скорости диссоциации, равновесные константы диссоциации и константы аффинности. Аффинность связывания получают путем оценки констант скорости ассоциации и диссоциации с помощью системы для оценки поверхностного плазмонного резонанса Biacore (Biacore, Inc.). Биосенсорный чип активируется при ковалентном связывании цели. Затем цели разводят и вводят на чип для получения сигнала в единицах ответа иммобилизованного материала. Поскольку сигнал в единицах ответа (RU) пропорционален массе иммобилизованного материала, он представляет диапазон значений плотности иммобилизованных целей на матрице. Данные по ассоциации и диссоциации совместно согласуют в общем анализе для решения соотношения чистой скорости для биомолекулярного соотношения 1:1 с получением значений наилучшего согласия для  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  и  $R_{max}$  (максимальный ответ при насыщении). Равновесные константы диссоциации для связывания  $K_D$  рассчитывают из результатов измерений SPR в виде  $k_{off}/k_{on}$ .

Следует понимать, что вышеописанные в настоящем документе анализы являются иллюстративными и что можно использовать любой известный из уровня техники способ определения аффинности связывания белков (например, анализ переноса энергии флуоресценции (FRET), твердофазный иммуноферментный анализ и конкурентно-связывающие анализы (например, радиоиммунологические анализы)) для оценки значений аффинности связывания описываемых в настоящем документе PKE2-аднектинов.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления температура плавления ( $T_m$ ) у связывающего сывороточный альбумин аднектина, который описан в настоящем документе, у гибридных белков, которые его содержат, составляет по меньшей мере 50°C, например по меньшей мере 51°C, по меньшей мере 52°C, по меньшей мере 53°C, по меньшей мере 54°C, по меньшей мере 55°C, по меньшей мере 56°C, по меньшей мере 57°C, по меньшей мере 58°C, по меньшей мере 59°C, по меньшей мере 60°C, по меньшей мере 61°C, по меньшей мере 62°C, по меньшей мере 63°C, по меньшей мере 64°C, по меньшей мере 65°C, по меньшей мере 66°C, по меньшей мере 67°C, по меньшей мере 68°C, по меньшей мере 69°C, по меньшей мере 70°C, по меньшей мере 71°C, по меньшей мере 72°C, по меньшей мере 73°C, по меньшей мере 74°C или по меньшей мере 75°C, при измерении с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) или термической сканирующей флуоресцентной спектроскопии (TSF), например, как описано в разделе "Примеры". В соответствии с конкретными вариантами осуществления температура плавления ( $T_m$ ) у связывающего сывороточный альбумин аднектина, который описан в настоящем документе, или у гибридных белков, которые его содержат, составляет 50-75°C, например 51-75, 52-75, 53-75, 54-75, 55-75, 56-75, 57-75, 58-75, 59-75, 60-75, 61-75, 62-75, 63-75, 64-75, 65-75, 66-75, 67-75, 68-75, 69-75, 70-75, 50-74, 50-73, 50-72, 50-71, 50-70, 50-69, 50-68, 50-67, 50-66, 50-65, 50-64, 50-63, 50-62, 50-61, 50-60, 50-59, 50-58, 50-57, 50-56, 50-55, 51-74, 52-73, 53-71, 54-70 или 55-65°C, при измерении с помощью дифференциальной калориметрии (DSC) или термической сканирующей флуоресцентной спектроскопии (TSF), например, как описано в разделе примеры.

К. Терапевтические применения in vivo.

Настоящее изобретение относится к фибронектиновым каркасным белкам, которые пригодны при лечении нарушений. В случае гибридных белков, содержащих связывающий сывороточный альбумин аднектин, поддающиеся лечению заболевания или нарушения будут определяться специфичностью свя-

звания фрагмента, например, второго аднектина, который соединен с аднектином. Как описано в настоящем документе, фибронектиновые каркасные белки могут быть предназначены для связывания любой представляющей интерес цели. В соответствии с одним вариантом осуществления целью является PCSK9. Фибронектиновые каркасные белки, которые связываются с PCSK9, и гибридные белки, которые их содержат, можно применять для лечения атеросклероза, гиперхолестеринемии и других связанных с повышенным уровнем холестерина заболеваний.

В настоящем патенте также представлены способы введения субъекту фибронектиновых каркасных белков. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления субъектом является человек. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления фибронектиновые каркасные белки являются фармацевтически приемлемыми для млекопитающего, в частности человека. "Фармацевтически приемлемая" композиция относится к композиции, которую вводят животному без существенных побочных медицинских последствий. Примеры фармацевтически приемлемых композиций включают композиции, содержащие  $^{10}\text{Fn3}$  домены, у которых отсутствует интегринсвязывающий домен (RGD), и композиции, которые фактически не содержат эндотоксин или пироген или содержат очень низкие уровни эндотоксина или пирогена.

#### L. Составы и введение.

В настоящем патенте предложены способы введения терапевтического фрагмента, гибридного связанного со связывающим сывороточный альбумин  $^{10}\text{Fn3}$  доменом, причем период полужизни терапевтического фрагмента продлен при гибридизации со связывающим сывороточный альбумин  $^{10}\text{Fn3}$  доменом. Методики и дозировки для введения гибридных конструкций будут варьировать в зависимости от типа терапевтического фрагмента, гибридного связанного со связывающим сывороточный альбумин  $^{10}\text{Fn3}$  доменом, и конкретного подвергаемого лечению состояния, но специалист в настоящей области без труда определит их. В целом, контролируемые органы требуют, чтобы белковый реагент, подлежащий применению в качестве терапевтического средства, был смешан в состав так, чтобы он содержал приемлемо низкие уровни пирогенов. Соответственно, терапевтические составы обычно будут отличаться от других составов в том, что они практически не будут содержать пироген или, по меньшей мере, будут содержать не превышающие приемлемые уровни пирогена, которые определены соответствующим контролирующим органом (например, FDA). В соответствии с конкретными вариантами осуществления фармацевтические составы со связывающими сывороточный альбумин  $^{10}\text{Fn3}$  доменами и гибридными с ними молекулами содержат, например, 1-20 мМ янтарной кислоты, 2-10% сорбита и 1-10% глицина с pH 4,0-7,0. В соответствии с иллюстративным вариантом осуществления фармацевтические составы со связывающими сывороточный альбумин  $^{10}\text{Fn3}$  доменами и гибридными с ними молекулами содержат, например, 10 мМ янтарной кислоты, 8% сорбита и 5% глицина с pH 6,0.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления связывающие сывороточный альбумин  $^{10}\text{Fn3}$  домены и гибриды с ними являются фармацевтически приемлемыми для млекопитающего, в частности для человека. "Фармацевтически приемлемый" полипептид относится к полипептиду, который вводят животному без существенных побочных медицинских последствий. Примеры фармацевтически приемлемого связывающего сывороточный альбумин  $^{10}\text{Fn3}$  домена и гибридов с ним включают  $^{10}\text{Fn3}$  домены, которые не содержат интегринсвязывающий домен (RGD), и композиции со связывающими сывороточный альбумин  $^{10}\text{Fn3}$  доменами или гибридами со связывающим сывороточный альбумин  $^{10}\text{Fn3}$  доменом, которые фактически не содержат эндотоксин или имеют очень низкие уровни эндотоксина.

Терапевтические композиции можно вводить с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем или формообразующим в стандартной лекарственной форме. Введение может быть, в качестве неограничивающих примеров, парентеральным (например, внутривенным, подкожным), пероральным или местным применением. Композиция может иметь форму пилюли, таблетки, капсулы, жидкости или таблетки с замедленным высвобождением для перорального введения; жидкости для внутривенного, подкожного или парентерального введения; или геля, лосьона, мази, крема или полимерного или другого типа наполнителя с замедленным высвобождением для местного применения.

Способы получения составов, которые хорошо известны настоящей области техники, можно найти, например, в работе "Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (20<sup>th</sup> ed., ed. A. R. Gennaro A R, 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.). Составы для парентерального введения могут содержать, например, формообразующие, стерильную воду, солевой раствор, полиалкиленгликоли, такие как полиэтиленгликоль, масла растительного происхождения или гидрогенизированные нафталины. Для контроля высвобождения соединения можно применять биосовместимый, биоразлагаемый лактидный полимер, сополимер лактида/гликолида или сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена. Для контроля биораспределения соединения можно применять составы в форме наночастиц (например, биоразлагаемые наночастицы, твердые липидные наночастицы, липосомы). Другие потенциально пригодные системы парентеральной доставки включают частицы на основе сополимера этилена и винилацетата, осмотические насосы, имплантируемые инфузионные системы и липосомы. Концентрация соединения в составе варьирует в зависимости от ряда факторов, в том числе дозировки подлежащего введению лекарственного средства и пути введения.

Полипептид необязательно можно вводить в виде фармацевтически приемлемой соли, такой как не-

токсичные соли присоединения кислоты, или комплексов с металлами, которые традиционно применяют в фармацевтической промышленности. Примеры солей присоединения кислоты включают органические кислоты, такие как уксусная, молочная, палмовая, малеиновая, лимонная, яблочная, аскорбиновая, янтарная, бензойная, пальмитиновая, пробковая, салициловая, виннокислотная, метансульфоновая, толуолсульфоновая или тифторуксусная кислоты или другие; полимерные кислоты, такие как дубильная кислота, карбоксиметилцеллюлоза или другие; и неорганическую кислоту, такую как соляная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, фосфорная кислота или другие. Комплексы с металлами включают цинк, железо и другие. В соответствии с одним примером полипептид смешан в составе в присутствии ацетата натрия для повышения термостабильности.

Составы для перорального применения включают таблетки, содержащие активный ингредиент(ы) в смеси с нетоксичными фармацевтически приемлемыми формообразующими. Такие формообразующие могут представлять собой, например, инертные разбавители или наполнители (например, сахарозу и сорбит), смазывающие вещества, вещества, способствующие скольжению, и противoadгезивные средства (например, стеарат магния, стеарат цинка, стеариновую кислоту, разновидности диоксида кремния, гидрогенизированные растительные масла или тальк).

Составы для перорального применения могут быть представлены в виде жевательных таблеток или в виде твердых желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешан с инертным твердым разбавителем, или в виде мягких желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешан с водой или масляной средой.

Терапевтически эффективная доза относится к дозе, которая производит терапевтические эффекты, с целью которых ее вводят. Точная доза будет зависеть от подлежащего лечению нарушения и может быть установлена специалистом в настоящей области с помощью известных методик. В целом, гибриды со связывающими сывороточный альбумин <sup>10</sup>Fn3 доменами или со связывающим сывороточный альбумин <sup>10</sup>Fn3 доменом вводят в количестве от приблизительно 0,01 мкг/кг до приблизительно 50 мг/кг в день, предпочтительно от 0,01 мг/кг до приблизительно 30 мг/кг в день, наиболее предпочтительно от 0,1 мг/кг до приблизительно 20 мг/кг в день. Полипептид можно давать ежедневно (например, один, два, три раза или четыре раза в день) или реже (например, один раз в два дня, один или два раза в неделю, один раз в две недели или раз в месяц). Кроме того, как известно из уровня техники, могут быть необходимы корректировки на возраст, а также массу тела, общее состояние здоровья, пол, рацион, время введения, взаимодействие с другими лекарственными средствами и тяжесть заболевания, и специалисты в настоящей области смогут установить их с помощью простого эксперимента.

Содержание всех фигур и всех литературных источников, последовательностей из Genbank, патентов и опубликованных заявок на выдачу патентов, которые упомянуты в настоящей заявке, однозначно включено в настоящий документ при помощи ссылки. В частности, раскрытие предварительной заявки на выдачу патента США № 61/968181 (поданной 20 марта 2014 г.) явно включено в настоящий документ при помощи ссылки.

В приведенном выше раскрытии в целом описано настоящее раскрытие, которое дополнительно проиллюстрировано приведенными далее примерами. Данные конкретные примеры описаны лишь с целью иллюстрации и не предназначены для ограничения объема настоящего раскрытия. Несмотря на то, что в настоящем документе были использованы конкретные нормы, термины и значения, такие нормы, термины и значения будут аналогично пониматься как иллюстративные и неограничивающие в отношении объема настоящего раскрытия.

### Примеры

Высокопроизводительное получение белка (НТТР).

Выбранные связывающие молекулы, которые были клонированы в вектор PET9d перед HIS<sub>6</sub>-меткой и трансформированы в клетки BL21 DE3 plysS E.coli, инокулировали в 5 мл среде LB, которая содержала 50 мкг/мл канамицина, в 24-луночном формате и выращивали при 37°C в течение ночи. Получали свежие 5 мл культуры в среде LB (50 мкг/мл канамицина) для индуцируемой экспрессии путем аспирации 200 мкл из полученной за ночь культуры и внесения их в соответствующую лунку. Культуры выращивали при 37°C до достижения A<sub>600</sub> 0,6-0,9. После индукции при помощи 1 mM изопропил-β-тиогалактозида (IPTG) культуре позволяли экспрессироваться в течение 6 ч при 30°C и собирали полученный продукт при помощи центрифугирования в течение 10 мин на 2750 g при 4°C.

Клеточные осадки (в 24-луночном формате) лизировали путем ресуспендирования в 450 мкл лизирующего буфера (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 1× коктейль ингибиторов протеаз без ЭДТА Complete™ (Roche), 1 mM PMSF, 10 mM CHAPS, 40 mM имидазола, 1 мг/мл лизоцима, 30 мкг/мл ДНКазы, 2 мкг/мл апротонина, pH 8,0) и встряхивали при комнатной температуре в течение 1-3 ч. Лизаты осветляли и повторно декантировали в 96-луночном формате путем переноса в 96-луночный Whatman GF/D Unifilter, оснащенный 96-луночным, 1,2 мл планшетом для улавливания, и фильтровали под положительным давлением. Осветленные лизаты переносили в 96-луночный планшет для хелатирования никеля или кобальта, который уравнивали при помощи равновесного буфера (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 M NaCl, 40 mM имидазола, pH 8,0) и инкубировали в течение 5 мин. Несвязавшийся материал удаляли под положитель-

ным давлением. Смолу дважды промывали при помощи 0,3 мл/лунка промывочного буфера № 1 (50 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 М  $\text{NaCl}$ , 5 мМ CHAPS, 40 мМ имидазола, pH 8,0). Каждый смыв удаляли под положительным давлением. Перед элюированием каждую лунку промывали при помощи 50 мкл элюирующего буфера (PBS + 20 мМ EDTA), инкубировали в течение 5 мин и удаляли такой смыв под положительным давлением. Белок элюировали путем внесения дополнительных 100 мкл элюирующего буфера в каждую лунку. Спустя 30 мин инкубации при комнатной температуре планшет(ы) центрифугировали в течение 5 мин на 200 g и элюированный белок собирали в 96-луночные планшеты для улавливания, которые содержали 5 мкл 0,5 М  $\text{MgCl}_2$ , добавленного на дно планшета для улавливания элюата перед элюированием. Элюированный белок количественно оценивали с помощью анализа общего белка с  $^{10}\text{F}_3$  доменом дикого типа в качестве стандарта белка.

Среднемасштабная экспрессия и очистка нерастворимых молекул, связывающих фибронектиновый каркасный белок.

Для экспрессии нерастворимых клонов клон(ы), после которых шла  $\text{His}_6$ -метка, клонировали в вектор pET9d (EMD Bioscience, Сан-Диего, Калифорния) и экспрессировали в клетках HMS174 E.coli. Двадцать мл инокулируемой культуры (полученной от одной высеянной колонии) использовали для инокуляции 1 л среды LB, которая содержала 50 мкг/мл карбенициллина и 34 мкг/мл хлорамфеникола. Культуру выращивали при 37°C до достижения  $A_{600}$  0,6-1,0. После индукции при помощи 1 мМ изопронил- $\beta$ -тиогалактозида (IPTG) культуру выращивали в течение 4 ч при 30°C и полученный продукт собирали при помощи центрифугирования в течение 30 мин на > 10000 g при 4°C. Клеточные осадки замораживали при -80°C. Клеточный осадок ресуспендировали в 25 мл лизирующего буфера (20 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 М  $\text{NaCl}$ , 1× коктейль ингибиторов протеаз без ЭДТА Complete (Roche), 1 мМ PMSF, pH 7,4) с применением гомогенизатора ULTRA-TURRAX® (IKA works) на льду. Клеточный лизис осуществляли при помощи гомогенизации под высоким давлением (>18000 psi) с применением микрофлюидизатора MICROFLUIDIZER® модели M-1 10S (Microfluidics). Нерастворимую фракцию отделяли при помощи центрифугирования в течение 30 мин на 23300 g при 4°C. Нерастворимый осадок, полученный в результате центрифугирования лизата, промывали посредством 20 мМ фосфата натрия/500 мМ  $\text{NaCl}$ , pH 7,4. Осадок повторно растворяли в 6,0 М гуанидина гидрохлориде в 20 мМ фосфате натрия/500 мМ  $\text{NaCl}$ , pH 7,4 путем обработки ультразвуком с последующим инкубированием при 37 градусах в течение 1-2 ч. Повторно растворенный осадок фильтровали до 0,45 мкм и загружали на колонку со смолой для очистки по гистидиновой метке, уравновешенной при помощи буфера 20 мМ фосфата натрия/500 мМ  $\text{NaCl}$ /6,0 М гуанидина, pH 7,4. После загрузки колонку промывали дополнительными 25 объемами колонки того же буфера. Связавшийся белок элюировали при помощи 50 мМ имидазола в 20 мМ фосфате натрия/500 мМ  $\text{NaCl}$ /6,0 М гуанидин- $\text{HCl}$ , pH 7,4. Очищенный белок подвергали рефолдингу путем диализа против 50 мМ ацетата натрия/150 мМ  $\text{NaCl}$ , pH 4,5.

Среднемасштабная экспрессия и очистка растворимых молекул, связывающих фибронектиновый каркасный белок.

Для экспрессии растворимых клонов клон(ы), после которых шла  $\text{His}_6$ -метка, клонировали в вектор pET9d (EMD Bioscience, Сан-Диего, Калифорния) и экспрессировали в клетках HMS174 E.coli. Двадцать мл инокулируемой культуры (полученной от одной высеянной колонии) использовали для инокуляции 1 л среды LB, которая содержала 50 мкг/мл карбенициллина и 34 мкг/мл хлорамфеникола. Культуру выращивали при 37°C до достижения  $A_{600}$  0,6-1,0. После индукции при помощи 1 мМ изопронил- $\beta$ -тиогалактозида (IPTG) культуру выращивали в течение 4 ч при 30°C и полученный продукт собирали при помощи центрифугирования в течение 30 мин на > 10000 g при 4°C. Клеточные осадки замораживали при -80°C. Клеточный осадок ресуспендировали в 25 мл лизирующего буфера (20 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,5 М  $\text{NaCl}$ , 1× коктейль ингибиторов протеаз без ЭДТА Complete (Roche), 1 мМ PMSF, pH 7,4) с применением гомогенизатора ULTRA-TURRAX® (IKA works) на льду. Клеточный лизис осуществляли при помощи гомогенизации под высоким давлением (>18000 psi) с применением микрофлюидизатора MICROFLUIDIZER® модели M-1 10S (Microfluidics). Растворимую фракцию отделяли при помощи центрифугирования в течение 30 мин на 23300 g при 4°C. Надосадочную жидкость осветляли при помощи 0,45-мкм фильтра. Осветленный лизат загружали на колонку со смолой для очистки по гистидиновой метке (GE), предварительно уравновешенную посредством 20 мМ фосфата натрия/500 мМ  $\text{NaCl}$ , pH 7,4. Затем колонку промывали 25 объемами колонки того же буфера с последующим промыванием 20 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия/500 мМ  $\text{NaCl}$ /25 мМ имидазола, pH 7,4, а затем 35 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия/500 мМ  $\text{NaCl}$ /40 мМ имидазола, pH 7,4. Белок элюировали 15 объемами колонки 20 мМ фосфата натрия/500 мМ  $\text{NaCl}$ /500 мМ имидазола, pH 7,4, фракции объединяли по их поглощению на  $A_{250}$  и диализировали против 1× PBS, 50 мМ Tris, 150 мМ  $\text{NaCl}$ ; pH 8,5, или 50 мМ  $\text{NaOAc}$ ; 150 мМ  $\text{NaCl}$ ; pH 4,5. Какой-либо осадок удаляли посредством фильтрации на 0,22-мкм фильтре.

Пример 1. Скрининг исходных связывающих молекул, которые связывают сывороточный альбумин за счет петли "южного полюса" (петли CD).

Для усовершенствования связывающих сывороточный альбумин за счет петли "северного полюса" аднектинов (SABA) первого поколения, которые не связывались с сывороточным альбумином мыши и

крысы, не обладали высокой аффинностью к сывороточным альбуминам различных видов и не всегда были совместимы в мультивалентной платформе на основе  $^{10}\text{Fn3}$ , отбирали при помощи скрининга связывающие сывороточный альбумин за счет петли "южного полюса" аднектины (аднектины PKE2) второго поколения с модифицированными последовательностями петли CD с помощью мРНК-дисплея, как описано ниже.

Библиотеки полипептидов связывающих молекул на основе петли CD, содержащих модифицированный  $^{10}\text{Fn3}$  домен, подвергали скринингу с помощью мРНК-дисплея (Xu et al., Chem Biol 2002;9:933-42) по способности связываться с сывороточным альбумином человека (HSA). Конструировали связывающие молекулы с петлей CD с различными длинами петли CD до +7 аминокислот, а остальную последовательность  $^{10}\text{Fn3}$  оставляли дикого типа. Связывание с целью отслеживали при помощи qPCR и, если наблюдали сигнал специфического связывания, популяции клонировали и экспрессировали в E.coli.

Пример 2. Выявление связывающих молекул с петлей CD, способных связывать HSA и вступать в перекрестную реакцию с Rh-SA и MSA.

Формат ИФА с непосредственным связыванием использовали для выявления связывающих молекул с петлей CD, которые были получены в примере 1 и которые связывали HSA и вступали в перекрестную реакцию с сывороточным альбумином макака-резус (Rh-SA) и/или с сывороточным альбумином мыши (MSA). На планшеты для ИФА MaxiSorp™ наносили покрытие посредством 10 мкг/мл либо HSA, либо Rh-SA, либо MSA и очищенные связывающие молекулы с петлей CD тестировали в количестве 1 мкМ. Связавшиеся аднектины детектировали с помощью конъюгированных с HRP mAb к гистидину (R&D Systems) и реагентами для детекции на основе TMB (BD Biosciences). Результаты ИФА подтверждали с помощью системы Biacore, как описано ниже. Затем связывающие молекулы с петлей CD, выявленные в эксперименте ИФА как вступающие в перекрестную реакцию с Rh-SA и/или MSA (>2X фон), анализировали с помощью SEC в отношении агрегации для демонстрации того, что связывание обусловлено мономерной частицей, что и предполагали для стабильного белка с правильной укладкой. Стабильность белка подтверждали с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC), как описано ниже.

Один из выявленных клонов, называемый в настоящем документе 2270\_C01, имел следующую аминокислотную последовательность:

```
MASTSGVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGWQVQMYSDWGPLYIYKEF
TVPGSKSTATISGLKPGVDYTTVYAVTSGSGESPASSKPISINYRTEGDKPSQHNNNNN
```

(2270\_C01; SEQ ID NO: 23)

Петля CD подчеркнута. Петли AB, BC, DE, EF и FG имели последовательности, идентичные человеческому  $^{10}\text{Fn3}$  домену дикого типа (SEQ ID NO: 1). Проводили анализы на основе эксклюзионной хроматографии и DSC на полученном среднемасштабным способом 2270\_C01 для подтверждения мономерности и определения термостабильности.

Проводили стандартную эксклюзионную хроматографию (SEC) на 2270\_C01, полученном в результате среднемасштабного процесса. SEC полученного с помощью среднемасштабного способа материала проводили с применением Superdex 200 10/30 или на колонке Superdex 75 10/30 (GE Healthcare) на ВЭЖХ-системе Agilent 1100 или 1200 с УФ-детекцией на  $A_{214}$  нм и  $A_{280}$  нм и с флуоресцентной детекцией (возбуждение = 280 нм, испускание = 350 нм). Использовали буфер из 100 мМ сульфата натрия, 100 мМ фосфата натрия, 150 мМ хлорида натрия, pH 6,8, с соответствующей скоростью потока в колонке для SEC. Для калибровки по молекулярной массе использовали гельфильтрационные стандарты (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния). Как показано в табл. 2, 2270\_C01 был преимущественно мономерным (98% мономера).

Проводили анализы на основе дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) полученных с помощью среднемасштабного способа аднектинов для определения их соответствующих  $T_m$ . Сканировали 0,5 мг/мл раствор в дифференциальном сканирующем калориметре с VP-капиллярной ячейкой (GE Microcal) путем линейного изменения температуры от 15°C до 110°C со скоростью 1 градус в минуту под давлением 70 psi. Данные анализировали относительно контрольного прогона соответствующего буфера с помощью метода наилучшего приближения с применением программного обеспечения Origin (OriginLab Corp). Как показано в табл. 2, 2270\_C01 имел  $T_m$ , равную 64°C.

Для определения кинетики связывания с сывороточным альбумином человека, макака-резус и мыши, а также того, сохранялось ли связывание как при физиологическом, так и при эндосомальном pH, соответствующие сывороточные альбумины иммобилизовали на чипе Biacore CM5 с плотностью распределения по поверхности ~1200 RU с помощью стандартного NHS/EDC связывания. Для иммобилизации альбуминов применяли диапазон концентраций (0,25 нМ-5 мкМ) 2270\_C01 в HBS-P+ (0,01 MHEPES pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,05 об.% поверхностно-активного вещества P-20) или ацетатном (0,02 мМ ацетата натрия, pH 5,5, 0,15 M NaCl, 0,05 об.% поверхностно-активного вещества P-20) подвижных буферах. Кинетические измерения проводили с помощью фазы 3-минуты ассоциации и 6-10 мин диссоциации. Кинетические кривые сенсограмм с вычтенными эталонными значениями приводили в соответствие с 1:1 моделью связывания с помощью программного обеспечения Biaevaluation. Как показано в табл. 1, 2270\_C01

связывался с эквивалентной аффинностью при нейтральном и низком pH с альбумином каждого вида, однако аффинность к альбумину мыши была примерно в 10 раз слабее, чем аффинность связывания к альбумину человека или макака-резус.

Таблица 1

2270\_C01 связывается с MuSA с немного более высокими скоростями ассоциации и значимо более высокими скоростями диссоциации по сравнению с HuSA и RhSA как при pH 7,4, так и при pH 5,5

Связывание					
Буфер	c	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (нМ)	Rmax (RU)
HBS-P, pH 7,4	HuSA	6,59E+04	3,68E-04	5,58	121,6
	RhSA	8,27E+04	5,77E-04	6,98	103,3
	MuSA	1,34E+05	9,09E-03	67,67	77,64
Ацетат, pH 5,5	HuSA	1,02E+05	8,98E-04	8,82	111,9
	RhSA	5,96E+04	1,05E-03	17,55	85,5
	MuSA	7,59E+04	1,46E-02	~192,4	57,91

Для усовершенствования свойств 2270\_C01, а именно прогнозируемой *in silico* иммуногенности, последовательность 2270\_C01 подвергали оптимизации с помощью мРНК-дисплея. Полученные в результате такой оптимизации аднектины в настоящем документе называются аднектины PKE2.

Пример 3. Создание производных аднектинов 2270\_C01 с дополнительно модифицированной петлей CD; аднектинов PKE2.

Последовательность 2270\_C01 подвергали оптимизации с помощью мРНК-дисплея с использованием специально разработанных библиотек для уменьшения потенциала иммуногенности и подвергали скринингу в отношении связывания как с человеческими, так и с сывороточными альбуминами мыши в процессе мРНК-дисплея с целью получения производных молекул с более низкой иммуногенностью, которые сохраняли межвидовое связывание альбумина. Полученные в результате последовательности оценивали в отношении *in silico* прогнозируемой иммуногенности, и лишь клоны, которые имели *in silico* показатель иммуногенности ниже предварительно определенного предела отсечения, использовали в последующей стадии получения белка с помощью методики НТРР. Полученные в результате аднектины очищали с помощью НТРР и подвергали скринингу с помощью ИФА с непосредственным связыванием и SEC-HPLC, как описано выше.

Из 308 аднектинов PKE2, полученных при скрининге производной 2270\_C01 и подвергнутых тестированию, приведенные далее 25 молекул имели наилучшие характеристики в отношении *in silico* прогнозируемой иммуногенности, мономерности, по результатам определения с помощью SEC, и связывания с сывороточным альбумином от различных видов, по результатам определения с помощью ИФА с непосредственным связыванием. Определение аффинности наилучших кандидатов анализировали с помощью SPR, как описано выше.

SEQ ID	Аднектины PKE2	Последовательность (с подчеркнутой петлей CD)
24	2629_Λ09	MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GRHVQIYSDLG</u> PLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTIVYAVTGSGESPASSKIPISINY RTEIDKPSQNNNNHH

25	2629_A11	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GRHVHIYSDWG</u> <u>PMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISIN</u> RTEIDKPSQHFFFFFFF
26	2629_C10	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQKYSVLG</u> <u>PLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISIN</u> RTEIDKPSQHFFFFFFF
27	2629_D09	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQMYSDL</u> <u>GPLYVYSEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISIN</u> YRTEIDKPSQHFFFFFFF
28	2629_E05	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQKFSDW</u> <u>GPLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISIN</u> YRTEIDKPSQHFFFFFFF
29	2629_E06	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQKYSDLG</u> <u>PLYIYQEFVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISIN</u> RTEIDKPSQHFFFFFFF
30	2629_F04	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVHQYSDW</u> <u>GPMYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISIN</u> YRTEIDKPSQHFFFFFFF
31	2629_H01	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVXYRITY <u>GREVHKNSDW</u> <u>GTLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVXAVTGSGEXPASSKPISIN</u> YRTEIDKXSQHFFFFFFF
32	2629_H06	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQKYSDLG</u> <u>PLYIYAEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISIN</u> RTEIDKPSQHFFFFFFF
33	2629_H07	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVHLYSDW</u> <u>GPMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISIN</u> YRTEIDKPSQHFFFFFFF
34	2630_A02	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GRHVQMYSDL</u> <u>GPLYIFSEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISIN</u> RTEIDKPSQHFFFFFFF
35	2630_A11	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVHMYSDF</u> <u>GPMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASSKPISIN</u> YRTEIDKPSQHFFFFFFF

36	2630_D02	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQKYS</u> DW <u>GPLYIYNE</u> FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGS <span style="text-decoration: underline;">G</span> ESPASSKPISIN YRTEIDKPSQHNNNNNN
37	2630_D10	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQMY</u> SDL <u>GPLYIYNE</u> FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGS <span style="text-decoration: underline;">G</span> ESPASSKPISIN YRTEIDKPSQHNNNNNN
38	2630_F04	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQMY</u> SDL <u>GPLYIYTE</u> FTVPGSKSTATISGLKPGVGYTITVYAVTGS <span style="text-decoration: underline;">G</span> ESPASSKPISIN YRTEIDKPSQHNNNNNN
39	2630_G03	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GRHVQIY</u> SDLG <u>PLYIYNE</u> FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGS <span style="text-decoration: underline;">G</span> ESPASSKPISIN RTEIDKPSQHNNNNNN
40	2630_G10	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQIY</u> SDWG <u>PLYIYNE</u> FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGS <span style="text-decoration: underline;">G</span> ESPASSKPISIN RTEIDKPSQHNNNNNN
41	2630_H03	MGVSDVPRDLEVVAATXTSLISWDAPAVTVXYRITY <u>GREVQKYS</u> DW <u>GPLYIQE</u> FTVPGSXSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGS <span style="text-decoration: underline;">G</span> ESPASSKPISIN YRTEIDKXSQHNNNNNN
42	2631_B04	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDVPAVTVRYRITY <u>GRHVHLY</u> SEFG <u>PMYIYNE</u> FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGS <span style="text-decoration: underline;">G</span> ESPASSKPISIN RTEIDKPSQHNNNNNN
43	2631_E03	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GRDVHMY</u> SDW <u>GPMYIQE</u> FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGS <span style="text-decoration: underline;">G</span> ESPASSKPISIN YRTEIDKPSQHNNNNNN
44	2631_G01	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GRHVQIY</u> SDWG <u>PLYIYNE</u> FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGS <span style="text-decoration: underline;">G</span> ESPASSKPISIN RTEIDKPSQHNNNNNN
45	2631_G03	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GRYVQLY</u> SDW <u>GPMYIYTE</u> FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGS <span style="text-decoration: underline;">G</span> ESPASSKPISIN YRTEIDKPSQHNNNNNN
46	2631_H09	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GROVQVF</u> SDLG <u>PLYIYNE</u> FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGS <span style="text-decoration: underline;">G</span> ESPASSKPISIN RTEIDKPSQHNNNNNN
47	2632_G01	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GRQVQIY</u> SDWG <u>PLYIYNE</u> FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGS <span style="text-decoration: underline;">G</span> ESPASSKPISIN RTEIDKPSQHNNNNNN
48	4079_A04	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GROVQMY</u> SDW <u>GPLYIYAE</u> FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGS <span style="text-decoration: underline;">G</span> ESPASSKPISIN YRTEIDKPSQHNNNNNN

Пример 4. Биофизические свойства аднектинов PKE2.

Эксклюзионную хроматографию (SEC) проводили, как описано выше, на двух аднектинах PKE2, 2629\_E06 и 2630\_D02, выявленных при скрининге как такие, которые имели наилучшие свойства в примере 3. Как показано в табл. 2, обе молекулы PKE2 были преимущественно мономерными.

Проводили анализы на основе дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) двух аднектинов PKE2 для определения их соответствующих  $T_m$ , как описано выше. Как показано в табл. 2, 2629\_E06 и 2630\_D02 имели  $T_m$  соответственно 56°C и 57°C.

Таблица 2

Аднектин PKE2	Связывающая петля	SEC (% мономера)	$T_m$ (°C)
2270_C01	CD	98%	64
2629_E06	CD	>95%	56
2630_D02	CD	>95%	57

Пример 5. Характеристика связывания аднектинов PKE2 с сывороточным альбумином от различных видов.

Кинетику связывания сывороточных альбуминов с помощью 2629\_E06 и 2630\_D02, а также кин-

тику связывания связывающего сывороточный альбумин за счет петли "северного полюса" аднектина первого поколения, 1318\_H04, определяли, как описано выше. Кроме того, осуществляли связывание с альбумином в различных условиях pH в диапазоне от pH 5,5 до pH 7,4. Ни у 2629\_E06, ни у 2630\_D02 не наблюдали зависимость от pH связывания с сывороточным альбумином человека, макака-резус или мыши, что свидетельствовало о том, что они могли сохранять связывание в эндосоме. Как показано в табл. 3, 1318\_H04 имел более низкую аффинность к сывороточному альбумину человека, яванского макака и макака-резус, относительно 2629\_E06 и 2630\_D02, и, кроме того, не связывался с сывороточным альбумином мыши или крысы. Более того, 1318\_H04 характеризовался в 10 раз более слабой аффинностью к сывороточному альбумину макака-резус, по сравнению с сывороточным альбумином человека, в то время как значения аффинности аднектинов PKE2 к альбуминам от различных видов были относительно эквивалентными.

У обоих аднектинов PKE2, 2629\_E06 и 2630\_D02, наблюдали существенно более высокую аффинность ко всем протестированным сывороточным альбуминам, относительно 1318\_H04, как обсуждалось выше, со значениями  $K_D$  для сывороточного альбумина человека, яванского макака, макака-резус и мыши в нижнем наномольном диапазоне. 2629\_E06 также характеризовался  $K_D$  для сывороточного альбумина крысы в нижнем наномольном диапазоне, а 2630\_D02 характеризовался  $K_D$  для сывороточного альбумина крысы, равной 200 нМ.

Таблица 3

Аднектин	Лиганд	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (нМ)	Rmax (RU)
SABA 1318_H04 за счет петли «северного полюса»	HSA (n=4)	1,10E+04	1,58E-03	156 ± 72	87,0
	cytoSA(n=3)	7,15E+03	2,53E-02	4170 ± 2530*	76,2
	RhSA(n=3)	7,04E+03	2,64E-02	4220 ± 2110*	84,0
	MSA			нет значимого связывания	
	RatSA			нет значимого связывания	
Аднектин PKE2 2629_E06	HSA (n=5)	6,10E+04	1,85E-04	3,2 ± 1,6	112,7
	cytoSA (n=3)	7,37E+04	2,29E-04	3,2 ± 1,5	106,8
	RhSA (n=3)	7,39E+04	2,40E-04	3,4 ± 1,8	99,4
	MSA (n=2)	2,19E+05	5,31E-04	2,4 ± 0,4	105,4
	RatSA (n=2)	9,97E+04	1,26E-03	12,8 ± 2,2	89,5
Аднектин PKE2 2630_D02	HSA (n=4)	1,67E+05	1,62E-04	1,0 ± 0,4	123,2
	cytoSA (n=3)	2,08E+05	3,35E-04	1,6 ± 0,7	113,1
	RhSA (n=3)	2,07E+05	3,62E-04	1,8 ± 0,8	107,4
	MSA	6,78E+05	9,20E-03	13,6	99,2
	RatSA	1,50E+05	2,99E-02	200	89,3

Пример 6. Конкуренция аднектинов PKE2 с hFcRn за связывание с HSA.

Принимая во внимание тот факт, что ингибирование связывания HSA с рецептором hFcRn будет предотвращать рециркуляцию HSA с участием hFcRn и уменьшать длинный период полужизни HSA, таким образом потенциально снижая степень улучшения фармакокинетики, тестировали уровень конкуренции с hFcRn за связывание с HSA для аднектинов PKE2 с помощью конкурентного анализа Alphascreen, который изображен на фиг. 1. Аднектины серийно разводили в буфере для подготовки пробы (50 мМ ацетата /150 мМ NaCl/0,1% Tween-20, pH 5,5 + 0,005% пеногасителя-204) до получения необходимого конечного диапазона концентраций для анализа. Мастер-микс белков и гранул для анализа Alphascreen готовили в буфере для подготовки пробы с получением конечных концентраций для анализа 6,5 нМ hFcRn-GST (BMS), 30 нМ биотинилированного сывороточного альбумина человека (Abscam) и 5 мкг/мл как донорных гранул со стрептавидином для анализа Alphascreen, так и акцепторных гранул с глутатионом для анализа AlphaLISA (Perkin Elmer). 10 мкл/лунока серийно разведенного аднектина, с последующими 10 мкл/лунока раствора белки + гранулы добавляли в 384-луночный аналитический планшет с малым объемом лунок (Greiner Bio-one). Гранулы для анализа Alphascreen и все вносимые в аналитический планшет вещества защищали от внешнего освещения. Аналитический планшет герметично закрывали клейкой пленкой из фольги и инкубировали в течение 2-2,5 часа со встряхиванием при комнатной температуре. Планшет считывали в ридере Synergy 4 (Biotek) с возбуждением на 570 нм и испусканием на 680 нм. Средний сигнал от контрольных лунок без аднектина устанавливали как 0% ингибирования и рассчитывали процент ингибирования взаимодействия FcRn-HSA относительно такого сигнала; из всех частных значений данных вычитали средний фоновый сигнал от контрольных лунок без биотинилированного HSA.

В табл. 4 и фиг. 2 показаны результаты скрининга. В частности, 1318\_H04 сильнее конкурировал с hFcRn за связывание с HSA, чем исходный аднектин второго поколения 2270\_C01 и аднектины PKE2 2629\_E06 и 2630\_D02, что свидетельствовало о том, что аднектины PKE2 могут обеспечивать большее улучшение PK по сравнению с 1318\_H04.

Помимо этого, с помощью SPR определяли домены на HSA, связываемые 1318\_H04, 2629\_E06 и

2630\_D02. Как показано в табл. 4, аднектин 1318\_H04 связывался с доменом I HSA, а 2270\_C01, 2629\_E06 и 2630\_D02 связывались с доменом I-II HSA, но не отдельным доменом I, что свидетельствовало о том, что аднектины 1318\_H04 и PKE2 связывались с различными эпитопами на HSA. Ни один из показанных в табл. 4 аднектинов не связывался с доменом III HSA, домен которого является важным участком взаимодействия HSA с FcRn.

Таблица 4

Аднектин	IC50 конкурентного связывания hFcRn:HSA (нМ)	Домен связывания HuSA по результатам SPR
1318_H04	8,0	I
2270_C01	37,0	I-II
2629_E06	*	I-II
2630_D02	28,7	I-II
HuSA	2941	
HuSA, домен III	>10 мкМ	

\* Дозозависимый эффект не насыщался до 2 мкМ, хотя процент ингибирования (т.е. ингибирование связывания hFcRn с HSA) составлял приблизительно 80%.

Пример 7. In vivo период полужизни потенциальных аднектинов PKE2.

Аднектины PKE2 2629\_E06 и 2630\_D02 получали, очищали и удаляли эндотоксин. Мышам дикого типа (n=3/группа) вводили инъекцией либо 2629\_E06, либо 2630\_D02 в количестве 1 мг/кг в хвостовую вену и определяли концентрацию в образцах крови, взятых через интервалы после инъекции, с помощью количественного ИФА-анализа, который был разработан для детекции аднектина в образцах плазмы крови. В частности, уровни аднектинового лекарственного средства измеряли в плазме крови мыши с помощью платформы на основе технологии Mesoscale или стандартных колориметрических методов ИФА. 2629\_E06 и 2630\_D02 захватывали с помощью mAb к His (BMS) и детектировали с помощью антисыворотки кролика к аднектиновому каркасу в комбинации с конъюгированным с HRP pAb козы к антителам кролика. Альтернативно, их детектировали с помощью видоспецифичного альбумина, связывающегося с аднектином, и видоспецифичного вторичного антитела к альбумину с сульфо-меткой. Фармакокинетические параметры каждого аднектина определяли с помощью построения некомпартментной модели с применением программного обеспечения Phoenix WinNonlin.

Сравнивали фармакокинетические профили 2629\_E06 и 2630\_D02 как показано на фиг. 3 и в табл. 5. Период полужизни 2629\_E06 в плазме крови мыши составлял 33-41 ч, в то время как период полужизни 2630\_D02 составлял 35-39 ч.

Таблица 5

Аднектин	T1/2 (ч)	Cl_obs (мл/ч/кг)	Vz_obs (мл/кг)	AUCall (ч*нмоль/л)	MRTINF_pred (ч)
2629_E06	36,5 ± 3,9	6,0	318	13150	45,8
2630_D02	37,6 ± 2,4	4,5	243	17318	51,2

Пример 8. Иммуногенность аднектинов PKE2.

In silico прогнозирование связывания HLA оценивали с помощью программного обеспечения Epi-matrix (EpiVax). Сравнение показателей показано в табл. 6. У аднектинов PKE2 2629\_E06 и 2630\_D09 наблюдали сниженные in silico показатели относительно 2270\_C01. Дополнительно, in vitro пролиферацию CD4+ Т-клеток в ответ на 1318\_H04, 2270\_C01 и аднектины PKE2 оценивали в виде ex vivo оценки потенциальной иммуногенности у человека. Способ градиента плотности фикола использовали для выделения мононуклеаров периферической крови (PBMC) из цельной крови, полученной от 40 независимых доноров, которые были приведены в соответствие по МНС II класса относительно генеральной совокупности. Клетки от каждого донора после выделения хранили в жидком N2 и оттаивали перед применением. Клетки от каждого донора метили флуоресцентным красителем карбоксифлуоресцеинсуццини-мидиловый сложный эфир (CFSE) и инкубировали с представлявшими интерес аднектинами в течение 7 дней при 37°C. Т-клетки метили антителом к CD4 и оценивали пролиферацию с помощью проточной цитометрии с применением аналитического программного обеспечения BD FACS Canto и FlowJo. Антигенность белка рассчитывали как процент доноров, у которых наблюдали значимое увеличение пролиферации CD4+ клеток.

Сравнения исходного 2270\_C01 и двух его производных 2629\_E06 или 2630\_D02 выявляло, что исходная молекула имела более высокую антигенность (фиг. 4 и табл. 6), что свидетельствовало о том, что два производных аднектина PKE2 характеризовались уменьшенным потенциалом иммуногенности относительно исходной молекулы.

Таблица 6

	<u>Процент</u>	<u>Сила</u>	<u>Показатель</u>	<u>Epimatrix</u>	<u>Петля CD</u>
		<u>ответа</u>	<u>ответа</u>	<u>ответа</u>	<u>последовательность</u>
<u>Аднектины антигенности</u>	<u>(Среднее)</u>	<u>положительных</u>	<u>коэффициент</u>	<u>Петля</u>	
		<u>респондеров)</u>		<u>CD,</u>	
1381_H04	0,08	5,23	0,39		
2270_C01	0,73	6,82	4,95	1,71	WQVQMYSDWGPLYIYK
2629_E06	0,16	4,04	0,64	-5,63	REVQKYSDLGPLYIYQ
2630_D02	0,26	4,16	1,10	-5,98	REVQKYSDWGPLYIYN

Пример 9. Эффекты одноцистеиновых мутантов аднектинов PKE2 на связывание альбумина.

В сайты включали отдельные цистеиновые остатки, отличающиеся от HSA-связывающих остатков аднектинов PKE-2, с целью обеспечения возможности химической конъюгации представляющих интерес терапевтических молекул путем стандартных химических реакций с малеимидной группой. Важно было сохранить связывание с сывороточным альбумином (и, таким образом, улучшение ПК) в контексте цистеиновой мутации, поэтому тестировали эффекты таких мутаций на связывание с сывороточным альбумином от различных видов с применением молекулы 2629\_E06 в качестве основы для мутации. Скорость диссоциации ( $k_{off}$ ) каждого мутанта анализировали посредством SPR-анализа с иммобилизованными альбуминами и аднектинами, которые использовали в качестве анализируемых веществ в количестве 250 нМ. Как показано в табл. 7, при введении одноцистеиновых мутаций в 2629\_E06 наблюдали схожие скорости диссоциации от сывороточных альбуминов у различных видов, как и у исходной молекулы 2629\_E06, что указывало на то, что связывание с сывороточным альбумином сохранялось в контексте таких конкретных мутаций. Таким образом, любой из таких цистеиновых мутантов мог служить в качестве партнера химической конъюгации с представляющими интерес терапевтическими молекулами и обеспечивать улучшение ПК.

Таблица 7

<u>Описание</u>	<u>Аднектин</u>	<u>Скорость диссоциации HSA (<math>\epsilon^{-1}</math>)</u>	<u>Скорость диссоциации RhSA (<math>\epsilon^{-1}</math>)</u>	<u>Скорость диссоциации MSA (<math>\epsilon^{-1}</math>)</u>	<u>Скорость диссоциации RatSA (<math>\epsilon^{-1}</math>)</u>
PKE_2-NYRTEIDKPSQH6	2629_E06*	1,69E-04	2,19E-04	4,01E-04	7,67E-04
2629_E06-NYRTPCH6	5916_E03.PS5-2	2,11E-04	2,72E-04	4,52E-04	7,86E-04
2629_E06-NYRTPEDGCH6	5916_A04.PS5-2	1,48E-04	1,72E-04	3,07E-04	5,47E-04
MGCSTSGVSD-2629_E06-NYRTPH6	5963_A02.PS5-2	2,53E-04	3,13E-04	4,92E-04	9,02E-04
2629_E06(S55C)-NYRTPH6	5963_C03.PS5-2	2,29E-04	3,03E-04	4,63E-04	7,89E-04
2629_E06(A12C)-NYRTPH6	5963_D01.PS5-2	2,47E-04	3,13E-04	4,99E-04	8,58E-04
2629_E06(T58C)-NYRTPH6	5963_E01.PS5-2	2,50E-04	3,13E-04	5,07E-04	8,48E-04
2629_E06(T56C)-NYRTPH6	5963_E02.PS5-2	2,28E-04	2,84E-04	4,61E-04	7,60E-04
2629_E06(A26C)-NYRTPH6	5963_F03.PS5-2	2,51E-04	3,12E-04	5,04E-04	8,25E-04

Пример 10. Биофизические свойства одноцистеиновых мутантов 2629\_E06.

Оценивали биофизические свойства одноцистеиновых мутантов, описанных в примере 9, и результаты показаны в табл. 8. Каждый мутант давал термически стабильный и мономерный белок.

Таблица 8

Мутант	Буфер	Конц. (мг/мл)	Доступность белка (мг)	SEC	ASSA (M)	DSC (°C в кол- ве 0,5 мг/мл)
2629_E06(A26C)- NYRTPH6	PBS	2,3	4,1	>99% мономер	1,72	65,5
2629_E06- NYRTPCH6	PBS	2,6	4,7	>99% мономер	1,77	67,2
2629_E06(T56C)- NYRTPH6	PBS	2,7	4,8	>99% мономер	1,72	68,3
2629_E06(T58C)- NYRTPH6	PBS	2,4	4,3	>99% мономер	1,72	68,7
2629_E06(A12C)- NYRTPH6	PBS	2,8	5,1	>99% мономер	1,70	68,2
2629_E06(S55C)- NYRTPH6	PBS	2,4	4,2	>99% мономер	1,75	69,4
2629_E06- NYRTPEDGCH6	PBS	0,7	1,3	>90% мономер	1,73	70,5
MGCSTSGVSD-2629 E06-NYRTPH6	PBS	1,6	2,8	>90% мономер	1,71	67,8

Пример 11. Модульность тандемных молекул аднектина PKE2.

Одним из ограничений связывающих сывороточный альбумин за счет петли "северного полюса" аднектинов было отсутствие совместимости для применения в тандеме с другими <sup>10</sup>Fn3 белками. Поэтому исследовали совместимость аднектинов PKE2 с другими <sup>10</sup>Fn3 белками. Тестировали биофизические характеристики аднектинов PKE2 при гибридизации в тандеме с аднектином, который был специфичен к другой цели. Тестировали аднектины PKE2 в обоих возможных конфигурациях: в N-концевом расположении (PKE2-X) и в C-концевом расположении (X-PKE2). Характеристики, получаемые с помощью эксклюзионной хроматографии, тестировали с применением молекул, полученных с помощью НТРП способа. Гибриды с аднектином первого поколения 1318\_H04 с петлей "северного полюса" непосредственно сравнивали с гибридами с аднектинами PKE2 2629\_E06 и 2630\_D02. Тестируемые партнеры гибридизации включали связывающий миостатин <sup>10</sup>Fn3 домен (2987\_H07; см. WO 2014/043344), два связывающих PCSK9 <sup>10</sup>Fn3 домена (2013\_E01 и 2382\_D09) и связывающий EGFR <sup>10</sup>Fn3 домен (1312\_E01). Последовательности аднектинов PCSK9 2382\_D09 и 2013\_E01 можно найти в WO 2011/130354, которая включена в настоящий документ с помощью ссылки. Как показано в табл. 9, молекулы обоих аднектинов PKE2 постоянно сохраняли хорошие биофизические характеристики, что отражалось в доле молекул с SEC классом А (т.е. который соответствует тому, что ≥90% являются мономерными аднектинами), относительно молекулы SABA 1318\_H04 с петлей "северного полюса", в контексте тандемного аднектина. PKE в таблице относится к связывающему сывороточный альбумин <sup>10</sup>Fn3 домену (т.е. улучшающему РК <sup>10</sup>Fn3 домену). Соотношения представляют собой число клонов с SEC=A/общее число протестированных клонов. Тандемы, которые не были созданы, обозначены "-".

Таблица 9

% тандемов PKE с SEC = A									
Аднектин	2987_H07 (Myo)		2013_E01 (PCSK9)		1312_E01 (EGFR)		2382_D09 (PCSK9)		
	X-PKE	PKE-X	X-PKE	PKE-X	X-PKE	PKE-X	X-PKE	PKE-X	
PKE	1318_H04	31 (8/26)	0 (0/26)	31 (8/26)	-	-	-	8 (8/26)	-
	2629_E06	30 (3/10)	80 (8/10)	90 (9/10)	80 (8/10)	70 (7/10)	70 (7/10)	58 (51/88)	-
	2630_D02	20 (2/10)	60 (6/10)	50 (5/10)	80 (8/10)	70 (7/10)	70 (7/10)	-	-

Данные на фиг. 5 отражают данные, представленные в табл. 9, для связывающего 2987\_H07 миостатин <sup>10</sup>Fn3 домена и связывающего 2013\_E01 PCSK9 <sup>10</sup>Fn3 домена, за исключением того, что различные оттенки серого отражают способность тандемных молекул уменьшать связывание с HSA, по результатам определения в анализе ИФА непосредственным связыванием, который описан выше. Различные оттенки серого на фиг. 5 соответствуют различным соотношениям EC<sub>50</sub> тандемного аднектина/EC<sub>50</sub> моноаднектина в отношении связывания с HSA, причем более темные оттенки представляют более сильное связывание тандемных молекул с HSA. Из данных на фиг. 5 видно, что PKE2-тандемные молекулы имели лучшую мономерность (т.е. были менее склонны к димеризации и агрегации) и связывание с HSA (т.е. теряли меньше связывания с HSA и RhSA) относительно аднектина 1318\_H04. Схожие картины наблюдали с четырьмя дополнительными связывающими цель аднектинами. Из этих данных видно, что аднектины PKE2 представляют собой более стабильный и активный партнер связывания с другими <sup>10</sup>Fn3 белками, чем связывающие сывороточный альбумин за счет петли "северного полюса" аднектины.

Пример 12. Тандемные молекулы PCSK9-PKE2 характеризуются хорошей активностью в биохимических анализах PCSK9, низкими показателями EpiMatrix, хорошими биофизическими свойствами и межвидовым связыванием альбумина

Получали различные тандемные аднектины PCSK9-PKE2 на основе аднектина PKE2 2629\_E06 и аднектина PCSK9 2382\_D09, которые показаны в табл. 10. Каждая из тандемных молекул отличались лишь линкером, и их все тестировали в отношении их биофизических и функциональных свойств для подтверждения сохранения активностей как связывающего альбумин PKE2, так и связывающего PCSK9 аднектина. Межвидовое связывание альбумина определяли с помощью способа ИФА, который описан выше. Относительную термостабильность оценивали с помощью термической сканирующей флуоресцентной спектроскопии (TSF). Образцы из НТТР нормализовали к 0,2 мг/мл в PBS. 1 мкл красителя Sypro orange, разведенного 1:40 при помощи PBS, добавляли к 25 мкл каждого образца и запечатывали планшет прозрачной клейкой лентой для 96-луночных микропланшетов. Образцы сканировали с помощью RT-PCR машины BioRad путем линейного изменения температуры с 25°C до 95°C со скоростью 2 градуса в минуту. Данные анализировали с помощью программного обеспечения BioRad CFX manager 2.0. Было показано, что полученные с помощью TSF значения хорошо коррелировали со значениями  $T_m$ , полученными с помощью DSC, в диапазоне плавления 40-70°C. Его считают приемлемым рабочим диапазоном для такой методики. Результат ND ("нет данных") получали в случае, когда угловой коэффициент кривой фазового перехода был слишком мал для того, чтобы можно было отличить его производный пик (скорость изменения флуоресценции со временем) от шума.

С помощью FRET анализа PCSK9:EGFA измеряли ингибирование связывания PCSK9 с доменом, подобным предшественнику эпидермального фактора роста (EGFA-доменом), рецептора липопротеинов низкой плотности (LDLR) с применением рекомбинантного PCSK9 человека, который экспрессировался в бакуловирусе, и синтетического EGFA-пептида из 40 мономеров (биотинилированного). Было показано, что EGFA представляет собой ключевой домен взаимодействия LDLR с PCSK9 (Kwon, H.J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105(6): 1820-1825 (2008)). Этот анализ предусматривал применение mAb, связывающегося с С-концевым доменом PCSK9 (mAb 4H5), меченного Еи-хелатом, обеспечивающим взаимодействие FRET с биотинилированным EGFA посредством флуорофор-содержащего комплекса стрептавидин/аллофикоцианин. FRET анализ PCSK9-LDLR проводили аналогичным образом с использованием внеклеточного домена LDLR вместо пептида EGFA.

Все тандемные молекулы обладали низкой иммуногенностью (отрицательным показателем EpiMatrix), высокой мономерностью (по оценке с помощью SEC), приемлемой относительной термостабильностью (TSF) и благоприятным межвидовым связыванием альбумина по оценке с помощью ИФА-анализа. Кроме того, тандемные аднектины PCSK9-PKE2 сохраняли хорошую активность в биохимических анализах PCSK9 со значениями  $IC_{50}$ , схожими с неперереформированным аднектином 2382\_D09.

Таблица 10

Тандем PCSK9-PKE2	Линкер	EpiMatrix	Конц. (мкг/мл)	SEC	TSF	HuSA EC50 (нМ)	RhSA EC50 (нМ)	MuSA EC50 (нМ)	EGFA FRET 1 (IC50, нМ)	EGFA FRET 2 (IC50, нМ)	PCSK9: LDLR FRET (IC50, нМ)
4472_E09	A	-12,3	3490	A	58,5	23,8	19,8	7,0	5,81	4,81	1,3
4472_A11	B	-21,2	4530	A	61	26,9	15,7	3,9	6,13	3,76	1,4
4472_H09	C	-10,2	2410	A	62,5	27,8	26,8	4,0	9,66	7,17	3
4472_F04	D	-18,8	3410	A	60,5	40,3	27,8	3,8	3,99	4,18	1,2
4472_C08	E	-14,4	2880	A	60	40,4	25,7	4,8	9,38	5,09	1,9
4472_F08	F	-13,0	5050	A	61	55,4	35,2	7,3	7,88	5,88	2,5
4472_F06	G	NA	4450	A	61	58,9	40,8	11,3	4,50	3,42	1,1
4472_G10	H	-15,7	1694	A	61	61,3	48,3	10,0	7,81	6,81	2,4
4472_E06	I	-15,4	4810	A	60	67,3	40,1	4,2	7,67	5,68	1,6
4472_B10	J	-5,4	1299	A	59,5	67,7	38,9	10,9	9,69	6,97	2,2
4472_B09	K	-3,4	2230	A	59,5	69,2	45,1	9,8	9,36	6,95	2,4
4472_B11	L	-11,5	835	A	59,0	70,1	54,0	13,5	6,54	5,03	2
4472_A06	M	-7,0	3720	A	58	77,8	44,4	8,6	9,06	2,72	1,6
4472_D08	N	-13,1	4140	A	60	80,2	54,1	9,5	6,32	5,22	1,7
4472_B05	O	-6,2	639	A	57,5	85,1	59,5	9,3	6,66	5,55	1,9
4472_H11	P	-1,7	1099	A	nd	85,3	58,1	13,2	8,76	6,24	1,3
4472_E04	Q	-5,6	1244	A	60,5	100,9	64,8	8,9	9,45	7,54	2
4472_E05	R	-2,5	933***	A	54,5	102,2	63,1	13,1	5,66	4,35	1,5
4472_B03	S	-7,9	1239	A	59	123,5	98,2	14,8	7,45	4,83	1,4
4472_D06	T	-17,7	2850	A	61,5	139,2	93,1	15,6	8,12	6,51	1,8
4472_A04	U	-6,6	1142	A	nd	143,7	84,0	16,7	5,14	4,44	1,1
4472_C06	PSTPPTSPSTPPTPSP	-19,6	6760	A	61	184,3	131,1	15,6	9,18	3,09	1,4
ADX_2382_D0	n/a				83	n/a	n/a	n/a	19,70	10,6	2,3
ADX_2629_E0	n/a				56	14,5	10,5	2,8	n/a	n/a	n/a

Пример 13. Кинетика связывания тандемных молекул PCSK9-PKE2 с PCSK9 человека.

Связывание тандемного аднектина PCSK9-PKE2 с иммобилизованным PCSK9 человека измеряли в присутствии или в отсутствии HSA с помощью интерферометрии биослоя (Octet Red 96, с помощью наконечников с датчиками Superstreptavidin, ForteBio, Менло-Парк, Калифорния). События ассоциации и диссоциации захватывали в реальном времени для серии концентраций аднектина при помощи биотини-

лированных полноразмерных PCSK9, захваченных на наконечниках с датчиками. Кривые связывания приводили в целом в соответствие с получением значений  $K_D$ ,  $k_{on}$  и  $k_{off}$ .

Комплексы тандемный аднектин-HSA предварительно формировали путем инкубирования тандема в избытке и проведения анализа связывания в случае избыточного HSA. Считали, что комплекс между комплексами тандемный аднектин-HSA и PCSK9 человека сформировался, если имела место повышенная кажущаяся масса для тандемных аднектинов в случае HSA в той же концентрации (см., например, фиг. 6). Как показано в табл. 11, все протестированные тандемные молекулы PCSK9-PKE2 имели схожую кинетику связывания и активности в отношении PCSK9. Наблюдалось небольшое уменьшение для ассоциации и немного более быструю диссоциацию для комплекса HSA-аднектин, связывающегося с huPCSK9.

Таблица 11

Таблица данных связывания PCSK9:аднектин PKE2						
	без HSA			+HSA		
	$K_D$ (нМ)	$k_{on}$ (1/Мс)	$k_{off}$ (1/с)	$K_D$ (нМ)	$k_{on}$ (1/Мс)	$k_{off}$ (1/с)
4472_F08	0,404	2,89E+05	1,18E-04	0,902	1,61E+05	1,48E-04
4472_E06	0,724	2,81E+05	2,00E-04	1,003	2,07E+05	2,09E-04
4472_C06	0,515	3,36E+05	1,68E-04	1,547	1,97E+05	3,05E-04

Пример 14. Характеристика связывания тандемных молекул PCSK9-PKE2 с сывороточным альбумином от различных видов.

Аффинности тандемных молекул PCSK9-PKE2 в отношении сывороточного альбумина от различных видов, наряду с аффинностью аднектина PKE2 2629\_E06, оценивали с помощью анализа Висоге, как описано в примере 2.

Как показано в табл. 12, у всех трех тандемных молекул PCSK9-PKE2 наблюдали сравнимые аффинности к сывороточным альбуминам среди видов, при этом аффинности у тандемов были в 5-7 раз слабее (со схожими скоростями диссоциации) в сравнении с аднектином PKE2 2629\_E06.

Таблица 12

Тандемный аднектин	Связывание с	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	$K_D$ (нМ)	$R_{max}$ (RU)
2629_E06	HuSA	1,74E+04	2,13E-04	12,3	106,8
	RhSA	1,95E+04	2,83E-04	14,5	86,24
	MuSA	6,84E+04	2,42E-04	3,6	97,99
4472_F08	HuSA	4,82E+03	3,24E-04	67,1	187,8
	RhSA	5,34E+03	3,67E-04	68,7	157,9
	MuSA	1,35E+04	3,44E-04	25,5	166,7
4472_E06	HuSA	5,30E+03	3,62E-04	68,4	215,4
	RhSA	5,77E+03	4,15E-04	71,9	181,4
	MuSA	1,50E+04	3,00E-04	20,0	186,2
4472_C06	HuSA	3,92E+03	2,89E-04	73,7	182,5
	RhSA	4,38E+03	3,37E-04	77,0	155,9
	MuSA	1,15E+04	3,01E-04	26,1	163,1

Схожий эксперимент (в условиях, которые описаны в примере 2) проводили с тандемным аднектином 4472\_C06 без 6X гистидинового хвоста (называемым 5190\_E01). Как показано в табл. 13, 5190\_E01 связывался с сывороточным альбумином мыши с  $K_D$ , аналогичной таковой для сывороточного альбумина человека, яванского макака и макака-резус, и связывался с сывороточным альбумином крысы с  $K_D$ , равной 200 нМ.

Таблица 13

Тандемный аднектин	Лиганд	$k_a$ (1/Мс)	$k_d$ (1/с)	$K_D$ (нМ)	$R_{max}$ (RU)
5190_E01(но6XHis)	HSA(n=4)	4,79E+03	2,72E-04	57,2 ± 8,6	173,2
	cytoSA (n=3)	6,44E+03	3,26E-04	50,5 ± 5,4	168,5
	RhSA (n=3)	6,52E+03	3,51E-04	53,8 ± 8,8	158,7
	MSA	1,67E+04	7,23E-04	43,3	148,8
	Rat SA	7,35E+03	1,47E-03	200	139,7

Также тестировали эффекты pH на связывание аднектина PKE2 2629\_E06 и тандемных аднектинов PCSK9-PKE2 4472\_C06, 4427\_E06 и 4472\_F08. Как показано в табл. 14 и 15, у всех протестированных аднектинов наблюдали pH-независимое связывание с сывороточным альбумином от различных видов.

Таблица 14

Аднектин	Буфер	Связывание с	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (М)	Rmax (RU)	Chi <sup>2</sup> (RU <sup>2</sup> )
Аднектин PKE2 2629_E06	HBSP, pH7.4	HUSA	2,07E+04	2,19E-04	10,6	101,7	1,8
		RhSA	2,18E+04	2,76E-04	12,7	91,41	1,51
		MuSA	7,91E+0,4	2,72E-04	3,43	101,1	1,87
	Ацетат, pH 7,4	HUSA	2,80E+0,4	2,72E-04	9,74	112,9	4,64
		RhSA	2,79E+04	3,28E-04	11,8	100,8	3,75
		MuSA	7,68E+04	2,68E-04	3,48	105,2	2,34
	Ацетат, pH 5,5	HuSA	7,04E+04	3,26E-04	4,64	88,62	3,25
		RhSA	4,85E+04	5,84E-04	12,0	68,33	1,05
		MuSA	8,40E+04	1,25E-03	14,9	87,71	4,1
Тандем PCSK9- PKE2 ADX_4472_C06	HBSP, pH7,4	HuSA	3,58E+03	2,58E-04	72,0	167,5	4,02
		RhSA	3,86E+03	3,05E-04	78,9	154,3	3,62
		MuSA	1,19E+04	3,36E-04	28,2	157,1	2,64
	Ацетат, pH 7,4	HuSA	4,35E+03	3,25E-04	74,7	170,1	7,34
		RhSA	4,51E+03	3,64E-04	80,7	161,2	5,58
		MuSA	1,08E+04	3,75E-04	34,8	160,7	2,53
	Ацетат, pH 5,5	HuSA	1,22E+04	4,66E-04	38,2	143,1	6,01
		RhSA	8,36E+03	8,15E-04	97,5	105,2	1,6
		MuSA	1,31E+04	1,61E-03	123	132,3	7,08
Тандем PCSK9- PKE2 4472_E06	HBSP, pH7,4	HuSA	4,76E+03	2,92E-04	61,4	181,2	8,92
		RhSA	5,11E+03	3,32E-04	64,9	166	7,94
		MuSA	1,52E+04	3,30E-04	21,8	172,6	6,43
	Ацетат, pH 7,4	HuSA	5,91E+03	3,83E-04	64,9	185,6	17,1
		RhSA	6,24E+03	4,08E-04	65,4	173,8	12,8
		MuSA	1,41E+04	3,68E-04	26,1	177,4	6,35
	Ацетат, pH 5,5	HuSA	1,36E+04	4,78E-04	35,2	164,1	12,4
		RhSA	8,64E+03	7,88E-04	91,1	137,5	3,73
		MuSA	1,34E+04	1,52E-03	114	164	14,5

Таблица 15

Аднектин	Буфер	Связывание с	ka	kd (1/с)	KD (М)	Rmax	Chi <sup>2</sup>
PKE2 Аднектин 2629_E06	HBSP, pH 7,4	HuSA	1,79E+04	1,92E-04	10,7	107,0	0,9
		RhSA	2,35E+04	2,67E-04	11,4	108,2	1,8
		MuSA	7,96E+04	2,62E-04	3,3	100,9	1,2
	Ацетат, pH 7,4	HuSA	2,54E+04	2,43E-04	9,6	114,6	2,7
		RhSA	2,86E+04	2,97E-04	10,4	116,0	3,0
		MuSA	4,49E+04	5,03E-04	11,2	81,0	1,2
	Ацетат, pH 5,5	HuSA	7,07E+04	2,87E-04	4,1	95,1	3,9
		RhSA	4,49E+04	5,03E-04	11,2	81,0	1,2
		MuSA	7,70E+04	1,13E-03	14,6	85,3	3,2
Тандем PCSK9- PKE2 4472_F08	HBSP, pH 7,4	HuSA	3,59E+03	3,01E-04	83,8	185,4	4,4
		RhSA	4,82 E+03	3,46E-04	71,7	191,2	9,1
		MuSA	1,37E+04	3,59E-04	26,3	164,4	4,1
	Ацетат, pH 7,4	HuSA	4,61E+03	3,87E-04	83,9	176,3	8,9
		RhSA	5,38E+03	4,05E-04	75,4	194,2	10,2
		MuSA	1,16E+04	4,07E-04	35,0	165,1	2,7
	Ацетат, pH 5,5	HuSA	1,11E+04	4,89E-04	43,9	187,1	10,1
		RhSA	7,40E+03	8,18E-04	110,5	161,0	2,6
		MuSA	1,10E+04	1,50E-03	136,6	156,5	7,2

Пример 15. Двойное связывание тандемных аднектинов PCSK9-PKE2 с альбуминами и PCSK9.

Способность тандемных аднектинов PCSK9-PKE2 одновременно связываться с сывороточным альбумином и PCSK9 оценивали с помощью SPR. По-видимому, тандем будет связываться с альбумином большей частью *in vivo*, и поэтому при связывании с альбумином будет необходимо сохранение активности аднектина PCSK9. Связывание тандемных аднектинов PCSK9-PKE2 одновременно с обеими целями тестировали в режиме двойной инъекции с первой инъекцией тандема на иммобилизованный альбумин на поверхности чипа, за которой следовала вторая инъекция PCSK9 человека и регистрация уровней связывания после 3-минутной фазы ассоциации для каждой инъекции. Повышение сигнала связывания в SPR при инъекции PCSK9 относительно буфера свидетельствовало об одновременном связывании тандема с HSA и PCSK9, как показано на фиг. 7. У PCSK9 наблюдали ~40% ожидаемого уровня связывания с 500 нМ или 1 мкМ тандемного аднектина, предварительно связанного с HSA. В качестве дополнительного контроля, у PCSK9 не наблюдали связывания только с PKE-2 (данные не показаны).

Пример 16. In vivo выведение аднектинов PCSK9-PKE2 у мышей WT C57 BL/6.

In vivo период полужизни тандемного аднектина PCSK9-PKE2 4772\_C06 определяли в 2-недельном исследовании с одной внутривенной дозой 2 мг/кг на мышах C57 BL/6 дикого типа. Уровни в плазме тандемного аднектина определяли с помощью платформы MesoScale Discovery. Биотинилированный PCSK9 человека использовали для захвата аднектина, а детекцию осуществляли при помощи сывороточного альбумина мыши, связавшегося с тандемом, и вторичного pAb с сульфо-меткой к сывороточному альбумину мыши. Некомпаратментные анализы проводили с помощью Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight Corporation, Маунтин-Вью, Калифорния) с применением способа линейно-логарифмического расчета и моделирования условий плазмы. Как показано в табл. 16 и на фиг. 8, средний период полужизни тандемного аднектина 4772\_C06 составлял 16,7 ч.

Таблица 16

штамм	доза	mouse_ID	HL_Lambda z (ч)	CL_obs (мл/ч/кг)	Vss_obs (мл/кг)	AUCall (ч*нмоль/л)	AUCINF_obs (ч*нмоль/л)	AUC_%Extrap_ obs (%)	MRTINF obs (ч)
C57BL/6	2 мг/кг	N	3	3	3	3	3	3	3
		Среднее	16,7	4,39	92,0	18657	18787	0,69	21,0
		SD	1,0	0,21	40	868	893	0,10	15
		SE	0,6	0,12	23	501	515	0,06	09
		CV%	6	4,8	44	4,7	4,8	15,1	7,4

Пример 17. Тандемные аднектины PCSK9-PKE2 характеризовались робастным захватом цели PCSK9 in vivo.

Фармакодинамическую активность тандемного аднектина PCSK9-PKE2 4472\_C06 оценивали на мышинной модели, трансгенной по PCSK9 человека, которая характеризовалась нормальными уровнями PCSK9 человека. Эта модель представляла собой геномный трансгенный hPCSK9 (BAC-трансгенный), который регулировался в печени аналогично PCSK9 мыши и который экспрессировался с почти нормальными для человека уровнями hPCSK9 в плазме. Несвязанный hPCSK9 оценивали после однократной внутрибрюшинной дозы PBS в качестве наполнителя или 0,5 или 2 мг/кг тандема с 8 животными на группу. Был разработан твердофазный иммуоферментный анализ (ИФА), специфичный к свободному (несвязанному) PCSK9 человека, который не детектировал PCSK9 мыши. Этот анализ предусматривал использование предварительно обработанных стрептавидином 96-луночных планшетов, покрытых 2 мкг/мл биотинилированного PCSK9-аднектина 2013\_E01 в качестве захватывающего реагента. Образцы плазмы, замороженные лишь не более одного раза, разводили надлежащим образом в буфере для ИФА (25 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,2 с 0,05% Tween-20 и 0,1% BSA), добавляли в лунки и инкубировали в течение 1 ч при 20°C. Затем лунки промывали и инкубировали с 5 мкг/мл поликлонального IgG кролика к PCSK9 человека (разработанное BMS антитело, произведенное компанией Lampire Biological Labs, Пайперсвилл, Пенсильвания) в течение 1 часа с последующей обработкой HRP-меченным антителом к IgG кролика с ТМВ с помощью стандартных для ИФА способов. Строили стандартные кривые с помощью очищенного рекомбинантного PCSK9 человека.

Как показано на фиг. 9, результаты анализа уровней свободного hPCSK9 свидетельствовали о сильном захвате цели тандемным аднектином PCSK9-PKE2 в обеих тестируемых дозах. Свободный hPCSK9 ингибировался дозозависимым образом, что было видно по большей длительности ответа на 2 мг/кг дозу относительно 0,5 мг/кг дозы. Из этих данных видна in vivo активность тандемного аднектина PCSK9-PKE2.

Пример 18. In vivo период полужизни моноаднектинов PKE2 и тандемных аднектинов PCSK9-PKE2 у яванских макаков.

PK/PD исследования с однократной дозой проводили на нормальных худых самках яванского макака со сравнениями тандема PCSK9-PKE2 с моноаднектином PKE2 или препаратом сравнения, который представлял собой пэгиллированный аднектин PCSK9, в мольных эквивалентах дозы, которые указаны при помощи штриховки в приведенной ниже табл. 17. Аднектин PKE2 2629\_E06, или аднектин 5190\_E01, который представлял собой тандем PCSK9-PKE2, или пэгиллированный аднектин PCSK9 (называемый АТИ-1476) в качестве препарата сравнения, вводили яванским макакам в указанных концентрациях и указанными путями (см. табл. 17 и фиг 10) и собирали образцы плазмы крови (K2EDTA) и сыворотки через промежутки времени для фармакокинетической и фармакодинамической оценки. Уровни аднектинового лекарственного средства измеряли в плазме крови мыши с помощью платформы на основе технологии Mesoscale. 2629\_E06 захватывали посредством антител к His (BMS) и детектировали с помощью связанного с аднектином сывороточного альбумина макака и вторичного pAb с сульфо-меткой к сывороточному альбумину яванского макака. Для анализов тандемов биотинилированный PCSK9 человека использовали для захвата аднектина, а детекцию осуществляли при помощи альбумина яванского макака, как описано выше. Пэгиллированный аднектин АТИ-1476 захватывали посредством биотинилированного hPCSK9 и детектировали посредством mAb к ПЭГ (Epitomics) в конъюгации с pAb козы с сульфо-меткой к антителу кролика. Некомпаратментные анализы проводили с помощью Phoenix WinNonlin 6.3 (Pharsight Corporation, Маунтин-Вью, Калифорния) с применением способа линейно-логарифмического расчета и моделирования условий плазмы.

Как показано в табл. 17, периоды полужизни 2629\_E06 и АТІ-1476 в плазме были эквивалентными и составляли 112 ч. Период полужизни 5190-E01 был короче периода полужизни моноаднектина РКЕ2 и варьировал в диапазоне от 60 до 82 ч после внутривенного введения. 5190\_E01 характеризовался дозопропорциональным воздействием в промежутке от 3 до 10 мг/кг внутривенных доз ( $AUC_{ALL}$  соотношение 1,02). Для всех протестированных белков объем распределения был меньше объема плазмы, что свидетельствовало о том, что распределение тандемного аднектина РСК9-РКЕ2 и пэгилированного аднектина было в основном ограничено пространством сосудов. Выведение в целом было низким и сравнимым для различных доз и форматов. Подкожная биодоступность тандемного аднектина 5190\_E01 составляла 41-49%.

Таблица 17

Формат	Доза	HL_Lambda_z (ч)	Cl_obs (мл/ч/кг)	Vss_obs (м <sup>3</sup> /кг)	AUCall (ч*мкмоль/л)	AUCINF_obs (ч*мкмоль/л)	AUC_%Extrap_obs (%)	MRTINF_obs (ч)
Тандем РСК9-РКЕ2 5190_E01	3 мг/кг SC				92 ± 17	92 ± 17	0,54 ± 0,4	
	3 мг/кг IV	82 ± 5,1	0,55 ± 0,03	57 ± 4,3	222 ± 24	234 ± 12	5,45 ± 5,4	104,6 ± 2,5
	10 мг/кг IV	60 ± 6,5	0,58 ± 0,09	50 ± 6,8	754 ± 98	769 ± 103	1,76 ± 1,4	87,3 ± 10,4
РСК9-РЕG АТІ-1476	5 мг/кг IV	112 ± 7,6	0,46 ± 0,08	65 ± 10	1000 ± 14	1008 ± 14	0,70 ± 0,5	141,6 ± 7,6
РКЕ2 2629_E06	1,5 мг/кг IV	112 ± 7,3	0,37 ± 0,05	56 ± 5,2	305 ± 49	328 ± 45	6,92 ± 6,6	152 ± 8,2

Также в отдельном исследовании у яванских макаков тестировали фармакокинетику исходного аднектина 2270\_C01. Уровни аднектинового лекарственного средства количественно оценивали, как описано выше для РК исследований на мышах. Как показано в табл. 18 и на фиг. 11, аднектин 2270\_C01 имел период полужизни 83,5 ч после однократной внутривенной болюсной дозы 1 мг/кг.

Таблица 18

	HL_Lambda_z (ч)	Vz_obs (мл/кг)	Cl_obs (мл/ч/кг)	AUCINF_obs (ч*нмоль/л)	MRTINF_obs (ч)
N	2	2	2	2	2
Средн.	<b>83,5</b>	22,319	0,185	419981,536	102,847
SD	8,632	2,819	0,004	9680,781	1,888
SE	6,104	1,993	0,003	6845,346	1,335
Мин	77,4	20,33	0,18	413136,19	101,51
Макс	89,6	24,31	0,19	426826,88	104,18
CV%	10,3	12,6	2,3	2,3	1,8

Пример 19. Тандемный аднектин РСК9-РКЕ2 функционировал как ингибитор РСК9 у яванских макаков.

Результаты описанного выше РК/PD исследования на яванских макаках оценивали в отношении фармакодинамических эффектов ингибирования РСК9. Были разработаны твердофазные иммуоферментные анализы (ИФА), специфичные для РСК9 яванского макака. Анализ свободного (несвязанного) РСК9 предусматривал использование платформы MesoScale Discovery и включал предварительно обработанные стрептавидином 96-луночные MSD планшеты, покрытые 2 мкг/мл биотинилированного РСК9-аднектина 2013\_E01 в качестве захватывающего реагента. Образцы разводили 1:4 блокирующим и меченным сульфо-меткой поликлональным IgG кролика к РСК9 человека (разработанное BMS антитело, произведенное компанией Lampire Biological Labs, Пайперсвилл, Пенсильвания), добавляли в лунки и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем лунки промывали и считывали с применением 2X буфера для считывания MSD. ИФА анализ общего РСК9 проводили аналогично описанному выше, за исключением того, что mAb-4H5 (разработанное BMS антитело, произведенное компанией Lampire Biological Labs, Пайперсвилл, Пенсильвания) включали в качестве антитела для захвата, а стадию детектирования выполняли отдельно от стадии захвата. MAb-4H5 связывалось с С-концевым доменом РСК9 и в связанном с 96-луночными планшетами состоянии эффективно захватывало общий РСК9 (как комплекс аднектин-РСК9, так и свободный РСК9). В ходе стадий захвата и детекции общего РСК9 проводили инкубацию в течение 1 ч. Строили стандартные кривые с помощью очищенного рекомбинантного РСК9 человека или яванского макака.

Аналиты сыворотки анализировали на системе Siemens Advia 1800 Clinical Chemistry System с помощью стандартных ферментативных процедур. LDL-холестерин оценивали с помощью прямого способа оценки LDL (Roche Diagnostics). Другие тестируемые аналиты представляли собой следующие: аспаратаминотрансфераза, аланинаминотрансфераза, щелочная фосфатаза, гамма-глутамилтрансфераза, общий билирубин, азот мочевины крови, креатинин, общий холестерин, триглицерид, липопротеин высокой плотности, липопротеин низкой плотности, глюкоза, общий белок, альбумин, глобулин, соотноше-

ние альбумин/глобулин, кальций, неорганический фосфор, натрий, калий, хлор.

Как показано на фиг. 12, у 5190\_E01 наблюдали фармакодинамические эффекты в отношении несвязанного/свободного PCSK9, общего PCSK9 и LDL-с, которые ранее наблюдали с другими ингибиторами аднектина PCSK9. В частности, наблюдали быстрый захват цели, при котором свободный PCSK9 резко падал до недетектируемых уровней в пределах 1 ч после введения дозы. LDL-с снижался до ~50% исходного уровня в результате ингибирования PCSK9, при этом максимальное ингибирование наблюдали в рамках 2-5-дневного интервала. Кроме того, общий PCSK9 возрастал по мере накопления комплекса аднектин PCSK9-ПКЕ2:PCSK9. После диссоциации комплекса и выведения лекарственного средства уровни PCSK9 и LDL-с возвращались к исходному уровню через ~15 дней исследования. Сходную тенденцию наблюдали с препаратом сравнения, представлявшим собой пэгилированный аднектин PCSK9. Как показано на фиг. 13, 5190\_E01 характеризовался сходным робастным снижением LDL-с при 10 мг/кг, как и молярный эквивалент дозы препарата сравнения, представлявшего собой пэгилированный аднектин PCSK9.

Пример 20. Зависимость от дозы при захвате цели PCSK9.

Дозозависимый ответ ингибирования свободного PCSK9 наблюдали в дозах 3 и 10 мг/кг 5190\_E01, как показано на фиг. 14. Доза 10 мг/кг характеризовалась более длительным периодом захвата цели PCSK9, чем доза 3 мг/кг. На этой фигуре также проиллюстрирован эквивалентный захват цели PCSK9 для молярных эквивалентов дозы для tandemного и пэгилированного аднектинов. Как и ожидали, 2629\_E06 не изменял свободный PCSK9; любое наблюдаемое отклонение свободного PCSK9, по всей вероятности, было связано с суточным ритмом и вариабельностью исходного уровня.

На фиг. 15 проиллюстрировано отличие эффектов tandemного и пэгилированного аднектинов PCSK9 на общий PCSK9. Несмотря на то, что общая тенденция была такой же, общий PCSK9 возрастал и возвращался к исходному уровню быстрее у макак, которым была введена доза 5190\_E01, относительно препарата сравнения, который представлял собой пэгилированный аднектин PCSK9, что свидетельствовало об иных механизмах выведения для комплекса PCSK9:аднектиновое лекарственное средство в зависимости от используемого способа улучшения ПК (выведение почками для tandemа в сравнении с поглощением макрофагами для пэгилированного аднектина). И в этом случае также, как и ожидали, в этом анализе у 2629\_E06 не наблюдали фармакодинамического эффекта.

Пример 21. Tandемный формат характеризовался эквивалентным *in vitro* иммуногенным ответом относительно компонентов.

*In vitro* оценку потенциальной иммуногенности проводили для нескольких tandemных аднектинов PCSK9-ПКЕ2 с помощью анализа пролиферации Т-клеток, как описано в примере 8.

Как показано на фиг. 16, процент и степень иммуногенного ответа на tandemные аднектины были схожими с таковыми для моноаднектиновых компонентов (т.е. PCSK9 или ПКЕ2; середина фиг. 16). Эти результаты свидетельствовали о минимальном риске/полном отсутствии риска иммуногенности для tandemных аднектинов в сравнении с моноаднектинами. Кроме того, различия в пролиферативном ответе на tandemы наблюдали в зависимости от последовательности линкера, соединявшего аднектины PCSK9 и ПКЕ2. Относительно tandemных аднектинов PCSK9-ПКЕ2 4472\_F08 и 4472\_E06, у tandemного аднектина 4472\_C06 наблюдали наиболее низкую иммуногенность. Одним потенциальным механизмом для таких наблюдаемых отличий могли быть отличия в переработке белка Т-клетками в ответ на последовательности линкера.

Сводка свойств 4472\_C06 представлена далее в табл. 19.

Таблица 19

Свойство	Система	4472_C06
Молекулярная масса		Белок 25 кДа
Биофизическое	Теплостабильность, T <sub>m</sub>	55°C
	Мономерность	>99%
PCSK9 KD (37°C)	Человек, яванский макак	0,14 нМ, 39 нМ (сердцевина, Octet Red)
KD альбумина (37°C)	Человек, яванский макак, мышь, крыса	57 нМ, 51 нМ, 43 нМ, 200 нМ
Биохимическая активность	PCSK9:EGFA FRET, человек	1,5 нМ
Клеточная активность	Поглощение PCSK9	19 нМ (сердцевина) 21 нМ (тандем)
	Истощение LDLR	9,4 нМ (тандем)
Прогнозируемая иммуногенность	Пролиферация PBMC	Средняя/низкая (сердцевина/тандем)
	Epmatrix	Низкая
	Содерж. послед. 10Fn3 WT	Высокая
PK	Трансгенная или WT мышь	17-24 ч
	Яванский макак	82 ч
Вязкость	В необходимой концентрации	Низкая

### Иллюстративные варианты осуществления

1. Полипептид, содержащий десятый домен фибронектина III типа (<sup>10</sup>Fn3), причем <sup>10</sup>Fn3 домен содержит а) петли АВ, ВС, CD, DE, EF и FG, б) петлю CD с измененной аминокислотной последовательностью по отношению к последовательности соответствующей петли CD человеческого <sup>10</sup>Fn3 домена, и с) причем полипептид связывается с сывороточным альбумином человека с K<sub>D</sub> менее 500 нМ.

2. Полипептид по варианту осуществления 1, причем <sup>10</sup>Fn3 домен дополнительно связывается с одним или несколькими из сывороточного альбумина макака-резус, сывороточного альбумина яванского макака, сывороточного альбумина мыши и сывороточного альбумина крысы.

3. Полипептид по варианту осуществления 2, причем <sup>10</sup>Fn3 домен связывается с сывороточным альбумином макака-резус и сывороточным альбумином яванского макака.

4. Полипептид по варианту осуществления 3, причем <sup>10</sup>Fn3 домен связывает сывороточный альбумин макака-резус и сывороточный альбумин яванского макака с K<sub>D</sub> менее 500 нМ.

5. Полипептид по варианту осуществления 4, причем <sup>10</sup>Fn3 домен связывает сывороточный альбумин макака-резус и сывороточный альбумин яванского макака с K<sub>D</sub> менее 100 нМ.

6. Полипептид по варианту осуществления 5, причем <sup>10</sup>Fn3 домен связывает сывороточный альбумин макака-резус и сывороточный альбумин яванского макака с K<sub>D</sub> менее 10 нМ.

7. Полипептид по любому из предыдущих вариантов осуществления, причем <sup>10</sup>Fn3 домен связывает сывороточный альбумин мыши и крысы.

8. Полипептид по варианту осуществления 7, причем <sup>10</sup>Fn3 домен связывает сывороточный альбумин макака-резус и сывороточный альбумин яванского макака с K<sub>D</sub> менее 500 нМ.

9. Полипептид по варианту осуществления 8, причем <sup>10</sup>Fn3 домен связывает сывороточный альбумин макака-резус и сывороточный альбумин яванского макака с K<sub>D</sub> менее 100 нМ.

10. Полипептид по варианту осуществления 9, причем <sup>10</sup>Fn3 домен связывает сывороточный альбумин макака-резус и сывороточный альбумин яванского макака с K<sub>D</sub> менее 10 нМ.

11. Полипептид по любому из предыдущих вариантов осуществления, причем <sup>10</sup>Fn3 домен связывает сывороточный альбумин в диапазоне рН от 5,5 до 7,4.

12. Полипептид по любому из предыдущих вариантов осуществления, причем <sup>10</sup>Fn3 домен связывается с доменом I-II HSA.

13. Полипептид по любому из предыдущих вариантов осуществления, причем период полужизни в сыворотке полипептида в присутствии сывороточного альбумина человека составляет по меньшей мере 30 ч.

14. Полипептид по любому из предыдущих вариантов осуществления, причем петля CD содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле G-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-V-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-S-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-G-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-Y-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub>-X<sub>12</sub>-E, где:

- X<sub>1</sub> выбран из группы, состоящей из R или W;
- X<sub>2</sub> выбран из группы, состоящей из H, E, D, Y или Q;
- X<sub>3</sub> выбран из группы, состоящей из Q или H;
- X<sub>4</sub> выбран из группы, состоящей из I, K, M, Q, L или V;
- X<sub>5</sub> выбран из группы, состоящей из Y, F или N;
- X<sub>6</sub> выбран из группы, состоящей из D, V или E;
- X<sub>7</sub> выбран из группы, состоящей из L, W или F;

- (h)  $X_8$  выбран из группы, состоящей из P или T;  
 (i)  $X_9$  выбран из группы, состоящей из L или M;  
 (j)  $X_{10}$  выбран из группы, состоящей из I или V;  
 (k)  $X_{11}$  выбран из группы, состоящей из Y или F; и  
 (l)  $X_{12}$  выбран из группы, состоящей из T, S, Q, N или A.
15. Полипептид по варианту осуществления 14, где:  
 (a)  $X_1$  представляет собой R;  
 (b)  $X_2$  представляет собой E;  
 (c)  $X_3$  представляет собой Q;  
 (d)  $X_4$  представляет собой K;  
 (e)  $X_5$  представляет собой Y;  
 (f)  $X_6$  представляет собой D;  
 (g)  $X_7$  представляет собой L или W;  
 (h)  $X_8$  представляет собой P;  
 (i)  $X_9$  представляет собой L;  
 (j)  $X_{10}$  представляет собой I;  
 (k)  $X_{11}$  представляет собой Y; и  
 (l)  $X_{12}$  представляет собой Q или N.
16. Полипептид по варианту осуществления 15, где  $X_{10}$  представляет собой L, а  $X_{12}$  представляет собой Q.
17. Полипептид по варианту осуществления 15, где  $X_{10}$  представляет собой W, а  $X_{12}$  представляет собой N.
18. Полипептид по варианту осуществления 14, причем петля CD содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 101-125.
19. Полипептид по любому из предыдущих вариантов осуществления, причем петля CD содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 106.
20. Полипептид по любому из предыдущих вариантов осуществления, причем петля CD содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO: 113.
21. Полипептид по любому из предыдущих вариантов осуществления, причем полипептид содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную отличной от петли CD участкам SEQ ID NO: 23-100, 184-209 и 235-260.
22. Полипептид по любому из предыдущих вариантов осуществления, причем полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична любой из SEQ ID NO: 23-100, 184-209 и 235-260.
23. Гибридный полипептид, содержащий десятый домен фибронектина III типа ( $^{10}\text{Fn3}$ ) и гетерологичный белок, причем  $^{10}\text{Fn3}$  домен содержит а) петли AB, BC, CD, DE, EF и FG, б) петлю CD с измененной аминокислотной последовательностью по отношению к последовательности соответствующей петле человеческого  $^{10}\text{Fn3}$  домена, и с) причем полипептид связывается с сывороточным альбумином человека с  $K_D$  менее 500 нМ.
24. Гибридный полипептид по варианту осуществления 23, причем  $^{10}\text{Fn3}$  домен содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 23-100, 184-209 и 235-260.
25. Гибридный полипептид по варианту осуществления 24, причем  $^{10}\text{Fn3}$  домен содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную SEQ ID NO: 55, 81, 190 или 241.
26. Гибридный полипептид по варианту осуществления 25, причем  $^{10}\text{Fn3}$  домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 55, 81, 190 или 241.
27. Гибридный полипептид по варианту осуществления 24, причем  $^{10}\text{Fn3}$  домен содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную SEQ ID NO: 62, 88, 197 или 248.
28. Гибридный полипептид по варианту осуществления 27, причем  $^{10}\text{Fn3}$  домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 62, 88, 197 или 248.
29. Гибридный полипептид по варианту осуществления 23, причем гетерологичный белок представляет собой терапевтический фрагмент.
30. Гибридный полипептид по варианту осуществления 23, причем гетерологичный белок представляет собой полипептид, содержащий  $^{\text{III}}\text{Fn3}$  домен.
31. Гибридный полипептид по варианту осуществления 30, причем  $^{10}\text{Fn3}$  домен связывается с целевым белком, отличным от сывороточного альбумина.
32. Гибридный полипептид по варианту осуществления 31, причем  $^{10}\text{Fn3}$  домен связывается с PCSK9.
33. Гибридный полипептид по варианту осуществления 32, причем  $^{10}\text{Fn3}$  домен содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% иден-

тичную SEQ ID NO: 167.

34. Гибридный полипептид по варианту осуществления 33, причем  $^{10}\text{Fn3}$  домен содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 167.

35. Гибридный полипептид по варианту осуществления 23, причем гибридный полипептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичную SEQ ID NO: 168, 169 или 261.

36. Гибридный полипептид по варианту осуществления 35, причем гибридный полипептид содержит аминокислотную последовательность, изложенную под SEQ ID NO 168, 169 или 261.

37. Гибридный полипептид по любому из вариантов осуществления 23-36, причем период полужизни в сыворотке полипептида в присутствии сывороточного альбумина мыши составляет по меньшей мере 10 ч.

38. Гибридный полипептид по любому из вариантов осуществления 23-36, причем период полужизни в сыворотке полипептида в присутствии сывороточного альбумина яванского макака составляет по меньшей мере 50 ч.

39. Полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-125, 184-209 и 235-260, 168 и 169.

40. Композиция, содержащая полипептид по любому из предыдущих вариантов осуществления и носитель.

41. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид по любому из вариантов осуществления 1-39.

42. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 41, причем молекула нуклеиновой кислоты имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 126-151 и 172, или нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентична ей.

43. Вектор экспрессии, содержащий нуклеотидную последовательность по вариантам осуществления 41 или 42.

44. Клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по варианту осуществления 41 или 42 или вектор экспрессии по варианту осуществления 43.

45. Способ получения полипептидов по любому из вариантов осуществления 1-39, предусматривающий культивирование клетки по варианту осуществления 44 в условиях, подходящих для экспрессии полипептида, и очистку полипептида.

## Обзор последовательностей

SEQ ID	Описание	Последовательность
1	Человеческий <sup>10</sup> Fn3 домен дикого типа	VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGET GGNSPVQEFVPGSKSTATISGLKPGVDYTTITVYAVTGR GDSPASSKPISINVRT
2	Человеческий <sup>10</sup> Fn3 домен дикого типа с описанными в целом петлевыми последовательностями	VSDVPRDLEVVAAX) <sub>n</sub> LLISW(X) <sub>n</sub> YYRITY(X) <sub>w</sub> FTV(X) <sub>x</sub> A TISGL(X) <sub>y</sub> YTTITVYAV(X) <sub>d</sub> ISINVRT
3	N-концевая лидерная последовательность	MGVSDVPRDL
4	N-концевая лидерная последовательность	GVSDVPRDL
5	N-концевая лидерная последовательность	X <sub>n</sub> SDVPRDL
6	N-концевая лидерная последовательность	X <sub>n</sub> DVPRDL
7	N-концевая лидерная последовательность	X <sub>n</sub> VPRDL
8	N-концевая лидерная последовательность	X <sub>n</sub> PRDL

9	N-концевая лидерная последовательность	X <sub>n</sub> RDL
10	N-концевая лидерная последовательность	X <sub>n</sub> DL
11	N-концевая лидерная последовательность	MASTSG
12	C-концевая хвостовая последовательность	EIEK
13	C-концевая хвостовая последовательность	EGSGC
14	C-концевая хвостовая последовательность	EIEKPCQ
15	C-концевая хвостовая последовательность	EIEKPSQ
16	C-концевая хвостовая последовательность	EIEKP
17	C-концевая хвостовая последовательность	EIEKPS
18	C-концевая хвостовая последовательность	EIEKPC

19	С-концевая хвостовая последовательность	EIDK
20	С-концевая хвостовая последовательность	EIDKPCQ
21	С-концевая хвостовая последовательность	EIDKPSQ
22	6X His-хвостовая метка	HHHHHH
23	Аднектин PKE2 2270_C01 (аминокислотная последовательность)	MASTSGVPRDLEVVAAT <u>PTS</u> LLISWDAPAVTVRYRITY <u>GWQVQMYSDWGPLYIYKEFTV</u> PGSKSTATISGLKPGVD YTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEGDKPSQHNNHHHH
24	Аднектин PKE2 2629_A09 (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAAT <u>PTS</u> LLISWDAPAVTVRYRITY <u>G</u> <u>RHVQIYSDLGPLYIYTEFTV</u> PGSKSTATISGLKPGVDYIT VYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQHNNHHHH
25	Аднектин PKE2 2629_A11 (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAAT <u>PTS</u> LLISWDAPAVTVRYRITY <u>G</u> <u>RHVHIYSDWGPMYIYTEFTV</u> PGSKSTATISGLKPGVDYTI TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQHNNHHHH
26	Аднектин PKE2 2629_C10 (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAAT <u>PTS</u> LLISWDAPAVTVRYRITY <u>G</u> <u>REVQKYSVLGPLYIYTEFTV</u> PGSKSTATISGLKPGVDYTI TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQHNNHHHH
27	Аднектин PKE2 2629_D09 (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAAT <u>PTS</u> LLISWDAPAVTVRYRITY <u>G</u> <u>REVQMYSDLGPLYVYSEFTV</u> PGSKSTATISGLKPGVDYTI TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQHNNHHHH

28	Аднектин ПКЕ2 2629_E05 (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>REVQKFS</u> DWGPLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQHNNHHH
29	Аднектин ПКЕ2 2629_E06 (аминокислотная последовательность) (также называемый АТИ-1490)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>REVQKYSD</u> LGPLYIQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQHNNHHH
30	Аднектин ПКЕ2 2629_F04 (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>REHVQYSD</u> WGPMYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYT ITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQHNNHHH
31	Аднектин ПКЕ2 2629_H01 (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVXYRITYG <u>REVHKNSD</u> WGTLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI TVXAVTGSGEXPASSKPISINYRTEIDKXSQHNNHHH
32	Аднектин ПКЕ2 2629_H06 (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>REVQKYSD</u> LGPLYIAEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQHNNHHH
33	Аднектин ПКЕ2 2629_H07 (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>REVHLYSD</u> WGPMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQHNNHHH
34	Аднектин ПКЕ2 2630_A02 (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>RHVQMYSD</u> LGPLYIFSEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQHNNHHH
35	Аднектин ПКЕ2 2630_A11 (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>REVHMYSDF</u> GPMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQHNNHHH

36	Аднектин ПКЕ2 2630_D02 (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>REVQKYSDWGPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI</u> TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQHNNHHH
37	Аднектин ПКЕ2 2630_D10 (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>REVQMYSDLGPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI</u> TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQHNNHHH
38	Аднектин ПКЕ2 2630_F04 (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>REVQMYSDLGPLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVGYTI</u> TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQHNNHHH
39	Аднектин ПКЕ2 2630_G03 (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>RHVQIYSDLGPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI</u> VYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQHNNHHH
40	Аднектин ПКЕ2 2630_G10 (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>REVQIYSDWGPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI</u> TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQHNNHHH
41	Аднектин ПКЕ2 2630_H03 (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATXTSLISWDAPAVTVXYRITY <u>GREVQKYSDWGPLYIYQEFVPGSXSTATISGLKPGVDY</u> TITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKXSQHNNHHH
42	Аднектин ПКЕ2 2631_B04 (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDVPAVTVRYRITYG <u>RHVHLYSEFGPMYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI</u> TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQHNNHHH
43	Аднектин ПКЕ2 2631_E03 (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>RDVHMYSDWGPMYIYQEFVPGSKSTATISGLKPGVDY</u> TITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQHNNHHH

44	Аднектин ПKE2 2631_G01 (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>RHVQIYSDWGPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI</u> TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQHNNHHH
45	Аднектин ПKE2 2631_G03 (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>RYVQLYSDWGPMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYT</u> ITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQHNNHHH
46	Аднектин ПKE2 2631_H09 (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>RQVQVFDLGPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI</u> TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQHNNHHH
47	Аднектин ПKE2 2632_G01 (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>RQVQIYSDWGPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI</u> TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQHNNHHH
48	Аднектин ПKE2 4079_A04 (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>RQVQMYSDWGPLYIYAEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYT</u> ITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQHNNHHH
49	2270_C01 без HIS- метки (аминокислотная последовательность)	MASTSGVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GWVQMYSDWGPLYIYKEFTVPGSKSTATISGLKPGVD</u> YTITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEGDKPSQ
50	2629_A09 без HIS- метки (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>RHVQIYSDLGPLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI</u> VYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQ
51	2629_A11 без HIS- метки (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>RHVHIYSDWGPMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI</u> TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQ

52	2629_C10 без HIS-метки (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>REVQKYSVLGPLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI</u> TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQ
53	2629_D09 без HIS-метки (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>REVQMYSDLGPLYVYSEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI</u> TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQ
54	2629_E05 без HIS-метки (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>REVQKFSDWGPLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI</u> TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQ
55	2629_E06 без HIS-метки (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>REVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI</u> TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQ
56	2629_F04 без HIS-метки (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>REVVHQYSDWGPYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI</u> ITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQ
57	2629_H01 без HIS-метки (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVXYRITYG <u>REVVHKNSDWGTLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI</u> TVXAVTGSGEXPASSKPISINYRTEIDKXSQ
58	2629_H06 без HIS-метки (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>REVQKYSDLGPLYIYAEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI</u> TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQ
59	2629_H07 без HIS-метки (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>REVHLYSDWGPYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI</u> TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQ

60	2630_A02 без HIS-метки (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYG <u>RHVQMYSDLGPLYIFSEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI</u> TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQ
61	2630_A11 без HIS-метки (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYG <u>REVHMYSDFGPMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI</u> TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQ
62	2630_D02 без HIS-метки (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYG <u>REVQKYSDWGPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI</u> TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQ
63	2630_D10 без HIS-метки (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYG <u>REVQMYSDLGPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI</u> TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQ
64	2630_F04 без HIS-метки (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYG <u>REVQMYSDLGPLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVGYTI</u> TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQ
65	2630_G03 без HIS-метки (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYG <u>RHVQIYSDLGPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI</u> VYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQ
66	2630_G10 без HIS-метки (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYG <u>REVQIYSDWGPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI</u> TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQ
67	2630_H03 без HIS-метки (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATXTSLLISWDAPAVTVXYRITY <u>GREVQKYSDWGPLYIYOEFVPGSXSTATISGLKPGVDY</u> TITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKXSQ

68	2631_B04 без HIS-метки (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDVPAVTVRYRITYG <u>RHVHLYSEFGPMYIYNE</u> EFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQ
69	2631_E03 без HIS-метки (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>RDVHMYSDWGPMYIQE</u> FTVPGSKSTATISGLKPGVDY TITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQ
70	2631_G01 без HIS-метки (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>RHVQIYSDWGPLYIYNE</u> FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQ
71	2631_G03 без HIS-метки (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>RYVQLYSDWGPMYIYE</u> FTVPGSKSTATISGLKPGVDYT ITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQ
72	2631_H09 без HIS-метки (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>RQVQVFSDLGPLYIYNE</u> FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQ
73	2632_G01 без HIS-метки (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>RQVQIYSDWGPLYIYNE</u> FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQ
74	4079_A04 без HIS-метки (аминокислотная последовательность)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>RQVQMYSDWGPLYIYAE</u> FTVPGSKSTATISGLKPGVDYT ITVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQ
75	2270_C01, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность)	EVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYG <u>WQVQMYSDW</u> <u>GPLYIYKE</u> FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI TVYAVTGSGESPASSKPISINYRT

76	2629_A09, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность)	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITY <u>GRHVQIYSDLG</u> <u>PLYIYTE</u> FVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSSES PASSKPISINYRT
77	2629_A11, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность)	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITY <u>GRHVHIYSDWG</u> <u>PMYIYTE</u> FVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSSE SPASSKPISINYRT
78	2629_C10, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность)	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQKYSVLG</u> <u>PLYIYTE</u> FVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSSES PASSKPISINYRT
79	2629_D09, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность)	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQMYSDLG</u> <u>PLYVYSE</u> FVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSSE SPASSKPISINYRT
80	2629_E05, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность)	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQKFSDWG</u> <u>PLYIYTE</u> FVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSSES PASSKPISINYRT
81	2629_E06, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность)	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQKYSDLG</u> <u>PLYIYQE</u> FVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSSE SPASSKPISINYRT
82	2629_F04, сердцевинная последовательность	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVHQYSDW</u> <u>GPMYIYNE</u> FVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSG ESPASSKPISINYRT

	(аминокислотная последовательность)	
83	2629_H01, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность)	EVVAATPTSLISWDAPAVTVXYRITY <u>GREVHKNSDW</u> <u>GTLYIYTE</u> FVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVXAVTGSG EXPASSKPISINYRT
84	2629_H06, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность)	EVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQKYSDLG</u> <u>PLYIYAE</u> FVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGE SPASSKPISINYRT
85	2629_H07, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность)	EVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVHLYSDW</u> <u>GPMYIYTE</u> FVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSG ESPASSKPISINYRT
86	2630_A02, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность)	EVVATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGRHVQMYSDLG <u>PLYIESE</u> FVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGES PASSKPISINYRT
87	2630_A11, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность)	EVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVHMYSDFG</u> <u>PMYIYTE</u> FVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGE SPASSKPISINYRT
88	2630_D02, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность)	EVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQKYSDW</u> <u>GPLYIYNE</u> FVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSG ESPASSKPISINYRT

89	2630_D10, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность)	EVVAAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQMYSDLG</u> <u>PLYIYNE</u> FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGE SPASSKPISINYRT
90	2630_F04, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность)	EVVAAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQMYSDLG</u> <u>PLYIYTE</u> FTVPGSKSTATISGLKPGVGYTITVYAVTGSGES PASSKPISINYRT
91	2630_G03, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность)	EVVAAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITY <u>GRHVQIYSDLG</u> <u>PLYIYNE</u> FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGE SPASSKPISINYRT
92	2630_G10, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность)	EVVAAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQIYSDWG</u> <u>PLYIYNE</u> FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGE SPASSKPISINYRT
93	2630_H03, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность)	EVVAAATXTSLGISWDAPAVTVXYRITY <u>GREVQKYSDW</u> <u>GPLYIQE</u> FTVPGSXSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSG ESPASSKPISINYRT
94	2631_B04, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность)	EVVAAATPTSLGISWDVPAVTVRYRITY <u>GRHVHLYSEFG</u> <u>PMYIYNE</u> FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGE SPASSKPISINYRT
95	2631_E03, сердцевинная последовательность	EVVAAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITY <u>GRDVHMYSDW</u> <u>GPMYIQE</u> FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSG ESPASSKPISINYRT

	(аминокислотная последовательность)	
96	2631_G01, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность)	EVVAATPTSLISWDAPAVTVRYYRITY <u>GRHVQIYSDWG</u> <u>PLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGE</u> SPASSKPISINYRT
97	2631_G03, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность)	EVVAATPTSLISWDAPAVTVRYYRITY <u>GRYVQLYSDW</u> <u>GPMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGS</u> ESPASSKPISINYRT
98	2631_H09, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность)	EVVAATPTSLISWDAPAVTVRYYRITY <u>GRQVQVFSDLG</u> <u>PLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGE</u> SPASSKPISINYRT
99	2632_G01, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность)	EVVAATPTSLISWDAPAVTVRYYRITY <u>GRQVQIYSDWG</u> <u>PLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGE</u> SPASSKPISINYRT
100	4079_A04, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность)	EVVAATPTSLISWDAPAVTVRYYRITY <u>GROVQMYSDW</u> <u>GPLYIYAEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGS</u> ESPASSKPISINYRT
101	2629_A09, петля CD	GRHVQIYSDLGPLYIYTE
102	2629_A11, петля CD	GRHVHIYSDWGPMYIYTE
103	2629_C10, петля CD	GREVQKYSVLGPLYIYTE
104	2629_D09, петля CD	GREVQMYSDLGPLYVYSE
105	2629_E05, петля CD	GREVQKFSWDGPLYIYTE
106	2629_E06, петля CD	GREVQKYSDLGPLYIYQE

107	2629_F04, петля CD	GREVHQYSDWGPMYIYNE
108	2629_H01, петля CD	GREVHKNSDWGTLIYITE
109	2629_H06, петля CD	GREVQKYSDLGPLYIYAE
110	2629_H07, петля CD	GREVHLYSDWGPMYIYTE
111	2630_A02, петля CD	GRHVQMYSDLGPLYIFSE
112	2630_A11, петля CD	GREVHMYSDFGPMYIYTE
113	2630_D02, петля CD	GREVQKYSDWGPLYIYNE
114	2630_D10, петля CD	GREVQMYSDLGPLYIYNE
115	2630_F04, петля CD	GREVQMYSDLGPLYIYTE
116	2630_G03, петля CD	GRHVQIYSDLGPLYIYNE
117	2630_G10, петля CD	GREVQIYSDWGPLYIYNE
118	2630_H03, петля CD	GREVQKYSDWGPLYIYQE
119	2631_B04, петля CD	GRHVHLYSEFGPMYIYNE
120	2631_E03, петля CD	GRDVHMYSDWGPMYIYQE
121	2631_G01, петля CD	GRHVQIYSDWGPLYIYNE
122	2631_G03, петля CD	GRYVQLYSDWGPMYIYTE
123	2631_H09, петля CD	GRQVQVFSDLGPLYIYNE
124	2632_G01, петля CD	GRQVQIYSDWGPLYIYNE
125	4079_A04, петля CD	GRQVQMYSDWGPLYIYAE
126	2270_C01 (последовательность нуклеиновой кислоты)	ATGGCTAGCACTAGTGGCGTGCCGCGCGACTTGGGAAG TGGTTGCCGCGACCCCGACGTCTCTGCTTATTAGCTGG GATGCACCTGCCGTCACAGTGAGATATTATCGCATTAC ATATGGTTGGCAGGTTCAGATGTACTCTGACTGGGGTC CGCTGTACATCTACAAAGAGTTCACGGTACCTGGGAG CAAGTCCACAGCTACCATCAGCGGTCTCAAACCTGGA GTTGATTACACCATTACGGTATACGCAGTCACCGGCTC TGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATT AATTATCGGACCGAAGGCGACAAACCATCCCAGCACC ATCACCACCACCACTGA

127	2629_A09 (последовательность нуклеиновой кислоты)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGG TTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGAT GCACCTGCCGTCACAGTGGGATATTACCGCATCACTTA CGGACGGCATGTTTCAGATCTATTCTGACTTAGGCCCGC TGTACATCTACACAGAGTTCACTGTGCCTGGGAGCAA GTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTT GATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGG AGAGAGCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAAT TACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATC ACCACCACCACTGA
128	2629_A11 (последовательность нуклеиновой кислоты)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGG TTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGAT GCACCTGCCGTCACAGTGGGATATTACCGCATCACTTA CGGTAGACACGTTTCATATCTACTCAGACTGGGGTCCG ATGTACATCTACACAGAGTTCACTGTGCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGT TGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTG GAGAGAGCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
129	2629_C10 (последовательность нуклеиновой кислоты)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGG TTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGAT GCACCTGCCGTCACAGTGGGATATTACCGCATCACTTA CGGGAGAGAGGTTTCAGAAATACTCTGTCTTGGGTCCA CTGTACATATACACGGAGTTCACTGTGCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGT TGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTG GAGAGAGCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
130	2629_D09 (последовательность нуклеиновой кислоты)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGG TTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGAT GCACCTGCCGTCACAGTGGGATATTACCGCATCACTTA CGGGAGGGAGGTTTCAGATGTACTCTGACTTGGGTCCA

		TTGTACGTATACAGCGAGTTCACCTGTGCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGT TGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTG GAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
131	2629_E05 (последовательность нуклеиновой кислоты)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGG TTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGAT GCACCTGCCGTCACAGTGCATATTACCGCATCACTTA CGGTCCGGAGGTACAGAAGTTCTCGGACTGGGGTCCG CTGTACATCTACACAGAGTTCACCTGTGCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGT TGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTG GAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
132	2629_E06 (последовательность нуклеиновой кислоты)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGG TTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGAT GCACCTGCCGTCACAGTGCATATTACCGCATCACTTA CGGCAGGGAGGTTCAGAAGTACTCGGACTTGGGTCCG TTGTACATCTACCAAGAGTTCACCTGTGCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGT TGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTG GAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
133	2629_F04 (последовательность нуклеиновой кислоты)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGG TTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGAT GCACCTGCCGTCACAGTGCATATTACCGCATCACTTA CGGTAGGGAGGTTCATCAATACTCTGACTGGGGTCCG ATGTACATCTACAACGAGTTCACCTGTGCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGT TGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTG GAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAA

		TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
134	2629_H01 (последовательность нуклеиновой кислоты)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGG TTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGAT GCACCTGCCGTACAGTGCRATATTACCGCATCACTTA CGGTCGGGAGGTTTCATAAGAAGCTCAGACTGGGGTACG CTGTACATCTACACAGAGTTCACTGTGCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGT TGATTATACCATCACTGTGTRTGCTGCTACTGGCTCTG GAGAGARCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAAMCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
135	2629_H06 (последовательность нуклеиновой кислоты)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGG TTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGAT GCACCTGCCGTACAGTGCGATATTACCGCATCACTTA CGGACGGGAGGTTTCAGAAAGTATTCAGACTTGGGTCCA CTGTACATCTACGCAGAGTTCACTGTGCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGT TGATTATACCATCACTGTGTATGCTGCTACTGGCTCTG GAGAGAGCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
136	2629_H07 (последовательность нуклеиновой кислоты)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGG TTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGAT GCACCTGCCGTACAGTGCGATATTACCGCATCACTTA CGGGCGGGAGGTCCACCTGTACTCCGACTGGGGGCCG ATGTACATCTACACAGAGTTCACTGTGCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGT TGATTATACCATCACTGTGTATGCTGCTACTGGCTCTG GAGAGAGCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA

137	2630_A02 (последовательность нуклеиновой кислоты)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGG TTGCTACCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGAT GCACCTGCCGTCACAGTGGGATATTACCGCATCACTTA CGGTAGGCACGTTCAAATGTACTCTGACCTGGTCCGT TGTACATCTCAGTGAGTTCAGTGTGCCTGGGAGCAAG TCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTG ATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGA GAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAAT ACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATCA CCACCACCACTGA
138	2630_A11 (последовательность нуклеиновой кислоты)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGG TTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGAT GCACCTGCCGTCACAGTGGGATATTACCGCATCACTTA CGGACGGGAGGTTTCATATGTACTCTGACTTCGGTCCG ATGTACATATACACAGAGTTCAGTGTGCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGT TGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTG GAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
139	2630_D02 (последовательность нуклеиновой кислоты)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGG TTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGAT GCACCTGCCGTCACAGTGGGATATTACCGCATCACTTA CGGTAGAGAAAGTTCAGAAATACTCTGACTGGGGCCCG CTCTACATCTACAATGAGTTCAGTGTGCCTGGGAGCAA GTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTT GATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGG AGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAAT TACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATC ACCACCACCACTGA
140	2630_D10 (последовательность нуклеиновой кислоты)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGG TTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGAT GCACCTGCCGTCACAGTGGGATATTACCGCATCACTTA CGGTCCGGGAGGTTTCAGATGTACTCGGACTGGGTCCG

		CTCTACATCTACAACGAGTTCACCTGTGCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGT TGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTG GAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
141	2630_F04 (последовательность нуклеиновой кислоты)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGG TTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGAT GCACCTGCCGTCACAGTGGGATATTACCGCATCACTTA CGGTAGAGAGGTCCAGATGTACTCAGACTTGGGGCCG CTGTACATCTATACAGAGTTCACCTGTGCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGT TGTTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTG GAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
142	2630_G03 (последовательность нуклеиновой кислоты)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGG TTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGAT GCACCTGCCGTCACAGTGGGATATTACCGCATCACTTA CGGACGGCATGTTCCAGATCTACTCCGACTTGGGTCTC TGTATATCTACAATGAGTTCACCTGTGCCTGGGAGCAA GTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTT GATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGG AGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAA TACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATC ACCACCACCACTGA
143	2630_G10 (последовательность нуклеиновой кислоты)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGG TTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGAT GCACCTGCCGTCACAGTGGGATATTACCGCATCACTTA CGGTTCGGGAGGTTCAAATATACTCTGACTGGGGTCCG CTGTATATATACAACGAGTTCACCTGTGCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGT TGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTG GAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAA

		TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
144	2630_H03 (последовательность нуклеиновой кислоты)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGG TTGCTGCCACCSCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGAT GCACCTGCCGTCACAGTGC SATATTACCGCATCACTTA CGGACGTGAAGTRCAGAAATACTCTGACTGGGGCCCG CTGTACATCTACCAAGAGTTCACTGTGCCTGGGAGCR AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGT TGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTG GAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAAMCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
145	2631_B04 (последовательность нуклеиновой кислоты)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGG TTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGAT GTACCTGCCGTTACAGTGC GATATTACCGCATCACTTA CGGCAGGCACGTACATTTGTA CTGGAGTTCGGTCCG ATGTATATCTACAACGAGTTC ACTGTGCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGT TGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTG GAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
146	2631_E03 (последовательность нуклеиновой кислоты)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGG TTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGAT GCACCTGCCGTCACAGTGC GATATTACCGCATCACTTA CGGTAGGGATGTCCACATGTACTCTGACTGGGGTCCG ATGTACATATACCAAGAGTTC ACTGTGCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGT TGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTG GAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA

147	2631_G01 (последовательность нуклеиновой кислоты)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGG TTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGAT GCACCTGCCGTCACAGTGGGATATTACCGCATCACTTA CGGTAGGCATGTTTCAGATATACTCGGACTGGGGTCCG CTGTACATCTACAATGAGTTCACTGTGCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGT TGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTG GAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACACTGA
148	2631_G03 (последовательность нуклеиновой кислоты)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGG TTGCTGCCACCCACCAGCCTACTGATCAGCTGGGAT GCACCTGCCGTCACAGTGGGATATTACCGCATCACTTA CGGAAGGTATGTTTCAGCTATACTCTGACTGGGGTCCG ATGTACATCTACACGGAGTTCACTGTGCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGT TGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTG GAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACACTGA
149	2631_H09 (последовательность нуклеиновой кислоты)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGG TTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGAT GCACCTGCCGTCACAGTGGGATATTACCGCATCACTTA CGGACGGCAAGTGCAAGTGTCTCAGACTTGGGTCCG CTGTACATATAACAACGAGTTCACTGTGCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGT TGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTG GAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACACTGA
150	2632_G01 (последовательность нуклеиновой кислоты)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGG TTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGAT GCACCTGCCGTCACAGTGGGATATTACCGCATCACTTA CGGTAGACAGGTGCAGATCTACTCTGACTGGGGACCG

		CTGTACATCTACAATGAGTTCACCTGTGCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGT TGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTG GAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAA TTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCAT CACCACCACCACTGA
151	4079_A04 (последовательность нуклеиновой кислоты)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCACCTGGAAGTGG TTGCTGCCACCCCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGAT GCACCTGCCGTCACAGTGGGATATTACCGCATCACTTA CGGTAGGCAGGTACAGATGTACTCTGACTGGGGTCCA CTTTACATCTACGCCGAGTTCACTGTGCCTGGGAGCAA GTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTT GATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGG AGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAA TACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCCAGCACCATC ACCACCACCACTGA
152	Линкер	PSTPPTPSPSTPPTPSPS
153	Линкер	GSGSGSGSGSGS
154	Линкер	GGSGSGSGSGS
155	Линкер	GGSGSGSGSGSGS
156	Линкер	GSEGSEGSEGSE
157	Линкер	GGSEGGSE
158	Линкер	GSGSGSGS
159	Линкер	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
160	Линкер	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS
161	Линкер	GGGGSGGGSGGGSG
162	Линкер	GPGPGPG
163	Линкер	GPGPGPGPG
164	Линкер	PAPAPA
165	Линкер	PAPAPAPAPA
166	Линкер	PAPAPAPAPAPAPA

167	PCSK9 <sup>10</sup> Fn3 домен	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAEGYGYRITYG ETGGNSPVQEFTVPVSKGTATISGLKPGVDYTITVYAVEF DFPGAGYYHRPISINYRT
168	Тандемный аднектин PCSK9-PKE2 без HIS- метки 5190_E01 (АТИ-1676)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAEGYGYRITYG ETGGNSPVQEFTVPVSKGTATISGLKPGVDYTITVYAVEF DFPGAGYYHRPISINYRTEPSTPPTPSPSTPPTPSPSGVSDV PRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKY SDLGPLYIQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVT GSGESPASSKPISINYRTP
169	Тандемный аднектин PCSK9-PKE2 с HIS- меткой 4472_C06 (АТИ-1574)	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAEGYGYRITYG ETGGNSPVQEFTVPVSKGTATISGLKPGVDYTITVYAVEF DFPGAGYYHRPISINYRTEPSTPPTPSPSTPPTPSPSGVSDV PRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKY SDLGPLYIQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVT GSGESPASSKPISINYRTEHHHHHH
170	Консенсусная последовательность петли CD	G-X <sub>1</sub> -X <sub>2</sub> -V-X <sub>3</sub> -X <sub>4</sub> -X <sub>5</sub> -S-X <sub>6</sub> -X <sub>7</sub> -G-X <sub>8</sub> -X <sub>9</sub> -Y-X <sub>10</sub> -X <sub>11</sub> -X <sub>12</sub> -E
171	3852_F10	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGG TTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGAC GCTCCGGCTGTTGACGGTCGATATTACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTC ACTGTGCCTGGTTCTAAATCTACAGCTACCATCAGCGG CCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATG CTGTCACTCCGTACGAATTCCATTCCCCTACACTCAT TACTCTTCTAAACCAATTCCATTAATTACCGCACAGA AATTGACAAACCATCCAGCACCATCACCACCACCAC TGA
172	Последовательность нуклеиновой кислоты тандемного аднектина PCSK9-PKE2 5190_E01 (АТИ-1676)	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCGACCTGGAAGTGG TTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGAC GCTCCGGCTGAAGGTTACGGTTATTACCGCATCACTTA CGGCGAAACAGGAGGCAATAGCCCTGTCCAGGAGTTC ACTGTGCCTGTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGG CCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATG

		CTGTGGAATTCTGACTTCCCCGGCGCCGGTACTACCAT CGTCCAATTTCCATTAATTACCGACCGAACCGAGCA CACCTCCGACCCCGAGTCCGTCAACACCACCGACACC GTCACCGAGCGGAGTTTCTGACGTCCCGCGGACCTG GAAGTGGTTGCTGCCACCCCAACCAGCCTGCTGATCA GCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTGCGATATTACCG CATCACTTACGGCAGGGAGGTTTCAGAAGTACTCGGAC TTGGGTCCGTTGTACATCTACCAAGAGTTCCTGTGCC TGGGAGCAAGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAA CCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTAC TGGCTCTGGAGAGAGCCCCGCAAGCAGCAAGCCAATT TCCATTAATTACCGCACACCGTGA
173	Линкер	PSPEPPTPEP
174	Линкер	PSPEPPTPEPPSPEPPTPEP
175	Линкер	PSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEP
176	Линкер	PSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEPPSPEPPTPEP
177	Линкер	EEEEDE
178	Линкер	EEEEDEEEEEDE
179	Линкер	EEEEDEEEEEDEEEEEDEEEEEDE
180	Линкер	EEEEDEEEEEDEEEEEDEEEEEDEEEEEDEEEEEDE
181	Линкер	RGGEEKKKEKEKEEQEERETKTP
182	Иллюстративное применение линкера	NYRTPGPSPEPPTPEP
183	Иллюстративное применение линкера	PSPEPPTPEPGVSDV
184	2270_C01, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность) с С-концевым пролином	<u>EVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGWQVQMYSDW</u> <u>GPLYIYKEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSG</u> ESPASSKPISINYRTP

185	2629_A09, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность) с С-концевым пролином	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYYRITY <u>GRHVQIYSDLG</u> <u>PLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDY</u> TITVYAVTGSGES PASSKPISINYRTP
186	2629_A11, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность) с С-концевым пролином	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYYRITY <u>GRHVHIYSDWG</u> <u>PMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDY</u> TITVYAVTGSGE SPASSKPISINYRTP
187	2629_C10, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность) с С-концевым пролином	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYYRITY <u>GREVQKYSVLG</u> <u>PLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDY</u> TITVYAVTGSGES PASSKPISINYRTP
188	2629_D09, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность) с С-концевым пролином	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYYRITY <u>GREVQMYSDLG</u> <u>PLYVYSEFTVPGSKSTATISGLKPGVDY</u> TITVYAVTGSGE SPASSKPISINYRTP
189	2629_E05, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность) с С-концевым пролином	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYYRITY <u>GREVQKFSDWG</u> <u>PLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDY</u> TITVYAVTGSGES PASSKPISINYRTP
190	2629_E06, сердцевинная последовательность	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYYRITY <u>GREVQKYSDLG</u> <u>PLYIQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDY</u> TITVYAVTGSGE SPASSKPISINYRTP

	(аминокислотная последовательность) с С-концевым пролином	
191	2629_F04, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность) с С-концевым пролином	EVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVHQYSDW</u> <u>GPMYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSG</u> ESPASSKPISINYRTP
192	2629_H01, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность) с С-концевым пролином	EVVAATPTSLISWDAPAVTVXYRITY <u>GREVHKNSDW</u> <u>GTLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVXAVTGSG</u> EXPASSKPISINYRTP
193	2629_H06, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность) с С-концевым пролином	EVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQKYSDLG</u> <u>PLYIYAEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGE</u> SPASSKPISINYRTP
194	2629_H07, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность) с С-концевым пролином	EVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVHLYSDW</u> <u>GPMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSG</u> ESPASSKPISINYRTP
195	2630_A02, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность) с С-концевым пролином	EVVATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GRHVQMYSDLG</u> <u>PLYIFSEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGES</u> PASSKPISINYRTP

196	2630_A11, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность) с С-концевым пролином	EVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVHMYSDFG</u> <u>PMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGE</u> SPASSKPISINYRTP
197	2630_D02, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность) с С-концевым пролином	EVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVOKYSDW</u> <u>GPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGE</u> ESPASSKPISINYRTP
198	2630_D10, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность) с С-концевым пролином	EVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQMYSDLG</u> <u>PLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGE</u> SPASSKPISINYRTP
199	2630_F04, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность) с С-концевым пролином	EVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQMYSDLG</u> <u>PLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVGYTITVYAVTGSGES</u> PASSKPISINYRTP
200	2630_G03, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность) с С-концевым пролином	EVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GRHVQIYSDLG</u> <u>PLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGE</u> SPASSKPISINYRTP
201	2630_G10, сердцевинная последовательность	EVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GREVQIYSDWG</u> <u>PLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGE</u> SPASSKPISINYRTP

	(аминокислотная последовательность) с С-концевым пролином	
202	2630_H03, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность) с С-концевым пролином	EVVAATXTSLISWDAPAVTVXYRITY <u>GREVQKYS</u> DW <u>GPLYIQE</u> FVPGSXSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSG ESPASSKPISINYRTP
203	2631_B04, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность) с С-концевым пролином	EVVAATPTSLISWDVPAVTVRYRITY <u>GRHVHLYSE</u> FG <u>PMYIYNE</u> FVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGE SPASSKPISINYRTP
204	2631_E03, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность) с С-концевым пролином	EVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GRDVHMY</u> SDW <u>GPMYIQE</u> FVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSG ESPASSKPISINYRTP
205	2631_G01, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность) с С-концевым пролином	EVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GRHVQIY</u> SDWG <u>PLYIYNE</u> FVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGE SPASSKPISINYRTP
206	2631_G03, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность) с С-концевым пролином	EVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY <u>GRYVQLY</u> SDW <u>GPMYIYTE</u> FVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSG ESPASSKPISINYRTP

207	2631_H09, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность) с С-концевым пролином	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITY <u>GRQVQV</u> FSDLG <u>PLYIYNE</u> FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGE SPASSKPISINYRTP
208	2632_G01, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность) с С-концевым пролином	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITY <u>GRQVQIY</u> SDWG <u>PLYIYNE</u> FTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGE SPASSKPISINYRTP
209	4079_A04, сердцевинная последовательность (аминокислотная последовательность) с С-концевым пролином	EVVAATPTSLGISWDAPAVTVRYRITY <u>GRQVQM</u> YSDW <u>GPLYIYA</u> EFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGS ESPASSKPISINYRTP
210	С-концевая хвостовая последовательность	EIEPKSS
211	С-концевая хвостовая последовательность	EIDKPC
212	С-концевая хвостовая последовательность	EIDKP
213	С-концевая хвостовая последовательность	EIDKPS

214	С-концевая хвостовая последовательность	EIDKPSQLE
215	С-концевая хвостовая последовательность	EIEDEDEDED
216	С-концевая хвостовая последовательность	EGSGS
217	С-концевая хвостовая последовательность	EIDKPCQLE
218	С-концевая хвостовая последовательность	EIDKPSQHHHHHH
219	С-концевая хвостовая последовательность	GSGCHHHHHH
220	С-концевая хвостовая последовательность	EGSGCHHHHHH
221	С-концевая хвостовая последовательность	PIDK
222	С-концевая хвостовая последовательность	PIEK
223	С-концевая хвостовая последовательность	PIDKP

224	С-концевая хвостовая последовательность	PIEKP
225	С-концевая хвостовая последовательность	PIDKPS
226	С-концевая хвостовая последовательность	PIEKPS
227	С-концевая хвостовая последовательность	PIDKPC
228	С-концевая хвостовая последовательность	PIEKPC
229	С-концевая хвостовая последовательность	PIDKPSQ
230	С-концевая хвостовая последовательность	PIEKPSQ
231	С-концевая хвостовая последовательность	PIDKPCQ
232	С-концевая хвостовая последовательность	PIEKPCQ
233	С-концевая хвостовая последовательность	PHHHHH

234	С-концевая хвостовая последовательность	РСНННННН
235	2270_C01 без HIS-метки и N-концевого метионина и с С-концевым пролином	ASTSGVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRYRITYG <u>WQVQMYSDWGPLYIYKEFTVPGSKSTATISGLKPGVDY</u> TITVYAVTGSSEPASSKPISINYRTEGDKPSQP
236	2629_A09 без HIS-метки и N-концевого метионина и с С-концевым пролином	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRYRITYGR <u>HVQIYSDLGPLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTIT</u> YAVTGSSEPASSKPISINYRTEIDKPSQP
237	2629_A11 без HIS-метки и N-концевого метионина и с С-концевым пролином	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRYRITYGR <u>HVHIYSDWGPMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTIT</u> VYAVTGSSEPASSKPISINYRTEIDKPSQP
238	2629_C10 без HIS-метки и N-концевого метионина и с С-концевым пролином	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRYRITYGR <u>EVQKYSVLGPLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTIT</u> VYAVTGSSEPASSKPISINYRTEIDKPSQP
239	2629_D09 без HIS-метки и N-концевого метионина и с С-концевым пролином	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRYRITYGR <u>EVQMYSDLGPLYVYSEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTIT</u> VYAVTGSSEPASSKPISINYRTEIDKPSQP
240	2629_E05 без HIS-метки и N-концевого метионина и с С-концевым пролином	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRYRITYGR <u>EVQKFSDWGPLYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTIT</u> VYAVTGSSEPASSKPISINYRTEIDKPSQP
241	2629_E06 без HIS-метки и N-концевого метионина и с С-концевым пролином	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRYRITYGR <u>EVQKYSDLGPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTIT</u> VYAVTGSSEPASSKPISINYRTEIDKPSQP

242	2629_F04 без HIS-метки и N-концевого метионина и с C-концевым пролином	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGR <u>EVHQYSDWGPMYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTI</u> TVYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQP
243	2629_H01 без HIS-метки и N-концевого метионина и с C-концевым пролином	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVXYRITYGR <u>EVHKNSDWGTLIYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTIT</u> VXAVTGSGEXPASSKPISINYRTEIDKXSQP
244	2629_H06 без HIS-метки и N-концевого метионина и с C-концевым пролином	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGR <u>EVQKYSDLGPLYIYAEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTIT</u> VYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQP
245	2629_H07 без HIS-метки и N-концевого метионина и с C-концевым пролином	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGR <u>EVHLYSDWGPMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTIT</u> VYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQP
246	2630_A02 без HIS-метки и N-концевого метионина и с C-концевым пролином	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGR <u>HVQMYSDLGPLYIFSEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTIT</u> VYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQP
247	2630_A11 без HIS-метки и N-концевого метионина и с C-концевым пролином	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGR <u>EVHMYSDFGPMYIYTEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTIT</u> VYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQP
248	2630_D02 без HIS-метки и N-концевого метионина и с C-концевым пролином	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGR <u>EVQKYSDWGPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTIT</u> VYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQP
249	2630_D10 без HIS-метки и N-концевого метионина и с C-концевым пролином	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGR <u>EVQMYSDLGPLYIYNEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTIT</u> VYAVTGSGESPASSKPISINYRTEIDKPSQP

250	2630_F04 без HIS-метки и N-концевого метионина и с C-концевым пролином	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITY <u>GR</u> <u>EVQMYSDLGPLYIYTE</u> FVPGSKSTATISGLKPGVGYTIT VYAVTGSSEPASSKPISINYRTEIDKPSQP
251	2630_G03 без HIS-метки и N-концевого метионина и с C-концевым пролином	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITY <u>GR</u> <u>HVQIYSDLGPLYIYNE</u> FVPGSKSTATISGLKPGVDYITIT YAVTGSSEPASSKPISINYRTEIDKPSQP
252	2630_G10 без HIS-метки и N-концевого метионина и с C-концевым пролином	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITY <u>GR</u> <u>EVQIYSDWGPLYIYNE</u> FVPGSKSTATISGLKPGVDYITIT VYAVTGSSEPASSKPISINYRTEIDKPSQP
253	2630_H03 без HIS-метки и N-концевого метионина и с C-концевым пролином	GVSDVPRDLEVVAATXTSLLISWDAPAVTVXYRITY <u>GR</u> <u>EVQKYSDWGPLYIYQE</u> FVPGSXSTATISGLKPGVDYITIT VYAVTGSSEPASSKPISINYRTEIDKXSQP
254	2631_B04 без HIS-метки и N-концевого метионина и с C-концевым пролином	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDVPAVTVRYRITY <u>GR</u> <u>HVHLYSEFGPMYIYNE</u> FVPGSKSTATISGLKPGVDYITIT VYAVTGSSEPASSKPISINYRTEIDKPSQP
255	2631_E03 без HIS-метки и N-концевого метионина и с C-концевым пролином	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITY <u>GR</u> <u>DVHMYSDWGPYIYQE</u> FVPGSKSTATISGLKPGVDYITI TVYAVTGSSEPASSKPISINYRTEIDKPSQP
256	2631_G01 без HIS-метки и N-концевого метионина и с C-концевым пролином	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITY <u>GR</u> <u>HVQIYSDWGPLYIYNE</u> FVPGSKSTATISGLKPGVDYITIT VYAVTGSSEPASSKPISINYRTEIDKPSQP
257	2631_G03 без HIS-метки и N-концевого метионина и с C-концевым пролином	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITY <u>GR</u> <u>YVQLYSDWGPYIYTE</u> FVPGSKSTATISGLKPGVDYITIT VYAVTGSSEPASSKPISINYRTEIDKPSQP
258	2631_H09 без HIS-метки и N-концевого метионина и с C-концевым пролином	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITY <u>GR</u> <u>QVQVFDLGPLYIYNE</u> FVPGSKSTATISGLKPGVDYITIT VYAVTGSSEPASSKPISINYRTEIDKPSQP
259	2632_G01 без HIS-метки и N-концевого метионина и с C-концевым пролином	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITY <u>GR</u> <u>QVQIYSDWGPLYIYNE</u> FVPGSKSTATISGLKPGVDYITIT VYAVTGSSEPASSKPISINYRTEIDKPSQP
260	4079_A04 без HIS-метки и N-концевого метионина и с C-концевым пролином	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITY <u>GR</u> <u>QVQMYSDWGPLYIYAE</u> FVPGSKSTATISGLKPGVDYITI TVYAVTGSSEPASSKPISINYRTEIDKPSQP
261	Тандемный аднектин PCSK9-ПКЕ2 без HIS-метки и N-концевого метионина 5190_E01 (ATI-1676)	GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAEGYGYRITYGE TGGNSPVQEFTVPVSKGTATISGLKPGVDYITITVYAVEFD FPGAGYYHRPISINYRTEPSTPPTPSPSTPPTPSPSGVSDVP RDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYS DLGPLYIYQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTG SGESPASSKPISINYRTP
262	Иллюстративный линкер	(PSPPEPTPEP) <sub>n</sub> n=1-10
263	Иллюстративный линкер	(EEEEDE) <sub>n</sub> E n=1-10

### Эквиваленты

Специалисты в настоящей области поймут, или смогут установить при помощи постановки всего лишь стандартного эксперимента, многие эквиваленты описанных в настоящем документе конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения. Подразумевают, что такие эквиваленты охватываются приведенной далее формулой изобретения.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, содержащий десятый домен фибронектина III типа ( $^{10}\text{Fn3}$ ), причем  $^{10}\text{Fn3}$  домен содержит:

а) петли AB, BC, CD, DE, EF и FG и содержит аминокислотную последовательность VSDVPRDLEVVAAX<sub>u</sub>LLISW(X)<sub>v</sub>YRITY(X)<sub>w</sub>FTV(X)<sub>x</sub>ATISGL(X)<sub>y</sub>YTITVYA(X)<sub>z</sub>ISINYRT (SEQ ID NO: 2), где петля AB представлена (X)<sub>u</sub>, петля BC представлена (X)<sub>v</sub>, петля CD представлена (X)<sub>w</sub>, петля DE представлена (X)<sub>x</sub>, петля EF представлена (X)<sub>y</sub> и петля FG представлена X<sub>z</sub>, X представляет собой любую аминокислоту, а нижние индексы u, v, w, x, y и z, каждый независимо, представляют собой число аминокислот в каждой петле;

б) где петля CD содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле G-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-V-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-S-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-G-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-Y-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub>-X<sub>12</sub>-E, где:

- (a) X<sub>1</sub> выбран из группы, состоящей из R или W;
- (b) X<sub>2</sub> выбран из группы, состоящей из H, E, D, Y или Q;
- (c) X<sub>3</sub> выбран из группы, состоящей из Q или H;
- (d) X<sub>4</sub> выбран из группы, состоящей из I, K, M, Q, L или V;
- (e) X<sub>5</sub> выбран из группы, состоящей из Y, F или N;
- (f) X<sub>6</sub> выбран из группы, состоящей из D, V или E;
- (g) X<sub>7</sub> выбран из группы, состоящей из L, W или F;
- (h) X<sub>8</sub> выбран из группы, состоящей из P или T;
- (i) X<sub>9</sub> выбран из группы, состоящей из L или M;
- (j) X<sub>10</sub> выбран из группы, состоящей из I или V;
- (k) X<sub>11</sub> выбран из группы, состоящей из Y или F; и
- (l) X<sub>12</sub> выбран из группы, состоящей из T, S, Q, N или A;

с) причем полипептид связывается с сывороточным альбумином человека с K<sub>D</sub> менее 500 нМ, и

д) причем  $^{10}\text{Fn3}$  домен дополнительно связывается с одним или несколькими из сывороточного альбумина макака-резус, сывороточного альбумина яванского макака, сывороточного альбумина мыши и сывороточного альбумина крысы с K<sub>D</sub> менее 500 нМ, например менее 100 нМ или менее 10 нМ.

2. Полипептид по п.1, причем  $^{10}\text{Fn3}$  домен связывается с:

- а) сывороточным альбумином макака-резус и сывороточным альбумином яванского макака,
- б) сывороточным альбумином мыши и сывороточным альбумином крысы или
- с) сывороточным альбумином макака-резус, сывороточным альбумином яванского макака, сывороточным альбумином мыши и сывороточным альбумином крысы.

3. Полипептид по любому из предыдущих пунктов, причем  $^{10}\text{Fn3}$  домен связывает сывороточный альбумин в диапазоне pH от 5,5 до 7,4.

4. Полипептид по любому из предыдущих пунктов, причем  $^{10}\text{Fn3}$  домен связывается с доменом I-II HSA.

5. Полипептид по п.1, причем петля CD  $^{10}\text{Fn3}$  домена содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 101-125.

6. Полипептид по п.5, причем петля CD  $^{10}\text{Fn3}$  домена содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 106.

7. Полипептид по п.5, причем петля CD  $^{10}\text{Fn3}$  домена содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 113.

8. Полипептид по любому из предыдущих пунктов, причем  $^{10}\text{Fn3}$  домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-100, 184-209 и 235-260.

9. Полипептид по п.8, где  $^{10}\text{Fn3}$  домен содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 81.

10. Полипептид по п.8, где  $^{10}\text{Fn3}$  домен содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 88.

11. Гибридный полипептид, содержащий первый ( $^{10}\text{Fn3}$ ) десятый домен фибронектина III типа и гетерологичный белок, содержащий второй домен  $^{10}\text{Fn3}$ , причем первый  $^{10}\text{Fn3}$  домен содержит:

а) петли AB, BC, CD, DE, EF и FG и содержит аминокислотную последовательность VSDVPRDLEVVAAX<sub>u</sub>LLISW(X)<sub>v</sub>YRITY(X)<sub>w</sub>FTV(X)<sub>x</sub>ATISGL(X)<sub>y</sub>YTITVYA(X)<sub>z</sub>ISINYRT (SEQ ID NO: 2), где петля AB представлена (X)<sub>u</sub>, петля BC представлена (X)<sub>v</sub>, петля CD представлена (X)<sub>w</sub>, петля DE представлена (X)<sub>x</sub>, петля EF представлена (X)<sub>y</sub> и петля FG представлена X<sub>z</sub>, X представляет собой любую аминокислоту, а нижние индексы u, v, w, x, y и z, каждый независимо, представляют собой число аминокислот в каждой петле;

кислот в каждой петле;

b) где петля CD содержит аминокислотную последовательность, соответствующую формуле G-X<sub>1</sub>-X<sub>2</sub>-V-X<sub>3</sub>-X<sub>4</sub>-X<sub>5</sub>-S-X<sub>6</sub>-X<sub>7</sub>-G-X<sub>8</sub>-X<sub>9</sub>-Y-X<sub>10</sub>-X<sub>11</sub>-X<sub>12</sub>-E, где:

- (a) X<sub>1</sub> выбран из группы, состоящей из R или W;
- (b) X<sub>2</sub> выбран из группы, состоящей из H, E, D, Y или Q;
- (c) X<sub>3</sub> выбран из группы, состоящей из Q или H;
- (d) X<sub>4</sub> выбран из группы, состоящей из I, K, M, Q, L или V;
- (e) X<sub>5</sub> выбран из группы, состоящей из Y, F или N;
- (f) X<sub>6</sub> выбран из группы, состоящей из D, V или E;
- (g) X<sub>7</sub> выбран из группы, состоящей из L, W или F;
- (h) X<sub>8</sub> выбран из группы, состоящей из P или T;
- (i) X<sub>9</sub> выбран из группы, состоящей из L или M;
- (j) X<sub>10</sub> выбран из группы, состоящей из I или V;
- (k) X<sub>11</sub> выбран из группы, состоящей из Y или F; и
- (l) X<sub>12</sub> выбран из группы, состоящей из T, S, Q, N или A;

причем полипептид связывается с сывороточным альбумином человека с K<sub>D</sub> менее 500 нМ и дополнительно связывается с одним или несколькими из сывороточного альбумина макака-резус, сывороточного альбумина яванского макака, сывороточного альбумина мыши и сывороточного альбумина крысы с K<sub>D</sub> менее 500 нМ, например менее 100 нМ или менее 10 нМ.

12. Гибридный полипептид по п.11, причем петля CD первого <sup>10</sup>Fn3 домена содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 101-125.

13. Гибридный полипептид по п.11 или 12, причем второй <sup>10</sup>Fn3 домен связывается с целевым белком, отличным от сывороточного альбумина.

14. Гибридный полипептид по любому из пп.11-13, причем первый <sup>10</sup>Fn3 домен содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-100, 184-209 и 235-260.

15. Гибридный полипептид по любому из пп.11-14, причем первый <sup>10</sup>Fn3 домен содержит аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 81 или SEQ ID NO: 88.

16. Гибридный полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 23-100, 168-169, 184-209 и 235-261, где полипептид связывается с сывороточным альбумином человека.

17. Композиция, содержащая полипептид по любому из предыдущих пунктов и носитель, где полипептид связывается с сывороточным альбумином человека.

18. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая полипептид по любому из пп.1-16.

19. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.18, причем молекула нуклеиновой кислоты имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 126-151 и 172, или последовательность, которая по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентична ей.

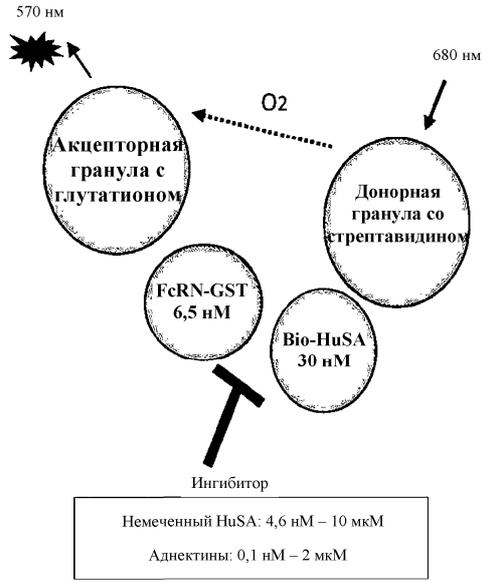
20. Вектор экспрессии, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид по любому из пп.1-16.

21. Клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты по п.18 или 19 или вектор экспрессии по п.20.

22. Способ получения полипептидов по любому из пп.1-16, предусматривающий культивирование клетки по п.21 в условиях, подходящих для экспрессии полипептида, и очистку полипептида.

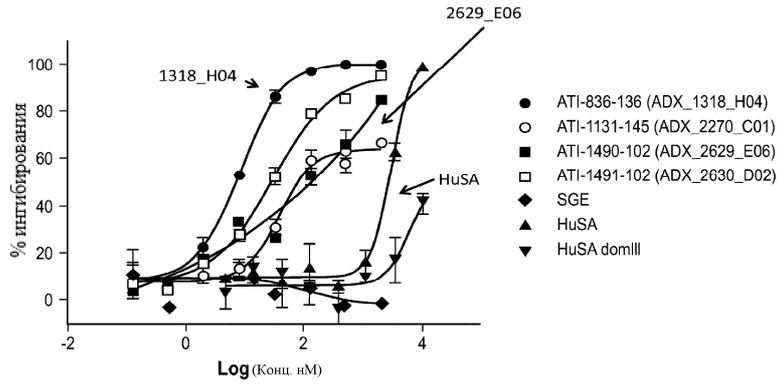
Конкурентный формат анализа

Alphascreen

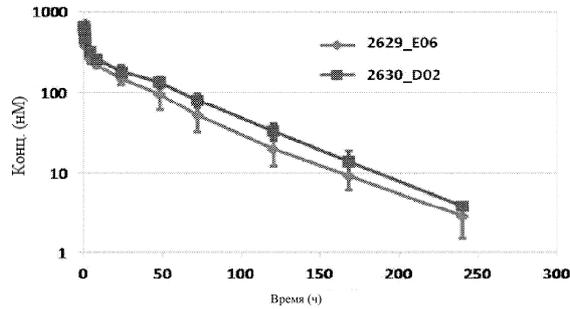


Фиг. 1

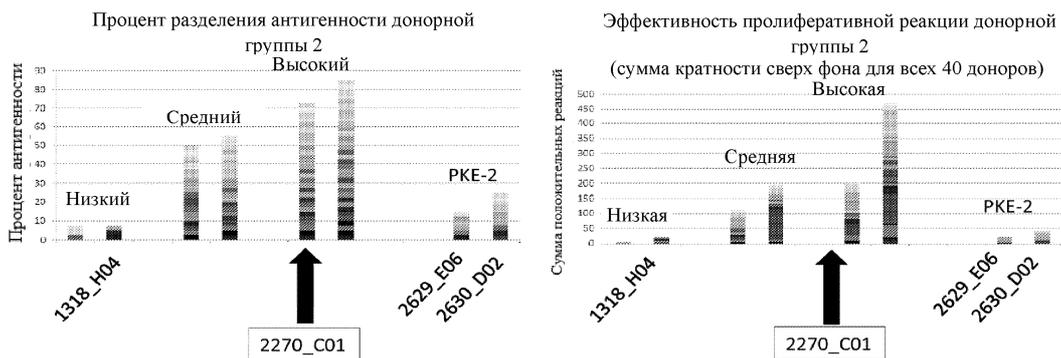
Конкурирование с hFcRn за связывание HSA



Фиг. 2



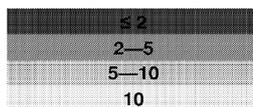
Фиг. 3



Фиг. 4

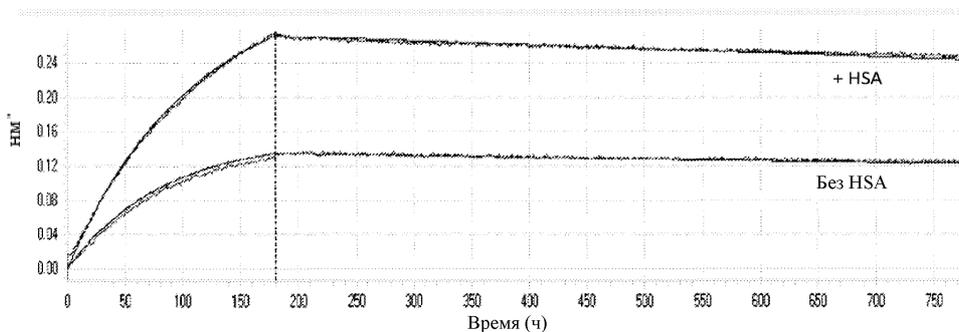
Адректин		2987_H07 (myo)		2013_E01 (PCSK9)	
РКЕ	HSA EC <sub>50</sub> (нМ)	X-РКЕ	РКЕ-X	X-РКЕ	РКЕ-X
1318_H04	5	31% (8/26)	0% (0/26)	31% (8/26)	X
2629_E06	20	30% (3/10)	80% (8/10)	90% (9/10)	80% (8/10)
2630_D02	9	20% (2/10)	60% (6/10)	50% (5/10)	80% (8/10)

HSA EC<sub>50</sub> тандем / EC<sub>50</sub> моно

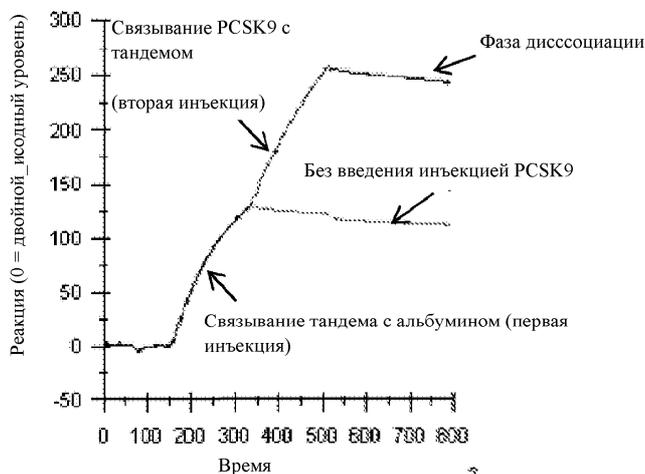


X = тандемы не образуются

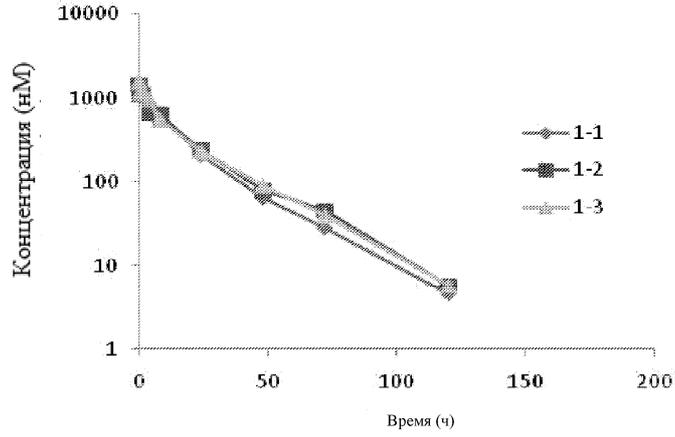
Фиг. 5



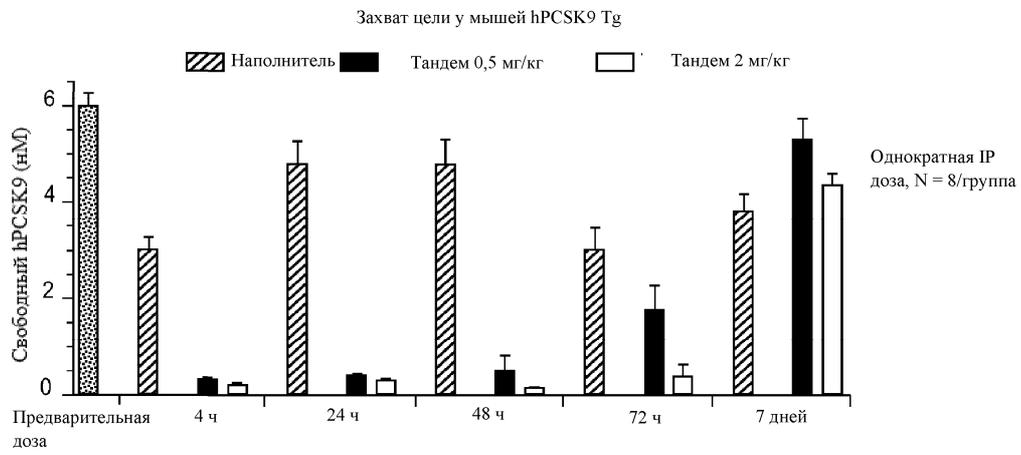
Фиг. 6



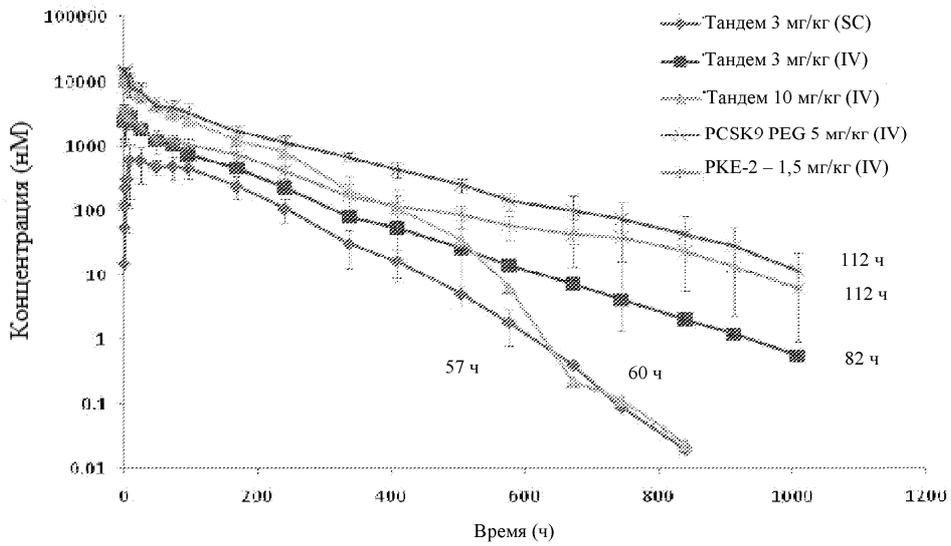
Фиг. 7



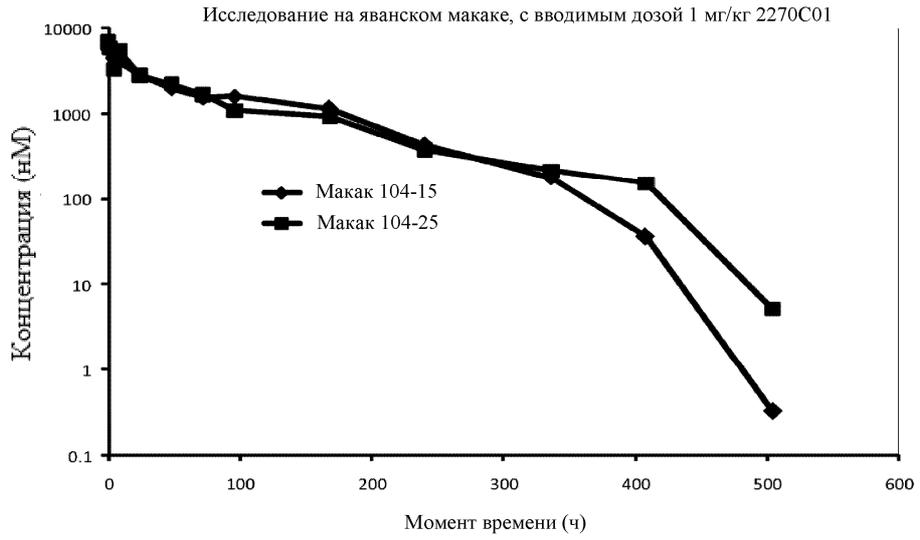
Фиг. 8



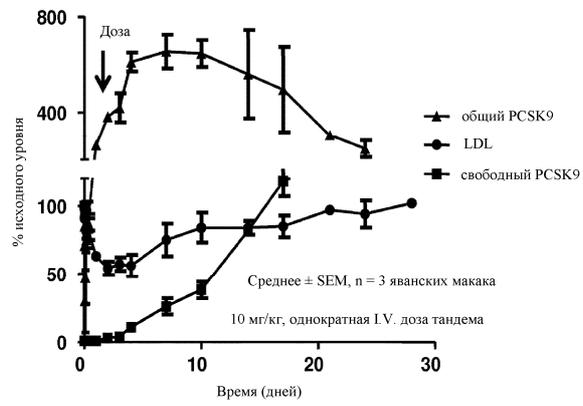
Фиг. 9



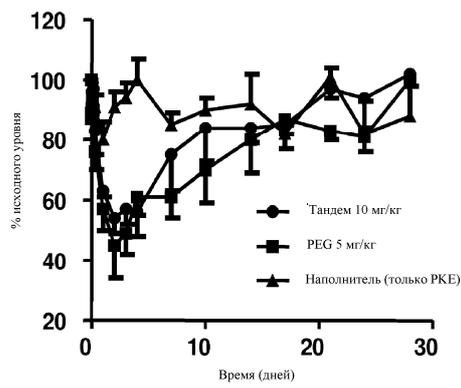
Фиг. 10



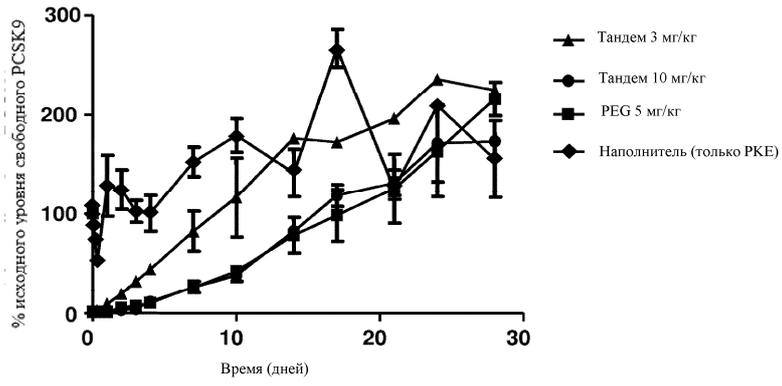
Фиг. 11



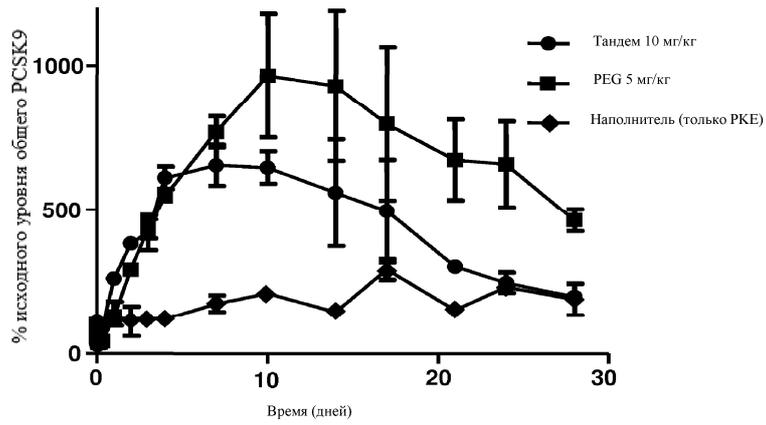
Фиг. 12



Фиг. 13



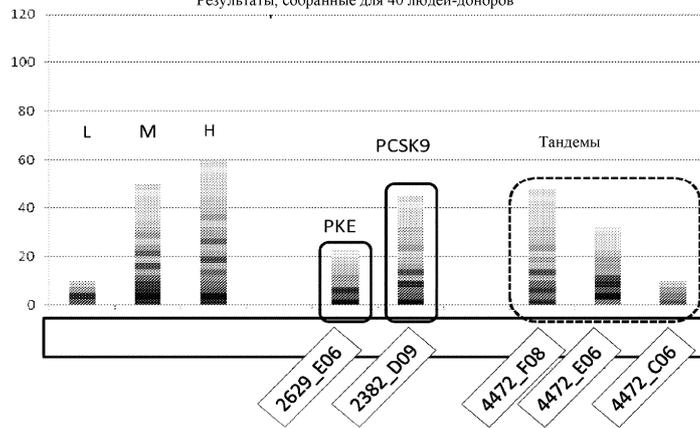
Фиг. 14



Фиг. 15

Анализ пролиферации РВМС

Реакция антигенности донора  
Результаты, собранные для 40 людей-доноров



Фиг. 16

Аднкстин Полная последовательность белка

2270\_C01 MASTSGVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGWVQVMYSDWGLPIYIYKEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTSGSGESPASSKPISINRYTEGDKPSQHNNHHHH\*

2629\_A09 MGVSVDPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGRHVQIYSDLGLPIYIYEFVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTSGSGESPASSKPISINRYTEIDKPSQHNNHHHH\*

2629\_A11 MGVSVDPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGRHVHIYSDWGPMIYIYEFVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTSGSGESPASSKPISINRYTEIDKPSQHNNHHHH\*

2629\_C10 MGVSVDPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSVLGLPIYIYEFVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTSGSGESPASSKPISINRYTEIDKPSQHNNHHHH\*

2629\_D09 MGVSVDPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSYDLGLPIYIYEFVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTSGSGESPASSKPISINRYTEIDKPSQHNNHHHH\*

2629\_E05 MGVSVDPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSYDLGLPIYIYEFVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTSGSGESPASSKPISINRYTEIDKPSQHNNHHHH\*

2629\_E06 MGVSVDPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSYDLGLPIYIYEFVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTSGSGESPASSKPISINRYTEIDKPSQHNNHHHH\*

2629\_F04 MGVSVDPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVHMYSDFGPMYIYEFVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTSGSGESPASSKPISINRYTEIDKPSQHNNHHHH\*

2629\_H01 MGVSVDPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVHKNSDWGLPIYIYEFVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTSGSGESPASSKPISINRYTEIDKPSQHNNHHHH\*

2629\_H06 MGVSVDPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSYDLGLPIYIYEFVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTSGSGESPASSKPISINRYTEIDKPSQHNNHHHH\*

2629\_H07 MGVSVDPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVHLYSDWGPMIYIYEFVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTSGSGESPASSKPISINRYTEIDKPSQHNNHHHH\*

2630\_A02 MGVSVDPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGRHVQIYSDLGLPIYIYEFVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTSGSGESPASSKPISINRYTEIDKPSQHNNHHHH\*

2630\_A11 MGVSVDPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVHMYSDFGPMYIYEFVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTSGSGESPASSKPISINRYTEIDKPSQHNNHHHH\*

2630\_D02 MGVSVDPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSYDLGLPIYIYEFVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTSGSGESPASSKPISINRYTEIDKPSQHNNHHHH\*

2630\_D10 MGVSVDPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSYDLGLPIYIYEFVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTSGSGESPASSKPISINRYTEIDKPSQHNNHHHH\*

2630\_F04 MGVSVDPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSYDLGLPIYIYEFVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTSGSGESPASSKPISINRYTEIDKPSQHNNHHHH\*

2630\_G03 MGVSVDPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGRHVQIYSDLGLPIYIYEFVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTSGSGESPASSKPISINRYTEIDKPSQHNNHHHH\*

2630\_G10 MGVSVDPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGRVQLYSDWGPMIYIYEFVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTSGSGESPASSKPISINRYTEIDKPSQHNNHHHH\*

2630\_H03 MGVSVDPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGREVQKYSYDLGLPIYIYEFVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTSGSGESPASSKPISINRYTEIDKPSQHNNHHHH\*

2631\_B04 MGVSVDPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGRHVHLYSEFGPMYIYEFVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTSGSGESPASSKPISINRYTEIDKPSQHNNHHHH\*

2631\_E03 MGVSVDPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGRVHMYSYDGLPIYIYEFVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTSGSGESPASSKPISINRYTEIDKPSQHNNHHHH\*

2631\_G01 MGVSVDPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGRHVQIYSDWGLPIYIYEFVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTSGSGESPASSKPISINRYTEIDKPSQHNNHHHH\*

2631\_G03 MGVSVDPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGRVQLYSDWGPMIYIYEFVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTSGSGESPASSKPISINRYTEIDKPSQHNNHHHH\*

2631\_H09 MGVSVDPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGRVQVYSDLGLPIYIYEFVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTSGSGESPASSKPISINRYTEIDKPSQHNNHHHH\*

2632\_G01 MGVSVDPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGRVQIYSDWGLPIYIYEFVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTSGSGESPASSKPISINRYTEIDKPSQHNNHHHH\*

4079\_A04 MGVSVDPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGRVQVMYSDWGLPIYIYEFVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTSGSGESPASSKPISINRYTEIDKPSQHNNHHHH\*

Фиг. 17

2270_C01	ATGGCTAGCACTAGTGGCGTGCCGCGCAGCTTGAAGTGGTTGCCGCGACCCCGACGCTCTGCTTATTAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGAGATATTATCGCATTACATATGGTTGGCAGGTTACAGATGACTCTGACTGGGGTCCCGTGTACATCTACAAAGAGTTACCGGTACCTGGGAGCAAGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTCAAACTGGAGTTGATTACACCATACCGGTATACGCAGTACCAGGCTCTGGAGAGAGCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAATTATCGGACCGCAAGGCGACAACTCCAGCACCATCACCACCACCTGA
2629_A09	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCAGCTTGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCATATTACCGCATCACTTACGGACGGCATGTTACAGATCTTCTGACTTAGGGCCGCTGTACATCTACACAGAGTTCACTGTGCTGGGAGCAAGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATGACAAACCATCCAGCACCATCACCACCACCTGA
2629_A11	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCAGCTTGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCATATTACCGCATCACTTACGGTAGACAGCTTCAATCTACTCAGACTGGGTCGATGATACATCTACACAGAGTTCACTGTGCTGGGAGCAAGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATGACAAACCATCCAGCACCATCACCACCACCTGA
2629_C10	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCAGCTTGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCATATTACCGCATCACTTACGGGAGAGAGGTTACAGAACTACTGTCTGGGTCCTACTGATACATACACGAGTTCACTGTGCTGGGAGCAAGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATGACAAACCATCCAGCACCATCACCACCACCTGA
2629_D09	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCAGCTTGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCATATTACCGCATCACTTACGGGAGGAGGTTACAGATGACTCTGACTGGGTCCTGTACATCTACACAGAGTTCACTGTGCTGGGAGCAAGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATGACAAACCATCCAGCACCATCACCACCACCTGA
2629_E05	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCAGCTTGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCATATTACCGCATCACTTACGGTACGGGAGGTTACAGAACTACTCGGACTGGGTCGCTGTACATCTACAAAGAGTTCACTGTGCTGGGAGCAAGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATGACAAACCATCCAGCACCATCACCACCACCTGA
2629_E06	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCAGCTTGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCATATTACCGCATCACTTACGGCAGGGAGGTTACAGAACTACTCGGACTGGGTCGCTGTACATCTACAAAGAGTTCACTGTGCTGGGAGCAAGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATGACAAACCATCCAGCACCATCACCACCACCTGA
2629_F04	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCAGCTTGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCATATTACCGCATCACTTACGGTAGGGAGGTTACAACTACTCTGACTGGGGTCCGATGATACATCTACAAAGAGTTCACTGTGCTGGGAGCAAGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATGACAAACCATCCAGCACCATCACCACCACCTGA
2629_H01	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCAGCTTGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCATATTACCGCATCACTTACGGTCGGGAGGTTACAGAACTCAGACTGGGTCAGCTGTACATCTACACAGAGTTCACTGTGCTGGGAGCAAGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATGACAAACCATCCAGCACCATCACCACCACCTGA
2629_H06	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCAGCTTGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTGCATATTACCGCATCACTTACGGACGGGAGGTTACAGAACTCAGACTGGGTCAGCTGTACATCTACGAGAGTTCACTGTGCTGGGAGCAAGTCCACAGCTACCATCAGCGGCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATGACAAACCATCCAGCACCATCACCACCACCTGA

Фиг. 18А

2629_H07	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTG CGATATTACCGCATCACTTACGGGCGGGAGGTTCCACTGTACTCCGACTGGGGCCGATGTACATCTACACAGAGTTCACTGTGCCCTGGGAGC AAGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCGCAAGCA GCAAGCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGCACCATCACCACCACCCTGA
2630_A02	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCACCTGGAAGTGGTTGCTACCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTG CGATATTACCGCATCACTTACGGTACGGTACGGTTCAAATGTACTCTGACCTTGGTCCGTTGTACATCTTCACTGAGTTCACTGTGCCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCGCAAGCA CAAGCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGCACCATCACCACCACCCTGA
2630_A11	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTG CGATATTACCGCATCACTTACGGACGGGAGGTTTATGTACTCTGACTTCCGTCGGATGTACATATACACAGAGTTCACTGTGCCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCGCAAGCA CAAGCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGCACCATCACCACCACCCTGA
2630_D02	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTG CGATATTACCGCATCACTTACGGTACAGAAAGTTTCAAGAAATCTGACTGGGGCCGCTCTACATCTACAATGAGTTCACTGTGCCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCGCAAGCA CAAGCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGCACCATCACCACCACCCTGA
2630_D10	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTG CGATATTACCGCATCACTTACGGTCCGGGAGGTTTCAAGATGTACTCCGACTGGGTCGGCTCTACATCTACAACGAGTTCACTGTGCCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCGCAAGCA CAAGCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGCACCATCACCACCACCCTGA
2630_F04	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTG CGATATTACCGCATCACTTACGGTACAGAGGTTACAGATGTACTGACCTGGGTCGGCTGTACATCTATACAGAGTTCACTGTGCCCTGGGAGC AAGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCGCAAGCA GCAAGCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGCACCATCACCACCACCCTGA
2630_G03	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTG CGATATTACCGCATCACTTACGGACGGGATGTTTCAAGATGTACTCCGACTGGGTCCTCTGTATCTACAATGAGTTCACTGTGCCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCGCAAGCA CAAGCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGCACCATCACCACCACCCTGA
2630_G10	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTG CGATATTACCGCATCACTTACGGTCCGGAGGTTTCAAAATATACTGACTGGGGCCGCTGTATATATAACAAGGTTCACTGTGCCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCGCAAGCA CAAGCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGCACCATCACCACCACCCTGA
2630_H03	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTG CSATATTACCGCATCACTTACGGACGTGAAGTRCAGAAATCTGACTGGGGCCCGCTGTACATCTACCAAGAGTTCACTGTGCCCTGGGAGCR AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCGCAAGCA CAAGCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGCACCATCACCACCACCCTGA
2631_B04	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTG CGATATTACCGCATCACTTACGGACGGGATGTTTCAAGATGTACTCCGACTGGGTCCTGTATCTACAACGAGTTCACTGTGCCCTGGGAGCA AGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCGCAAGCA CAAGCCAATTTCCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGCACCATCACCACCACCCTGA

Фиг. 18В

2631_E03	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTG ATTACCGCATCACTTACGGTACGGATGTTCCACATGTACTGACTGGGTCGGATGTACATATACCAAGAGTTCACTGTGCCCTGGGAGCAAGTCCAC AGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCGCAAGCAGCAAGCAATTT CCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGCACCATCACCACCACCCTGA
2631_G01	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTG ATTACCGCATCACTTACGGTACGGATGTTTCAAGATGTACTCCGACTGGGTCGGCTGTACATCTACAATGAGTTCACTGTGCCCTGGGAGCAAGTCCACA GCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTT CATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGCACCATCACCACCACCCTGA
2631_G03	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTG ATTACCGCATCACTTACGGTACGGATGTTTCAAGATGTACTCCGACTGGGTCGGATGTACATCTACAACGAGTTCACTGTGCCCTGGGAGCAAGTCCACA TCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTT CATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGCACCATCACCACCACCCTGA
2631_H09	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTG ATTACCGCATCACTTACGGTACGGAGGTTGCAAGTGTCTCAGACTGGGTCGGCTGTACATATACAACGAGTTCACTGTGCCCTGGGAGCAAGTCCAC AGTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTT CCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGCACCATCACCACCACCCTGA
2632_G01	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTG ATTACCGCATCACTTACGGTACAGGTTGACAGATGTACTGACTGGGTCGGCTGTACATCTACAATGAGTTCACTGTGCCCTGGGAGCAAGTCCACA AGTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTT CCATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGCACCATCACCACCACCCTGA
3852_F10	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTG ATTACCGCATCACTTACGGTACAGGAGGCAATGACCTGTCAGAGGATCACTGTGCCCTGTTCTAAATCTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAAC CCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTCCGTAAGAAATCCATTTCCGCTACTCACTTACTCTTAAACCAATTTCCATTAATTACC GCACAGAAATTGACAAACCATCCAGCACCATCACCACCACCCTGA
4079_A04	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTG ATTACCGCATCACTTACGGTACGGAGGTTACAGATGTACTGACTGGGTCGACTTACATCTACGCGGAGTTCACTGTGCCCTGGGAGCAAGTCCACA GCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTT CATTAATTACCGCACAGAAATTGACAAACCATCCAGCACCATCACCACCACCCTGA
5190_E01	ATGGGAGTTTCTGATGTGCCGCGCACCTGGAAGTGGTTGCTGCCACCCACCAGCCTGCTGATCAGCTGGGATGCACCTGCCGTACAGTG TATTACCGCATCACTTACGGTACAGGAGGCAATGACCTGTCAGGAGGATCACTGTGCCCTGTTCTAAAGGTACAGCTACCATCAGCGGCCTTAA ACCTGGCGTTGATTATACCATCACTGTGTATGCTGTGCAATTCGACTTCCCGGCGCGGTTACTACCATCGTCAAATTTCCATTAATTACCGGACGCA ACCGGACACCTCCGACCCGAGTCCGTCAACACCACCGACACCTGACCGAGCGGAGTTTCTGACGTCCGCGCGACCTGGAAGTGGTTGCTGCC ACCCACAGCTGCTGACTACGGTACAGCTGGGATGCACCTGCCGTCACAGTCCGATATTAACCGCATCACTTACGGGAGGAGGTTTCAAGATGTA TGGGTCGGTTGATCACTACCAAGAGTTCACTGTGCCCTGGGAGCAAGTCCACAGCTACCATCAGCGGCCTTAAACCTGGCGTTGATTATACCATCACT GTGTATGCTGTCACTGGCTCTGGAGAGAGCCCGCAAGCAGCAAGCCAATTTCCATTAATTACCGCACACCGTGA

Фиг. 18С



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2