

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035332**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.05.28

(21) Номер заявки
201792269

(22) Дата подачи заявки
2016.04.14

(51) Int. Cl. **C07K 14/78** (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(54) **ПОЛИПЕПТИДЫ, НАЦЕЛЕННЫЕ НА СЛИЯНИЕ ВИЧ**

(31) **62/152,271; 62/257,474**

(32) **2015.04.24; 2015.11.19**

(33) **US**

(43) **2018.04.30**

(86) **PCT/US2016/027424**

(87) **WO 2016/171980 2016.10.27**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ВАЙВ ХЕЛТКЕР ЮКей (№5)
ЛИМИТЕД (GB)**

(72) Изобретатель:
**Кристал Марк Р., Уэнсел Дэвид Л.,
Дэвис Джонатан (US)**

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В. (RU)**

(56) US-A1-2009022720
WO-A1-2011077093
HAQQANI AIMAN A ET AL.: "Entry
inhibitors and their use in the treatment of HIV-1
infection", ANTIVIRAL RESEARCH, ELSEVIER
BV, NL, vol. 98, no. 2, 28 March 2013 (2013-03-28),
pages 158-170, XP028531684, ISSN: 0166-3542,
DOI:10.1016/J.ANTIVIRAL.2013.03.017, Items 4.0,
5.3 and 5.4

WO-A1-2011130354
WO-A1-2014206336

(57) Изобретение направлено на полипептиды, содержащие CD4-связывающий фрагмент, gp41-связывающий фрагмент, фрагмент пептидного ингибитора слияния ВИЧ, и их комбинации. Более конкретно, настоящее изобретение относится к полипептидам, содержащим фибронектиновый каркасный доменный белок, который связывается с CD4, фибронектиновый каркасный доменный белок, который связывается с доменом N17 белка gp41, и пептидный ингибитор слияния ВИЧ, или их комбинациям. Данное изобретение также относится к использованию новых белков в терапевтическом применении в лечении ВИЧ.

B1

035332

035332

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

В данной заявке заявлен приоритет предварительных заявок US 62/152271, поданной 24 апреля 2015 г., и 62/257474, поданной 19 ноября 2015 г., каждая из которых включена в данную заявку посредством ссылки во всей полноте.

Область изобретения

Данное изобретение относится к полипептидам, содержащим CD4-связывающий фрагмент, gp41-связывающий фрагмент, фрагмент пептидного ингибитора слияния ВИЧ, и к их комбинациям. Более конкретно, настоящее изобретение относится к полипептидам, содержащим фибронектиновый каркасный доменный белок, который связывается с CD4, фибронектиновый каркасный доменный белок, который связывается с доменом N17 белка gp41, и пептидный ингибитор слияния ВИЧ, или к их комбинациям. Изобретение также относится к использованию новых белков в терапевтическом применении в лечении ВИЧ-инфекции.

Предшествующий уровень техники

Синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД) является результатом инфицирования ретровирусом, известным как вирус иммунодефицита человека (ВИЧ). Он остается серьезной медицинской проблемой, принимая во внимание, что по данным на конец 2013 г. около 35 млн человек во всем мире были инфицированы. В течение этого года было зарегистрировано 2,1 млн новых случаев инфекций, и 1,5 млн человек умерли от осложнений СПИД.

Современная терапия для ВИЧ-инфицированных субъектов состоит из комбинирования одобренных антиретровирусных средств. В настоящее время одобрено более двух дюжин лекарственных средств для ВИЧ-инфекции, или в виде отдельных агентов, комбинаций с фиксированными дозами, или схем приема одной таблетки, при этом последние два содержат 2-4 одобренных агента. Эти агенты относятся к нескольким разным классам, нацеленным либо на вирусный фермент, либо на функцию вирусного белка в течение жизненного цикла вируса. Таким образом, агенты классифицируют либо как нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы (NRTI), нунуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы (NNRTI), ингибиторы протеаз (PI), ингибиторы интеграз (INI) или ингибиторы проникновения в клетку (один ингибитор проникновения, маравирик, нацелен на белок хозяина CCR5, в то время как другой, энфувиртид, представляет собой пептид, который нацелен на область gp41 вирусного белка gp160). Кроме того, фармакокинетический усилитель без противовирусной активности (кобицистат) был одобрен для использования в комбинациях с антиретровирусными агентами (ARV), требующих усиления.

Несмотря на имеющийся арсенал агентов и комбинаций лекарственных средств, остается медицинская потребность в новых антиретровирусных агентах, отчасти из-за необходимости в продолжительном приеме дозированных средств для борьбы с инфекцией. Документально описаны значительные проблемы, связанные с долговременной токсичностью, обуславливающие необходимость принять меры и предупредить такие сопутствующие заболевания (например поражение ЦНС, сердечно-сосудистые/метаболические, почечные заболевания). Кроме того, по-прежнему остается проблемой повышение частоты неблагоприятного исхода современных методов терапии, связанное либо с присутствием или возникновением резистентных штаммов, либо с нарушениями режима лечения, связанными с лекарственными канкулами или вредными побочными эффектами. Например, несмотря на терапию, было подсчитано, что 63% субъектов, получавших комбинированную терапию, оставались зараженными вирусом, так как они имели вирусную нагрузку более 500 копий/мл (Oette, M. et al., "Primary ВИЧ Drug Resistance and Efficacy of First-Line Antiretroviral Therapy Guided by Resistance Testing", *J. Acq. Imm. Def. Synd.*, 41(5):573-581 (2006)). Среди этих пациентов 76% имели вирусы, резистентные к одному или более классам антиретровирусных агентов. В результате, необходимы новые лекарственные средства, которые являются более удобными, имеют высокие генетические барьеры для развития резистентности и обладают улучшенной безопасностью по сравнению с имеющимися в настоящее время агентами.

В настоящее время хорошо известно, что клетки могут быть инфицированы ВИЧ при помощи процесса, в котором происходит слияние между клеточной мембраной и вирусной мембраной. Общепринятой моделью этого процесса является модель, где комплекс гликопротеинов вирусной оболочки (gp120/gp41) взаимодействует с рецепторами клеточной поверхности на мембранах клеток-мишеней. После связывания gp120 с клеточными рецепторами (например CD4 в сочетании с хемокиновым корцептором, таким как CCR5 или CXCR4), в комплексе gp120/gp41 индуцируется конформационное изменение, которое позволяет gp41 встраиваться в мембрану клетки-мишени и опосредует мембранное слияние. Поскольку эти процессы проникновения происходят на клеточной мембране, они поддаются ингибированию макромолекулами, которые включают биологические пептиды (Haqqani et al., *Antiviral Res.*, 98:158 (2013)). Например, одобренный противовирусный пептид энфувиртид (FUZEON®) нацелен на область gp41, вовлеченную в мембранное слияние. Более крупные полипептиды, такие как моноклональные антитела, также могут ингибировать различные аспекты проникновения вируса. И моноклональное антитело, нацеленное на первую стадию проникновения вируса, на взаимодействие с клеточным рецептором CD4 (ибализумаб; Bruno et al., *J. Antimicrob. Chemother.*, 65:1839 (2010)), и моноклональное антитело, нацеленное на корцептор CCR5 (PRO-140; Tenorio, *Curr. ВИЧ/AIDS Rep.*, 8:1 (2011)), оба, продемонстрировали положительные результаты в фазе 2а клинических испытаний. Эти антитела также обла-

дают свойством противовирусных препаратов длительного действия с возможными схемами введения от еженедельного до ежемесячного (Jacobson et al., *J. Infect. Dis.*, 201:1481 (2010); Jacobson et al., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53:450 (2009)).

Другое свойство пептидных ингибиторов проникновения заключается в том, что усиленная или синергетическая активность может быть получена в результате присоединения двух пептидных ингибиторов друг к другу или если один ингибитор локализован вблизи места действия посредством связывания с биомолекулами мембраны. Таким образом, присоединение пептидного ингибитора слияния к моноклональному антителу, нацеленному на CCR5, (Kopetzki et al., *Virology*, 5:56 (2008)) или присоединение холестеринного фрагмента к С-концу пептидного ингибитора слияния для помещения его на поверхности мембраны клетки-мишени (Ingallinella et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106:5801 (2009); Augusto et al., *J. Antimicrob. Chemother.*, 69:1286 (2014)) в значительной степени увеличивает эффективность комбинированной молекулы по сравнению с отдельными молекулами. Аналогично, биспецифические антитела, состоящие из фрагментов анти-ВИЧ-1 нейтрализующих антител, нацеленных на gp120, слитых с ибализумабом, показали синергетическое увеличение эффективности по сравнению с отдельными ингибиторами (Sun et al., *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 66:473 (2014)). Молекулы комбинектина по изобретению используют эти различные свойства.

Краткое изложение сущности изобретения

Данное изобретение направлено на полипептиды, содержащие CD4-связывающий фрагмент, gp41-связывающий фрагмент, фрагмент пептидного ингибитора слияния ВИЧ, и их комбинации.

Одно воплощение изобретения направлено на полипептиды, содержащие фибронектиновый каркасный доменный белок, который связывается с CD4, фибронектиновый каркасный доменный белок, который связывается с доменом N17 белка gp41, и пептидный ингибитор слияния ВИЧ.

В одном воплощении изобретения три домена соединены друг с другом линкерами. В другом воплощении изобретения три домена могут быть соединены друг с другом в любом порядке. В другом воплощении изобретения полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична нелинкерным участкам SEQ ID NO: 3, 5, 7 или 9.

Изобретение также направлено на полипептиды, содержащие фибронектиновый каркасный доменный белок, который связывается с CD4, и фибронектиновый каркасный доменный белок, который связывается с доменом N17 белка gp41. В одном воплощении изобретения два домена соединены друг с другом линкерами. В другом воплощении изобретения два домена могут быть соединены друг с другом в любом порядке.

Изобретение также направлено на полипептиды, содержащие фибронектиновый каркасный доменный белок, который связывается с CD4, и пептидный ингибитор слияния ВИЧ. В одном воплощении изобретения два домена соединены друг с другом линкерами. В другом воплощении изобретения два домена могут быть соединены друг с другом в любом порядке.

Изобретение также направлено на полипептиды, содержащие фибронектиновый каркасный доменный белок, который связывается с доменом N17 белка gp41, и пептидный ингибитор слияния ВИЧ. В одном воплощении изобретения два домена соединены друг с другом линкерами. В другом воплощении изобретения два домена могут быть соединены друг с другом в любом порядке. В другом воплощении изобретения, полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична нелинкерным участкам SEQ ID NO: 410-428.

Еще одно воплощение изобретения также направлено на полипептиды, содержащие три активных домена, фибронектиновый каркасный доменный белок, который связывается с CD4, gp41-связывающий фрагмент и фрагмент пептидного ингибитора слияния ВИЧ. Изобретение также направлено на полипептиды, содержащие фибронектиновый каркасный доменный белок, который связывается с gp41, CD4-связывающий фрагмент и фрагмент пептидного ингибитора слияния ВИЧ. Изобретение также направлено на полипептиды, содержащие CD4-связывающий фрагмент, gp41-связывающий фрагмент и пептидный ингибитор слияния ВИЧ. В одном воплощении изобретения два домена соединены друг с другом линкерами. В другом воплощении изобретения два домена могут быть соединены друг с другом в любом порядке.

Изобретение также направлено на полипептиды, содержащие два активных домена, фибронектиновый каркасный доменный белок, который связывается с CD4, и gp41-связывающий фрагмент. Изобретение также направлено на полипептиды, содержащие фибронектиновый каркасный доменный белок, который связывается с gp41, и CD4-связывающий фрагмент. Изобретение также направлено на полипептиды, содержащие CD4-связывающий фрагмент и пептидный ингибитор слияния ВИЧ. Изобретение также направлено на полипептиды, содержащие gp41-связывающий фрагмент и пептидный ингибитор слияния ВИЧ. В одном воплощении изобретения два домена соединены друг с другом линкерами. В другом воплощении изобретения два домена могут быть соединены друг с другом в любом порядке.

Другое воплощение изобретения также направлено на анти-CD4 Аднектин, анти-N17 Аднектин или пептидные ингибиторы слияния ВИЧ. В другом воплощении изобретения полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична нелинкерным участкам SEQ ID NO: 95-114, или SEQ ID NO: 115-371, или SEQ ID NO: 372-392 соответ-

ственно.

В другом воплощении изобретения фармакокинетический (РК) фрагмент присоединен к полипептидам по изобретению. Примеры РК-фрагмента включают, без ограничения ими, полиэтиленгликоль, сиаловую кислоту, Fc, фрагмент Fc, трансферрин, сывороточный альбумин (HSA), белок, связывающий сывороточный альбумин, и белок, связывающий сывороточный иммуноглобулин. В одном воплощении изобретения РК-фрагмент может быть присоединен к линкерным областям или к N- или C-концу полипептида по изобретению. В другом воплощении изобретения, полипептид содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична нелинкерным участкам SEQ ID NO: 4, 6, 8 или 10.

Изобретение также направлено на полипептид, содержащий аминокислотную последовательность с любой из последовательностей, представленных в SEQ ID NO: 3-10.

Изобретение также направлено на фармацевтическую композицию, содержащую один или более полипептидов по изобретению и носитель.

Изобретение также относится к способу лечения ВИЧ у субъекта, включающему введение эффективного количества полипептидов по изобретению.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлено изображение альтернативных Комбинектинов. Один из Аднектинов связывается с CD4, второй Аднектин связывается с областью HR1 белка gp41. Пептид также связывается в области HR1 белка gp41. Разные компоненты Комбинектина соединены друг с другом в любом порядке линкерами. Любой из Комбинектинов может иметь присоединенный РК-фрагмент, такой как HSA или Fc.

На фиг. 2 показаны аминокислотные последовательности слияния Fc-Комбинектин 3137 (SEQ ID NO: 4), 3151 (SEQ ID NO: 6) и слияния человеческого сывороточного альбумина (HSA) - Комбинектин 3191 (SEQ ID NO: 8) и 3202 (SEQ ID NO: 10). Последовательности Fc и HSA выделены жирным шрифтом. Последовательности анти-CD4 Аднектина подчеркнуты. Последовательности анти-N17 Аднектина подчеркнуты двойной чертой. Пептидные последовательности ингибитора ВИЧ подчеркнуты жирной линией. Линкерные последовательности показаны курсивом.

На фиг. 3 показана активность (EC₅₀ и EC₉₀) Комбинектина 3137, 3151, 3191 и 3202, как описано в примере 2.

На фиг. 4 показаны РК характеристики Комбинектина 3137, 3151, 3191 и 3202, как описано в примере 3.

На фиг. 5 показаны аминокислотные последовательности анти-N17 Аднектина в комбинации с пептидным ингибитором слияния ВИЧ, которые соответствуют последовательностям, описанным в табл. 4, без N-концевых и C-концевых удлиняющих областей. Последовательности анти-N17 Аднектина подчеркнуты двойной чертой. Последовательности пептидного ингибитора слияния ВИЧ подчеркнуты жирной линией. Линкерные последовательности показаны курсивом.

На фиг. 6 показано изображение WebLogo для CD-петли анти-CD4 Аднектина. WebLogo создает лигатуры последовательностей, графические представления паттернов при множественном выравнивании последовательностей. Каждая лигатура состоит из стеков из букв, один стек для каждого положения в последовательности. Общая высота каждого стека указывает на консервативность последовательности в этом положении (измеряется в битах), тогда как высота символов внутри стека отражает относительную частоту соответствующей аминокислоты или нуклеиновой кислоты в этом положении (Crooks, G.E. et al., "WebLogo: A sequence logo generator", Genome Research, 14:1188-1190(2004)).

На фиг. 7 показано изображение WebLogo для FG-петли анти-CD4 Аднектина (Schneider, T.D. et al., "Sequence Logos: A New Way to Display Consensus Sequences", Nucleic Acids Res., 18:6097-6100 (1990)).

На фиг. 8 показаны данные по точечным мутантам для пептидного ингибитора слияния ВИЧ. Аспарагиновая кислота (D) около C-конца пептидного ингибитора слияния ВИЧ заменена аминокислотами, указанными вдоль оси x.

Подробное описание изобретения

Определения

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют такое же значение, какое обычно подразумевается квалифицированным специалистом. Хотя любые способы и композиции, подобные или эквивалентные описанным здесь, могут быть использованы в практическом осуществлении или для тестирования настоящего изобретения, здесь описаны предпочтительные способы и композиции.

При использовании здесь "полипептид" относится к любой последовательности из двух или более аминокислот, независимо от длины, посттрансляционной модификации или функции. "Полипептид", "пептид" и "белок" используются здесь взаимозаменяемо. Полипептиды могут быть модифицированы любым из ряда стандартных химических способов (например, аминокислота может быть модифицирована с помощью защитной группы; карбокси-концевая аминокислота может быть превращена в концевую амидную группу; amino-концевой остаток может быть модифицирован группами, которые, например, повышают липофильность; или полипептид может быть химически гликозилирован или иным образом

модифицирован для увеличения стабильности или периода полувыведения *in vivo*). Модификации полипептида могут включать присоединение другой структуры, такой как циклическое соединение или другая молекула, к полипептиду и могут также включать полипептиды, которые содержат один или более аминокислот в измененной конфигурации (то есть R или S; или L или D).

Пептиды по изобретению могут включать, например, белки, происходящие из десятого домена фибронектина типа III, которые были модифицированы, чтобы связываться с доменом CD4 или N17 белка gp41 и упоминаются здесь как "анти-CD4 Аднектин", "анти-N17 Аднектин", "CD4 Аднектин" или "gp41 Аднектин". Полипептиды по изобретению также могут включать пептиды, смоделированные после области семичленного повтора 2 (HR2) оболочки гликопротеина gp41 ВИЧ, которые ингибируют слияние путем связывания области семичленного повтора 1 (HR1) гликопротеина gp41 и упоминаются здесь как "пептидный ингибитор слияния ВИЧ" или "пептидный ингибитор слияния". Полипептиды по изобретению также включают "Комбинектины", содержащие анти-CD4 Аднектин, соединенный с анти-N17 Аднектином, связанным с пептидным ингибитором слияния ВИЧ (фиг. 1). Альтернативно, Комбинектин содержит анти-CD4 Аднектин, соединенный с анти-N17 Аднектином, или анти-N17 Аднектин, соединенный с пептидным ингибитором слияния ВИЧ, или анти-CD4 Аднектин, соединенный с пептидным ингибитором слияния ВИЧ.

При использовании здесь "полипептидная цепь" относится к полипептиду, каждый из доменов которого соединен с другим(и) доменом(ами) пептидной(ыми) связью(ями), в отличие от нековалентных взаимодействий или дисульфидных связей.

"Выделенный" полипептид представляет собой полипептид, который был идентифицирован и отделен от и/или выделен из компонента его природной среды. Загрязняющие компоненты его природной среды представляют собой вещества, которые будут мешать диагностическим или терапевтическим применениям полипептида и могут включать рекомбинантные белки клетки-хозяина и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В одном воплощении полипептиды очищают (1) до более чем 95% по массе полипептида, как определено методом Лоури, и наиболее предпочтительно до более чем 99% по массе, или (2) до гомогенности согласно SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с использованием кумасси голубого или серебряного красителя. Как правило, выделенный полипептид получают посредством по меньшей мере одной стадии очистки.

"Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности" здесь определен как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в выбранной последовательности, после выравнивания последовательностей и введения пробелов, если это необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательности и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательности. Выравнивание для определения процента аминокислотной идентичности может быть осуществлено различными способами, известными в данной области, например с использованием общедоступного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 или Megalign (DNASTAR®). Специалисты в данной области могут легко определить подходящие параметры для оценки выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Например, % идентичности аминокислотной последовательности заданной аминокислотной последовательности A с заданной аминокислотной последовательностью B (что альтернативно может быть названо как заданная аминокислотная последовательность A, которая имеет или содержит определенный % идентичности аминокислотной последовательности с заданной аминокислотной последовательностью B) рассчитывают следующим образом: умножают на 100 дробь X/Y, где X представляет собой количество аминокислотных остатков, подсчитанных как идентичные совпадения программой выравнивания последовательности ALIGN-2 при программном выравнивании A и B, и где Y представляет собой общее количество аминокислотных остатков в B. Понятно, что если длина аминокислотной последовательности A не равна длине аминокислотной последовательности B, то % идентичности аминокислотной последовательности A с B не будет равен % идентичности аминокислотной последовательности B с A.

При использовании здесь "консервативная замена" означает замещение аминокислотного остатка другим, без изменения общей конформации и функции пептида, включая, без ограничения ими, замену аминокислоты другой аминокислотой, имеющей похожие свойства (такие как, например, полярность, потенциал образования водородной связи, кислая, основная форма, гидрофобные, ароматические свойства и тому подобное). Аминокислоты с похожими свойствами хорошо известны в данной области. Например, аргинин, гистидин и лизин являются гидрофильно-основными аминокислотами и могут быть взаимозаменяемыми. Аналогично, изолейцин, гидрофобная аминокислота, может быть заменен лейцином, метионином или валином. Нейтральные гидрофильные аминокислоты, которые могут замещать друг друга, включают аспарагин, глутамин, серин и треонин. Под "замещенные" или "модифицированные" в настоящем изобретении подпадают те аминокислоты, которые были изменены или модифицированы по сравнению с природными аминокислотами. Фактически, следует понимать, что в контексте настоящего изобретения консервативной заменой признается замена одной аминокислоты на другую ами-

нокислоту, обладающую похожими свойствами.

При использовании здесь "сайт связывания" относится к сайту или части белка (например CD4, gp41), которые взаимодействуют или связываются с конкретным белком по изобретению (например как эпитоп распознаются антителом). Сайты связывания могут быть образованы смежными аминокислотами или несмежными аминокислотами, расположенными рядом в результате третичного фолдинга белка. Сайты связывания, образованные смежными аминокислотами, обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, в то время как сайты связывания, образованные при третичном фолдинге, обычно теряются при обработке денатурирующими растворителями.

Сайт связывания анти-CD4 фрагмента или анти-N17 фрагмента по изобретению может быть определен путем применения стандартных методик, обычно используемых для картирования эпитопов антител, включая, без ограничения ими, протеазное картирование и мутационный анализ. Альтернативно, сайт связывания может быть определен посредством конкурентного анализа с использованием эталонного белка (например другого Аднектина или антитела), который связывается с тем же полипептидом, например CD4 или gp41. Если тестируемый белок и эталонная молекула (например другой Аднектин или антитело) конкурируют, тогда они связываются с тем же сайтом связывания или с сайтами связывания, достаточно близкими, так что связывание одной молекулы мешает другой.

Термины "специфично связывается", "специфичное связывание", "селективное связывание" и "селективно связывается", используемые здесь взаимозаменяемо, относятся к белку, который проявляет аффинность к CD4 или gp41, но в значительной степени не связывается (например имеет менее чем примерно 10% связывание) с другим полипептидом, при измерении с помощью метода, доступного в данной области, такого как, без ограничения им, анализ Скэтчарда и/или анализы конкурентного связывания (например конкурентный анализ ELISA, BIACORE® SPR). Этот термин также применим, когда, например, связывающий домен белка по изобретению является специфичным к CD4 или gp41.

При использовании здесь "предпочтительно связывается" относится к ситуации, когда пептиды по изобретению связываются с CD4 или gp41 по меньшей мере примерно на 20% больше, чем он связывается с другим полипептидом, при измерении посредством метода, доступного в данной области, такого как, без ограничения ими, анализ Скэтчарда и/или анализы конкурентного связывания (например конкурентный анализ ELISA, BIACORE® SPR).

При использовании здесь "перекрестная реактивность" относится к белку, который связывается с более чем одним отдельным белком, имеющим идентичные или очень похожие сайты связывания.

При использовании здесь подразумевается, что " K_d " означает равновесную константу диссоциации взаимодействия конкретного Аднектин-белка, пептидного ингибитора слияния-белка или Комбинектин-белка (например CD4 и/или gp41) или аффинность Аднектина, пептидного ингибитора слияния или Комбинектина к белку (например CD4 и/или gp41), измеренную с использованием анализа поверхностного плазмонного резонанса или анализа межклеточного взаимодействия. При использовании здесь термин "желательный K_d " относится к K_d белка по изобретению, который является достаточным для предполагаемых целей. Например, желательный K_d может относиться к K_d Комбинектина, необходимому для того, чтобы вызвать функциональный эффект в анализе *in vitro*, например в клеточном люциферазном анализе.

При использовании здесь подразумевается, что " k_{on} " означает константу скорости ассоциации для ассоциации, например, Комбинектина в комплекс Комбинектин/белок.

При использовании здесь подразумевается, что " k_{off} " означает константу скорости диссоциации для диссоциации, например, Комбинектина из комплекса Комбинектин/белок.

При использовании здесь " IC_{50} " относится к концентрации, например, Комбинектина, который ингибирует ответ, либо в анализе *in vitro*, либо в анализе *in vivo*, до уровня, составляющего 50% от максимального ингибирующего ответа, то есть представляет собой среднее значение между максимальным ингибирующим ответом и ответом в отсутствие обработки.

При использовании здесь термины "ингибировать" или "нейтрализовать" в отношении активности белка по изобретению означает способность по существу антагонизировать, препятствовать, предотвращать, сдерживать, замедлять, нарушать, устранять, останавливать, уменьшать или обращать, например, прогрессирование или тяжесть того, что ингибируется, включая, без ограничения ими, биологическую активность или свойство, заболевание или состояние. Ингибирование или нейтрализация предпочтительно составляет по меньшей мере примерно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95% или более.

Термин "PK" является акронимом для термина "фармакокинетический" и охватывает свойства соединения, включающие, например, абсорбцию, распределение, метаболизм и удаление из организма субъекта. При использовании здесь "PK-модулирующий белок" или "PK-фрагмент" относится к любому белку, пептиду или фрагменту, который влияет на фармакокинетические свойства биологически активной молекулы, будучи слитым с ней, или при введении вместе с биологически активной молекулой. Примеры PK-модулирующего белка или PK-фрагмента включают ПЭГ (полиэтиленгликоль), связующие на основе человеческого сывороточного альбумина (HSA), (как раскрыто в публикации US 2005/0287153, патенте США 7696320, РСТ публикациях WO 2009/083804 и WO 2009/133208), человеческий сыворо-

точный альбумин, Fc или фрагменты Fc и его варианты, и сахара (например сиаловую кислоту).

Термин "CD4-связывающий фрагмент" относится к любому фрагменту, который блокирует связывание поверхностного белка gp120 ВИЧ с рецептором CD4 на CD4⁺ Т-клетках. CD4-связывающий фрагмент может представлять собой анти-CD4-аднектин, -антитело (такое как ибализумаб), -доменное антитело (dAb), -фрагменты антитела (Fab), -биспецифическое антитело и его слитый белок.

Термин "gp41-связывающий фрагмент" относится к любому фрагменту, который препятствует взаимодействию гликопротеинового комплекса вирусной оболочки (gp120/gp41) с Т-клетками. gp41-Связывающий фрагмент может представлять собой анти-gp41-аднектин, -антитело (Ab), -доменное антитело (dAb), -фрагменты антитела (Fab), -биспецифическое антитело и его слитый белок.

"Фрагмент пептидного ингибитора слияния ВИЧ" относится к любому фрагменту, который ингибирует слияние путем связывания области семичленного повтора 1 (HR1) из gp41. Примеры фрагмента пептидного ингибитора слияния включают пептиды, происходящие из областей NHR и CHR белка gp41, называемые NHR- и CHR-пептиды соответственно. Энфувиртид является примером CHR-пептида.

Пептиды по изобретению могут включать, например, CD4 моноклональное антитело ибализумаб, анти-N17 Аднектин и пептидный ингибитор слияния ВИЧ. Альтернативно, пептиды по изобретению могут включать анти-CD4 Аднектин, анти-N17 Аднектин и пептидный ингибитор слияния ВИЧ энфувиртид.

"Период полувыведения" аминокислотной последовательности или соединения обычно может быть определен как время, необходимое для снижения концентрации полипептида в сыворотке на 50%, например *in vivo*, из-за разрушения последовательности или соединения, и/или выведения или разрушения последовательности или соединения естественными механизмами. Период полувыведения можно определить любым известным способом, например посредством фармакокинетического анализа. Подходящие методы понятны специалисту в данной области и могут, например, обычно включать стадии подходящего введения субъекту подходящей дозы аминокислотной последовательности или соединения по изобретению; сбор образцов крови или других образцов от субъекта через регулярные промежутки времени; определение уровня концентрации аминокислотной последовательности или соединения по изобретению в указанном образце крови; и вычисление из (графика) таким образом полученных данных о времени, необходимом для снижения уровня концентрации аминокислотной последовательности или соединения по изобретению до 50% по сравнению с исходным уровнем при введении. Ссылка, например, приведена в стандартных руководствах, таких как Kenneth, A. et al., *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists* и в Peters et al., *Pharmacokinetic Analysis: A Practical Approach* (1996). Ссылка также приведена в Gibaldi, M. et al., *Pharmacokinetics, Second Rev. Edition, Marcel Dekker* (1982).

Период полувыведения может быть выражен с использованием таких параметров, как $t_{1/2}$ -альфа, $t_{1/2}$ -бета, HL_{λ} и область под кривой (AUC). В настоящем описании "увеличение периода полувыведения" относится к увеличению любого из этих параметров, любых двух из этих параметров, любых трех из этих параметров или всех четырех этих параметров.

Обозначения "mg", "мг/кг" или "мг на кг" относятся к миллиграммам на килограмм. Все обозначения используются взаимозаменяемо на протяжении всего описания.

Термины "индивидуум", "субъект" и "пациент", используемые здесь взаимозаменяемо, относят к животному, предпочтительно млекопитающему (в том числе не-примату и примату), включая, без ограничения ими, мышей, обезьян, людей, млекопитающих сельскохозяйственных животных (например быков, свиней, овец), млекопитающих спортивных животных (например лошадей) и млекопитающих домашних животных (например собак и кошек); предпочтительно термин относится к людям. В некоторых воплощениях субъект представляет собой млекопитающего, предпочтительно представляет собой человека и инфицирован вирусом ВИЧ.

Термин "терапевтически эффективное количество" относится по меньшей мере к минимальной дозе, но меньшей чем токсическая доза, агента, которая необходима для обеспечения терапевтической пользы субъекту. Например, терапевтически эффективное количество Комбинектина по изобретению представляет собой количество, которое у млекопитающих, предпочтительно людей, приводит к значительному снижению циркулирующего вируса ВИЧ у инфицированного субъекта.

Общие сведения

В настоящем изобретении предложены новые полипептиды, которые связываются с CD4 и/или gp41. Полипептиды содержат CD4-связывающий фрагмент, gp41-связывающий фрагмент, фрагмент пептидного ингибитора слияния ВИЧ и их комбинации. Более конкретно, настоящее изобретение относится к полипептидам, содержащим фибронектиновый каркасный доменный белок, который связывается с CD4, фибронектиновый каркасный доменный белок, который связывается с доменом N17 белка gp41, и пептидный ингибитор слияния ВИЧ или их комбинации (называемые здесь "Комбинектины").

Чтобы идентифицировать CD4 и gp41 Аднектины, растворимые CD4 (внеклеточный домен) и gp41 (различные искусственные конструкции, разработанные для демонстрации трехспирального сегмента, имитирующего часть gp41) были предоставлены крупным синтетическим библиотекам Аднектинов. Аднектины, которые перенесли несколько раундов селекции, подвергали скринингу в отношении связывания CD4 или gp41, биофизических свойств и ВИЧ-1-ингибирующей активность. Лучшие последователь-

ности анти-CD4 и анти-N17 Аднектина, которые были выявлены посредством скринингового анализа, были подвергнуты мутациям и дополнительным раундам селекции с повышенным селективным давлением, достигаемым путем снижения целевой концентрации и/или отбором анти-CD4 или gp41 Аднектинов с большой скоростью ассоциации и/или низкой скоростью диссоциации. В этом процессе оптимизации несколько семейств Аднектинов, некоторые из которых были нацелены на CD4, а другие были нацелены на gp41, были идентифицированы как специфические ингибиторы ВИЧ-1 с подходящей биохимической и биофизической активностью.

Был разработан оптимизированный gp41-нацеленный спиральный пептид, начиная с последовательностей, относящихся к gp41 HR2 и содержащих изменения для улучшения эффективности и степени охвата штаммов ВИЧ, а также увеличения барьера к формированию резистентности. Пептиды продуцировали иногда синтетически, а в других случаях как генетические слияния с инертными или активными Аднектинами. Оптимальные N- и C-концевые положения были определены в слияниях с представителем семейства gp41 Аднектинов. Чтобы идентифицировать мутации, которые еще больше увеличивали бы эффективность, использовали пептид с умеренной эффективностью с усеченным N-концом, так чтобы улучшения были более легко обнаруживаемыми. Были созданы небольшие библиотеки инертного Аднектин-пептидного слияния, содержащие одиночные и множественные точечные мутации, затем белки экспрессировали и подвергали скринингу в отношении биофизических свойств и ВИЧ-1-ингибирующей активности. Конечное семейство пептидов состояло из пептидов оптимальной длины с различными комбинациями последовательностей, которые имели наиболее благоприятные профили.

I. Фибронектиновые каркасы - Аднектины

В одном аспекте изобретения предложены анти-CD4 и анти-N17 Аднектины, содержащие домен фибронектина III типа (Fn3), в котором часть или все из одного или более доступных для растворителя петель были рандомизированы или мутированы. В некоторых воплощениях один или более остатков в одной или более непетлевых бета-цепях были рандомизированы или мутированы. В некоторых воплощениях домен Fn3 представляет собой домен Fn3, полученный из десятого модуля человеческого фибронектина типа 3 типа (¹⁰Fn3):

VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKS

┌ATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPIISINYRT (SEQ ID NO: 1)

(петли BC, CD, DE и FG подчеркнуты).

В других воплощениях нелигандные связывающие последовательности ¹⁰Fn3, то есть "каркас ¹⁰Fn3", могут быть изменены, при условии что ¹⁰Fn3 сохраняет функцию связывания лиганда и/или структурную стабильность. Сообщалось о различных мутантных каркасах ¹⁰Fn3. В одном аспекте один или более из Asp 7, Glu 9 и Asp 23 заменен другой аминокислотой, такой как, например, не-отрицательно заряженный аминокислотный остаток (например Asn, Lys, и т.д.). Сообщалось, что эти мутации способствуют повышенной стабильности мутанта ¹⁰Fn3 при нейтральном pH по сравнению с формой дикого типа (см., например, РСТ публикацию WO 02/04523). Было описано множество дополнительных изменений в каркасе ¹⁰Fn3, которые являются либо полезными, либо нейтральными. См., например, Baton et al., Protein Eng., 15(12): 1015-1020 (Dec. 2002); Koide et al., Biochemistry, 40(34): 10326-10333 (Aug. 28, 2001).

Как вариантный белок, так и белок дикого типа ¹⁰Fn3 характеризуются одной и той же структурой, а именно семью бета-цепочечными доменными последовательностями, обозначенными как A-G, и шестью петлевыми участками (петля AB, петля BC, петля CD, петля DE, петля EF и петля FG), которые связывают семь бета-цепочечных доменных последовательностей. Бета-цепи, расположенные ближе всего 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 75-87.

Соответственно в некоторых воплощениях анти-CD4 или анти-N17 Аднектин по изобретению представляют собой полипептид ¹⁰Fn3, который по меньшей мере на 40, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85 или 90% идентичен человеческому домену ¹⁰Fn3, показанному в SEQ ID NO: 1. Большая часть изменений обычно имеет место в одной или более петлях. Каждая из бета- или бета-подобных цепей полипептида ¹⁰Fn3 может состоять по существу из аминокислотной последовательности, которая по меньшей мере на 40, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100% идентична последовательности соответствующей бета- или бета-подобной цепи SEQ ID NO: 1, при условии, что такое изменение не нарушает стабильности полипептида в физиологических условиях.

В некоторых воплощениях в изобретении предложены один или более Аднектинов, содержащих десятый домен фибронектина III типа (¹⁰Fn3), где домен ¹⁰Fn3 содержит петлю AB; петлю BC; петлю CD; петлю DE; петлю EF и петлю FG и имеет по меньшей мере одну петлю, выбранную из петли BC, CD, DE и FG с измененной аминокислотной последовательностью по сравнению с последовательностью соответствующей петли человеческого домена ¹⁰Fn3. В некоторых воплощениях Аднектины по настоящему изобретению содержат домен ¹⁰Fn3, содержащий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 40, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична непетлевым участкам

SEQ ID NO: 1, где по меньшей мере одна петля, выбранная из BC, CD, DE и FG, изменена. В некоторых воплощениях петли BC и FG изменены, и в некоторых воплощениях петли BC, DE и FG изменены, то есть домены ¹⁰Fn3 содержат не встречающиеся в природе петли. В некоторых воплощениях петли AB, CD и/или EF изменены. В некоторых воплощениях петли CD и FG изменены. В некоторых воплощениях доступные для растворителя аминокислоты в нитях между петлями изменены, с изменением или без изменения соседних петель. Под "изменением" подразумевается одно или более изменений аминокислотной последовательности по сравнению с эталонной последовательностью (соответствующей человеческому фибронектиновому домену) и включает добавления, делеции, замены аминокислот или их комбинацию. Изменение аминокислотной последовательности может быть осуществлено посредством умышленного, слепого или спонтанного изменения последовательности, обычно нуклеиновокислотной кодирующей последовательности, и может быть осуществлено при помощи любого метода, например ПЦР, ПЦР с ошибками или химический синтез ДНК.

В некоторых воплощениях одна или более петель, выбранных из BC, CD, DE и FG, могут быть удлинены или укорочены по длине относительно соответствующей петли фибронектина человека. В некоторых воплощениях длина петли может быть увеличена на 1-25 аминокислот. В некоторых воплощениях длина петли может быть уменьшена на 1-11 аминокислот.

Следовательно, для оптимизации связывания антигена может быть изменена длина и последовательность петли ¹⁰Fn3 для получения максимально возможной гибкости и аффинности связывания антигена.

В некоторых воплощениях Аднектины содержат домен Fn3, который содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 40, 50, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентична непетлевым участкам SEQ ID NO: 1, где по меньшей мере одна петля, выбранная из BC, CD, DE и FG, изменена. В некоторых воплощениях измененная петля BC имеет вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 аминокислотных замен, вплоть до 1, 2, 3 или 4 аминокислотных делеций, вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных вставок или их комбинацию. В некоторых воплощениях измененная петля CD имеет вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 аминокислотных замен, вплоть до 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотных делеций, вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислотных вставок или их комбинацию. В некоторых воплощениях измененная петля DE имеет вплоть до 1, 2, 3, 4, 5 или 6 аминокислотных замен, вплоть до 1, 2, 3 или 4 аминокислотных делеций, вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 аминокислотных вставок или их комбинацию. В некоторых воплощениях петля FG имеет вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 или 13 аминокислотных замен, вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 аминокислотных делеций, вплоть до 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или 25 аминокислотных вставок или их комбинацию.

Удлиняющие последовательности

В некоторых воплощениях молекулы Аднектина по настоящему изобретению могут быть модифицированы так, чтобы содержать удлиняющую N-концевую последовательность и/или C-концевое удлинение. Например, последовательность MG может быть помещена на N-конец ¹⁰Fn3, определенного последовательностью SEQ ID NO: 1. M обычно отщепляется, оставляя G на N-конце. Аднектины, описанные здесь, также могут содержать альтернативные C-концевые хвостовые последовательности, называемые здесь усеченными C-концевыми или C-концевыми удлиняющими последовательностями. Кроме того, усеченный вариант может быть использован как терапевтические молекулы в усеченной форме или альтернативные C-концевые удлинения, такие как His6-тег, могут быть добавлены к усеченному варианту. В некоторых воплощениях C-концевые удлиняющие последовательности (также называемые "хвосты"), содержат остатки E и D, и их длина может составлять от 8 до 50, от 10 до 30, от 10 до 20, от 5 до 10 и от 2 до 4 аминокислот. В некоторых воплощениях первый остаток C-концевого удлинения представляет собой пролин. В некоторых других воплощениях первый остаток C-концевого удлинения представляет собой глутаминовую кислоту.

В некоторых воплощениях N-конец может быть удлинен на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более аминокислот, которые могут быть изменены каким-либо образом до или после раундов селекции, чтобы улучшить связывание мишени, стабильность или то и другое. В других воплощениях C-конец может быть удлинен на 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 или более аминокислот, которые могут быть изменены каким-либо образом до или после раундов селекции, чтобы улучшить связывание мишени, стабильность или то и другое. В других воплощениях и N-, и C-конец могут быть удлинены таким образом.

Анти-CD4 Аднектин

Аминокислотная последовательность петлевого участка CD и FG анти-CD4 Аднектина по изобретению включает, без ограничения ими, последовательности, указанные в табл. 1 ниже. Петли CD, описанные в табл. 1, заменяют R30-T49 в ¹⁰Fn3, определенном последовательностью SEQ ID NO: 1. Петли FG, описанные в табл. 1, заменяют D67-N91 в ¹⁰Fn3, определенном последовательностью SEQ ID NO: 1.

В табл. 1 также приведены значения IC₅₀ для каждого анти-CD4 Аднектина, содержащего указанные комбинации петель CD/FG.

Таблица 1. CD4 Аднектин - комбинации CD и FG петель

петля CD	петля FG	IC ₅₀ , мкМ	SEQ ID NO
HSYHIQYWPLGSYQRY QVFS	EYQIRVYAETGGADSDQSM GWIQIG	0,0025	13, 14
LSYHIQYWPLGLYQAY QVFS	EYQIRVYAETGRGESPASFG WIQIG	0,0060	15, 16
HAYHIQYWPLGFYQGY QVFS	EYQIRVYAETGLGDAHQSLG WIQIG	0,0072	17, 18
LAYHIQYWPLGWYQR YQIFS	EYQIRVYAETGRGESPASFG WIQIG	0,0075	19, 20
LAYHIQYWPLGWYQR YQVFS	EYQIRVYAETGRGESPASFG WIQIG	0,0082	21, 22
HFYHIQYWPLGLYHLY QVFS	EYQIRVYAETGRGESPASFG WIQIG	0,0087	23, 24
YSYHIQYWPLGWYHR YQVFS	EYQIRVYAETGADDPVQALG WIQIG	0,0099	25, 26
RCYHIQYWPLGLYPLY QVFS	EYQIRVYAETGDESSVQPFG WIQIG	0,0115	27, 28
YSYHIQYWPLGWYQR YQVFS	EYQIRVYAETDGGRSQSFG WIQIG	0,0118	29, 30
SSYHIQYWPLGAYQRY QVFS	EYQIRVYAETGRGESPASFG WIQIG	0,0158	31, 32
HAYHIQYWPLGLYQRY QVFS	EYQIRVYAETGRGESPASFG WIQIG	0,0165	33, 34
HAYYIQYWPLGSYQFY QVFA	EYQIRVYAETGRGESPASFG WIQIG	0,0213	35, 36
HSYHIQYWPLGSYLRY QVFS	EYQIRVYAETGRGESPASFG WIQIG	0,0214	37, 38
LSYHIQYWPLGFYQRY QVFS	EYQIRVYAETGRGESPASFG WIQIG	0,0230	39, 40
SAYHIQYWPLGWYHR YQIFS	EYQIRVYAETGRGESPASFG WIQIG	0,0239	41, 42
YSYHIQYWPLGAYSRH QLFS	EYQIRVYAETGGDGSEMYFG WIQIG	0,0260	43, 44
LAYHIQYWPLGWYHLY QVFS	EYQIRVYAETGRGESPASFG WIQIG	0,0272	45, 46

LAYHIQYWPLGWYQLY KVFS	DYQIRVYAETSGESSEQYLG WIQIG	0,0287	47, 48
HSYHIQYWPLGWYQL YQVFS	EYQIRVYAETEVDSGQHSFG WIQIG	0,0290	49, 50
LAYHIQYWPLGWYQR YQIFS	EYQIRVYAETGESGAQQSFG WIQIG	0,0297	51, 52
QSYHIQYWPLGAYQLY QLFS	EYQIRVYAETGRGESPASFG WIQIG	0,0323	53, 54
HAYHIQYWPLGFYQGY QVFS	EYQIRVYADTGRGYQLSYSW IQIGY	0,0353	55, 56
FRYHIQYWPLGGYERY QVFT	EYQIRVYAETGRGESPASFG WIQIG	0,0410	57, 58
HSYHIQYWPLGSYHLY QLFS	EYQIRVYAETGRGESPASFG WIQIG	0,0411	59, 60
HSYHIQYWPLGWYQL YQVFT	EYQIRVYAETGGFGSPNFG WIQIG	0,0436	61, 62
QFYHIQYWPLGSYQRY QVFS	EYQIRVYAETGRGESPASFG WIQIG	0,0509	63, 64
NSYHIQYWPLGWYHR YQVFS	EYQIRVYAETGRGESPASFG WIQIG	0,0517	65, 66
HSYHIQYWPLGRYQLY QVFS	EYQIRVYAETGRGESPASFG WIQIG	0,0562	67, 68
LAYHIQYWPLGWYHLY QIFS	EYQIRVYAETGGVGVHHSF GWIQIG	0,0587	69, 70
HVYHIQYWPLGWYPR YQVFS	EYQIRVYAETGRGESPASFG WIQIG	0,0604	71, 72
HSYHIPYWELAWYQRY QVFS	EYQIRVYAETGRGESPASFG WIQIG	0,0637	73, 74
ESYHIQYWPLGLYHRY QVFS	EYQIRVYAETGRGESPASFG WIQIG	0,0688	75, 76
LAYHIQYWPLGWYQAY QVFS	EYQIRVYAETGRGESPASFG WIQIG	0,0703	77, 78
YLYHIQYWPLGWYHRY QVFT	EYQIRVYAETGRGESPASFG WIQIG	0,0715	79, 80
RFYHIQYWPLGWYHC YQVYV	EYQIRVYAQTGDGSSQEYFG WIQIG	0,0839	81, 82
HSYHIQYWPLGWYYR YQVFS	EYQIRVYAETGGSGSQYYW GWIQIG	0,0869	83, 84
HAYHIQYWPLGFYQGY QVFS	EYQIRVYAETGRGESPASFG WIQIG	0,0875	85, 86
HSYHIQYWPLGLYVLY QVFS	EYQIRVYAETGAGGSEHSFG WIQIG	0,1059	87, 88
LSYHIQYWPLGRYERY QVFS	EYQIRVYAETVGGESLDSFS WIQIG	0,1277	89, 90
LSYHIQYWPLGWYQLY QVYF	EYQIRVYAETRVGGSVASFG WIQIG	0,1600	91, 92
LAYHIQYWPLGRYQLY QVFS	EYQIRVYAETGRGESPASFG WIQIG	0,4281	93, 94

В некоторых воплощениях анти-CD4 Аднектин по изобретению содержит аминокислотную последовательность по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную комбинациям петлевых участков CD/FG с последовательностями SEQ ID NO: 13-94.

В некоторых воплощениях анти-CD4 Аднектин по изобретению содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90%, 95, 98, 99 или 100% идентичную любому из участков петли CD с последовательностью SEQ ID NO: 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, 71, 73, 75, 77, 79, 81, 83, 85, 87, 89, 91 и 93.

В некоторых воплощениях анти-CD4 Аднектин по изобретению содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную любому из участков петли FG с последовательностью SEQ ID NO: 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48,

50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74, 76, 78, 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92 и 94.

WebLogo (weblogo.berkeley.edu) используют для идентификации консенсусных последовательностей анти-CD4 Аднектина. Y32, I34, Y36, Q46 и F48 из петли CD анти-CD4 Аднектина представляют собой консервативные аминокислоты (см. фиг. 6). В некоторых воплощениях анти-CD4 Аднектин содержит одну или более консервативных аминокислот Y32, I34, Y36, Q46 и F48.

WebLogo идентифицировал Y68, I70, V72, A74, T76, I88 и I90 петли FG анти-CD4 Аднектина как консервативные аминокислоты (см. фиг. 7). В некоторых воплощениях анти-CD4 Аднектин содержит одну или более консервативных аминокислот Y68, I70, V72, A74, T76, I88 и I90.

В некоторых воплощениях анти-CD4 Аднектин содержит одну или более консервативных аминокислот Y32, I34, Y36, Q46, F48, Y68, I70, V72, A74, T76, I88 и I90.

Полноразмерная аминокислотная последовательность анти-CD4 Аднектина по изобретению включает, без ограничения ими, последовательности, указанные в табл. 2 ниже. В табл. 2 также приведены значения противовирусной EC50 для каждого анти-CD4 Аднектина.

Таблица 2. Анти-CD4 Аднектин

SEQ ID NO	Противо-вирусная EC ₅₀ (нМ)	Последовательность белка Анти-CD4 Аднектина
95	48	MASTSGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVHSYHIQY HIQYWPLGWYQRYQVFSVPGSKSTATISGLKPEVEYQI RVYAETGGGGSQQSFGWIIQIGYRTEGSGSHHHHHH
96	7,8	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVQSYHIQY WPLGSYQRYQVFSVPGSKSTATISGLKPGVEYQIRVY AETGGADSDQSMGWIIQIGYRTEGDKPSQHSHHHHHH
97	11	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVHSYHIQY WPLGWYQRYQVFSVPGSKSTATISGLKPGVEYQIRVY AETRGLADESFGWIIQIGYRTEGDKPSQHSHHHHHH
98	4,9	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVHSYHIQY WPLGSYQRYQVFSVPGSKSTATISGLKPGVEYQIRVY AETGGADSDQSMGWIIQIGYRTEGDKPSQHSHHHHHH
99	8,5	MGHHHHHHGGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAV TVHSYHIQYWPLGSYQRYQVFSVPGSKSTATISGLK GVEYQIRVYAETGGADSDQSFGWIIQIGYRTPES
100	6	MASTSGSSYLMPDLEVVAATPTSLYIHWPYIASTIIN FRITYGETGGNSPVQEFTVPGSQVHATISGLKPGVDYT ITVYAVHYEHKYSSELWMMGHPISINRTEGSGSHHHHH H
101	>400	MASTSGSASYLIPSDLEVVAATPTSLSIWYYPVASTIINF RITYVETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYIT VYAVHYEQKYSEYWIGHPISINRTEGSGSHHHHHH
102	>5500	MASTSGSSPYLMPYDLEVVAATPTSLFIRWYGSASSIV KFRITYGETGGNSPVQEFTVGGTQLHATISGLKPGVDY TITVYAVHFEHKYSSELWIGHPISINRTEGSGSHHHHH H
103	255	MASTSGYTSYPIPYDLEVVAATPTSLYIHWWYIAATIISF RITYGETGGNSPVQEFTVPAGQDHATISGLKPGVDYTI TVYAVHYEEEEYSEFWTGHPIINRTEGSGSHHHHHH
104	500	MASTSGTHWFYSIPHDLEVVAATPTSLTIAWEPHHTA MGYRITYGETGGNSPVQEFTVPGGYTTAYISGLKPGV DYTITVYAAYYEREYSEHWISHPISINRTEGSGSHHH HHH

105	300	MASTSGEFYHTKYPYDLEVVAATPTSLEISWRSPTRD WQWFRITYGETGGNSPVQEFTVAGPYRNAIISGLKPG VDYTITVYADVMPSEGLLVDTYHPISINYRTEGSGS HHHHHH
106	2400	MASTSGQAYPEYYFVDLEVVAATPTSLISWSPYNA YSYRITYGETGGNSPVQEFTVLGHDTRAVISGLKPGVD YTITVYAMFIEYIDQEIWHAHPISINYRTEGSGSHHHHH H
107	500	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDEHTDIYRYRITY GETGGNSPVQEFTVPAMEHTATISGLKPGVDYTITVYA VTHVYPIHMQYPISINYRTEIDKPSQHHHHHH
108	170	MASTSGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVLEY QIDYHPAAVWHALQRFTVPGSKSTATISGLKPGVHYKI SVTATTHADNESIMWHPISIIYRTEGSGSHHHHHH
109	320	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDYPTVTPRYRITY GETGGNSPVQEFTVPEYIGTATISGLKPGVDYTITVYAV TNDTTIYSISRPIISINYRTEIDKPSQHHHHHH
110	28,6	MGHHHHHHGGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAV TVHSYHIQYWPLGSYQRYQVFSVPGSKSTATISGLKP GVEYQIRVYAETGRGESDQSLGWIQIGYRTEES
111	20,0	MGHHHHHHGGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAV TVHSYHIQYWPLGSYQRYQVFSVPGSKSTATISGLKP GVEYQIRVYAETGRGESDQSGWIQIGYRTEES
112	18,4	MGHHHHHHGGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAV TVHSYHIQYWPLGSYQRYQVFSVPGSKSTATISGLKP GVEYQIRVYAETGRGESDQSLGWIQIGYRTPES
113	15,4	MGHHHHHHGGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAV TVHSYHIQYWPLGSYQRYQVFSVPGSKSTATISGLKP GVEYQIRVYAETGRGESDQSGWIQIGYRTPES
114	12,6	MGHHHHHHGGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAV TVHAYHIQYWPLGFYQGYQVFSVPGSKSTATISGLKP GVEYQIRVYAETGLGDAHQSLGWIQIGYRTPES

В некоторых воплощениях анти-CD4 Аднектин по изобретению содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 95-114.

В некоторых воплощениях анти-CD4 Аднектин по изобретению содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 95-114, исключая любой N-концевой удлиненный участок.

В некоторых воплощениях анти-CD4 Аднектин по изобретению содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 95-114, исключая любой C-концевой удлиненный участок.

В некоторых воплощениях анти-CD4 Аднектин по изобретению содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 95-114, исключая и N-концевой, и C-концевой удлиненный участок.

В других воплощениях анти-CD4 Аднектин содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную участкам петли CD и петли FG с последовательностями SEQ ID NO: 95-114.

Анти-N17 Аднектин

Полноразмерная аминокислотная последовательность белка анти-N17 Аднектин по изобретению включает, без ограничения ими, последовательности, указанные в табл. 3 ниже. В табл. 3 также приведены значения противовирусной EC_{50} для каждого анти-N17 Аднектина.

Таблица 3. Анти-N17 Аднектин

SEQ ID NO	Противо-вирусная EC ₅₀ (нМ)	Последовательность белка Анти-N17 Аднектин
115	130	MGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKVNRYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYITIVYAV TYGVHSSPISINYTEIDKPSQHSHHHHH
116	50	MASTSGVSDVPRDLEVAATPTSLISWDAPAVTVEQY YIAYVEGEPSSYQYFRVPGSKSTATISGLKPGVLYHIY VNAVTSGLRPEFSLPIRIKYRTEGSGSHHHHHH
117	42	MGHHHHHHGGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLK GVDYITIVYAVTYGDDSAIPISINYTEID
118	28	MGVSDVPRDLEVAATPTSLISWKYKVHPYRYYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYITIVYAV TYGVNSLPISINYTEIDKPSQHSHHHHHH
119	>1000	MGVSDVPRDLEVAATPTSLISWDAPAVTVGWYHIGY NVEGEPASYQYFRVPGSKSTATISGLKPGVEYMFVNA VTGSGAREEFSLPISINYTEGSGSHHHHHH
120	39	MGHHHHHHGGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYNVN PYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSAQISGLKPG VDYITIVYAVTRGVDSAPISINRYRTPGG
121	57	MGHHHHHHGGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYNVN PYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTAEISGLKPG VDYITIVYAVTYGVSDPISINRYRTPGG
122	6	MGHHHHHHGGVSDVPRDLEVAATPTSLISWQYKVH PYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTAEISGLKPG VDYITIVYAVTRGVDSAPISINRYRTPGG
123	28	MGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKVHPYRYYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYITIVYAV TRGVDSAPISINYTEIDKPSQHSHHHHHH
124	6	MGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKVHPYRYYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTAEISGLKPGVDYITIVYAV TRGVDSAPISINRYRTPIDKPSQHSHHHHHH
125	4342	MGHHHHHHGGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKVH PYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPG VDYITIVYAVTYGVQSDPISINRYRTPGG
126	8	MGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKVHPYRYYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYITIVYAV TYGIQSPISINYTEIDKPSQHSHHHHHH
127	9	MGHHHHHHGGVSDVPRDLEVAATPTSLISWQYKVH PYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSAQISGLKPG VDYITIVYAVTYGISSPISINRYRTPGG
128	18	MGHHHHHHGGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKVH PYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSAEISGLKPG VDYITIVYAVTYGIDSSPISINRYRTPGG
129	11	MGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKVHPYRYYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSAEISGLKPGVDYITIVYA VTYGIDSPISINYTEIDKPSQHSHHHHHH
130	42	MGHHHHHHGGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYNV HYDRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLK GVDYITIVYAVTDGVHSSPISINYTEID
131	5	MGHHHHHHGGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLK GVDYITIVYAVTYGDLAPISINYTEID
132	5	MGHHHHHHGGVSDVPRDLEVAATPTSLISWDAPA VTVEEYIYGYVEFEPSSYQWFTVPGSKSTATISGLK GVEYSIYVNAVGMGMQPEMSLPISINRYRTEGS

133	42	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKV HYDRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGVSDPISINRTEID
134	5	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPA VTVEQYYIAYYDEKEPSSYQYFRVPGSKSTATISGLKP GVEYAI FVNAVTRSGVLPEFSLPISINRTEGS
135	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWKYNV NAYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGVHSSPISINRTEID
136	5	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPA VTVEQYYIGYYVEAEPSSYQYFFVPGSKSTATISGLKP GVDYAI FVNAV TASGRGPEYSLPISINRTEGS
137	80	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHDGIGEERYRITY GETGGNSPVQEFTVPMDDITATISGLKPGVDYTITVYAV TVGDVISVLHEPISINRTEIDKPSQH HHHHHH
138	3300	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWHYPFEGYVTYRIT YGETGGNSHVQEFTVPGYTTATISGLKPGVDYTITVY AVTSSKGYVYFIPISINRTEIDKPSQH HHHHHH
139	130	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEDPEAAVRYRITY GETGGNSPVQEFTVPINDLHSYLSGLKPGVDYTITVYA VTEATVMYVLDEPISINRTEIDKPSQH HHHHHH
140	950	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDLLEDMSRYRITY GETGGNSPVQEFTVPTDAYTATISGLKPGVDYTITVYA VTQDSHVIELSPISINRTEIDKPSQH HHHHHH
141	3	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWQYKVHPYRYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYTITVYAV TYGIQSPPI S INRTEIDKPSQH HHHHHH
142	55	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWRVYRHPYRYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYTITVYAV TDGVQSSPISINRTEIDKPSQH HHHHHH
143	20	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYNVNPYRYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYTITVYAV TYGIESSPISINRTEIDKPSQH HHHHHH
144	20	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWQYKVHPYRYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYTITVYAV TYGVESSPISINRTEIDKPSQH HHHHHH
145	11	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKVHPYRYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYTITVYAV TYGVNSLPISINRTEIDKPSQH HHHHHH
146	11	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKVHPYRYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYTITVYAV TYGIDSPPI S INRTEIDKPSQH HHHHHH
147	28	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKVHPYRYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYTITVYAV TYGVSDPISINRTEIDKPSQH HHHHHH
148	14	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYNVNPYRYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYTITVYAV TYGIDSPPI S INRTEIDKPSQH HHHHHH
149	3	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKV HPYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGKDSAPISINRTEID
150	18	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYNVNPYRYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYTITVYAV TYGVESSPISINRTEIDKPSQH HHHHHH

151	11	MGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKVHPYRYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYITIVYAV TYGIDSSPISINYTEIDKPSQHFFFFFFF
152	20	MGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYNVNPYRYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYITIVYAV TYGVQSDPISINYTEIDKPSQHFFFFFFF
153	8	MGHHHHHHGGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKV HPYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTAQISGLKP GVDYITIVYAVTYGDDAPISINYTEID
154	8	MGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYNVNPYRYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYITIVYAV TYGVNSLPISINYTEIDKPSQHFFFFFFF
155	9	MGVSDVPRDLEVAATPTSLISWQYKVHPYRYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYITIVYAV THGVHSAPISINYTEIDKPSQHFFFFFFF
156	43	MGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKVNPRYRYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYITIVYAV TYGIESSPISINYTEIDKPSQHFFFFFFF
157	43	MGVSDVPRDLEVAATPTSLISWQYKVHPYRYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYITIVYAV TYGVNSIPISINYTEIDKPSQHFFFFFFF
158	85	MGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKVHYDRYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYITIVYAV TYGIQSPISINYTEIDKPSQHFFFFFFF
159	23	MGHHHHHHGGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKV HPYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYITIVYAVTYGDDAPISIPYRTPGG
160	58	MGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKVDPYRYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYITIVYAV TYGVESPPISINYTEIDKPSQHFFFFFFF
161	13	MGHHHHHHGGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKV HPYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSAEISGLKP GVDYITIVYAVTYGDDAPISINYTEID
162	35	MGHHHHHHGGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKV HPYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSAQISGLKP GVDYITIVYAVTYGDDAPISINYTEID
163	35	MGHHHHHHGGVSDVPRYLEVAATPTSLISWQYKV HPYRWYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYITIVYAVTYGVNSIPISINYTEID
164	35	MGHHHHHHGGVSDVPRDLEVAATPTSLISWKYQV HAYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYITIVYAVTYGVYSAPISINYTEID
165	42	MGHHHHHHGGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKV NPYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYITIVYAVTYGVHSSPISINYTEID
166	50	MGHHHHHHGGVSDVPRDLEVAATPTSLISWKYNL HPYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYITIVYAVTYGIISEPISINYTEID
167	42	MGHHHHHHGGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYRV NPYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYITIVYAVTYGVQSPISINYTEID
168	42	MGHHHHHHGGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKV NAYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYITIVYAVTYGVLSPISINYTEID

169	5	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYNV NPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTRGVDSAPISINYRTEID
170	5	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV SPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTFGIRSSPISINYRTEID
171	35	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWKYQV HAYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGIISEPISINYRTEID
172	5	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV DPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGIDSSPISINYRTEID
173	5	MGHHHHHHGGAVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV NPWRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGVHSSPISINYRTEID
174	5	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYNV NAYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGIISEPISINYRTEID
175	5	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HYDRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGVQSTPISINYRTEID
176	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HHDYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGIESSPISINYRTEID
177	252	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSPISIPYRTPGG
178	631	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGXDXSPISINYRTEID
179	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSRPISINYRTEID
180	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGKDSAPISINYRTEID
181	631	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDHSAPISINYRTEID
182	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDQSAPISINYRTEID
183	20	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGIDSAPISINYRTEID
184	20	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDVSAPISINYRTEID
185	252	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGXDSAPISINYRTEID
186	2830	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGEDSAPISINYRTEID

187	86	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFKVPVSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
188	86	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDLSAPISINRTEID
189	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGKDSAPISINRTEID
190	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGADSAPISINRTEID
191	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDSAPISINRTEID
192	2830	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDSAPISINRTEID
193	252	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGKDSAPISINRTEID
194	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDPISAPISINRTEID
195	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSQIPISINRTEID
196	86	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDVSAPISINRTEID
197	81	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSGIPISINRTEID
198	2830	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSAPIQYRTEID
199	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSQIPISINRTEID
200	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYTETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPG VDYTTIVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
201	20	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDQSAPISINRTEID
202	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSKIPISINRTEID
203	86	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSGIPISINRTEID
204	0	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYRETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSAIPISINRTEID

205	86	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYDV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSAPIINRTEID
206	237	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSKPISINRTEID
207	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYWETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSAPIINRTEID
208	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSTPISINRTEID
209	20	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSTPISINRTEID
210	143	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSSPISINRTEID
211	631	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTRGDDSAPIINRTEID
212	86	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTHGDDSAPIINRTEID
213	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSWPISINRTEID
214	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTHGDDSAPIINRTEID
215	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWKYDV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSAPIINRTEID
216	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISDLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSHPISINRTEID
217	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTRGDDSAPIINRTEID
218	62	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATIRGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSAPIINRTEID
219	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWKYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSAPIINRTEID
220	86	MGHHHHHHCGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV AHNRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSAPIINRTEID
221	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV YGYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSAPIINRTEID
222	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV DHQRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSAPIINRTEID

223	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKV DYRRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
224	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKV AYDRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
225	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKV TSYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPG VDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
226	631	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKV HPYRYYRIHETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGV DYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
227	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRKEAEL
228	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKV NHQRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
229	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKV DHRRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
230	17	MGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKVHPYRYYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYTITVYAV TYGVSDPISINRTEIDKPSQHMMMMHH
231	10	MGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKVHPYRYYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYTITVYAV TYGVNSIPISINRTEIDKPSQHMMMMHH
232	47	MGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKVNAYRYYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYTITVYAV TYGIESSPISINRTEIDKPSQHMMMMHH
233	55	MGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKVHPYRYYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYTITVYAV TDGVQSSPISINRTEIDKPSQHMMMMHH
234	20	MGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKVNAYRYYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYTITVYAV TYGIDSSPISINRTEIDKPSQHMMMMHH
235	29	MGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKVHYDRYYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYTITVYAV TNGVLSPPISINRTEIDKPSQHMMMMHH
236	85	MGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKVNWPWRYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYTITVYAV TRGVDSAPISINRTEIDKPSQHMMMMHH
237	31	MGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKVHPXRYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYTITVYAV TYGVBSXPISINRTEIDKPSQHMMMMHH
238	11	MGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKVNWPWRYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYTITVYAV TYGIQSPISINRTEIDKPSQHMMMMHH
239	4	MGVSDVPRDLEVAATPTSLISWQYKVHPYRWYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYTITVYAV TYGVNSIPISINRTEIDKPSQHMMMMHH
240	5	MGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKVSPYRYYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYTITVYAV TYGVNSIPISINRTEIDKPSQHMMMMHH

241	8	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKVNPRYYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYITIVYAV TYGVNSLPISINYRTEIDKPSQHSHHHHH
242	0	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYNVHYDRYYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYITIVYAV TYGVSDPISINYRTEIDKPSQHSHHHHH
243	48	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKVNPRYYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYITIVYAV TYGVSDPISINYRTEIDKPSQHSHHHHH
244	58	MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKVDPPYYRITY GETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVDYITIVYAV TYGVSDPISINYRTEIDKPSQHSHHHHH
245	50	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWKYQV HAYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATINGLK GVDYITIVYAVTYGIIEPISINYRTEID
246	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKV NRYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLK GVDYITIVYAVTEGVQSAPISINYRTEID
247	2	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLK GVDYITIVYAVTYGDDAPISINYRTPGG
248	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNTPVQEFRVPSVLSTATISGLK GVDYITIVYAVTYADASAPISINYRTEID
249	83	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSATLNGLK GVDYITIVYAVTYGDDAPISINYRTEID
250	218	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSAKISGLK GVDYITIVYAVTYGDDAPISINYRTEID
251	186	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFNVPSVLSTATISGLK GVDYITIVYAVTYGDDAPISINYRTEID
252	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKV AHRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLK GVDYITIVYAVTYGDDAPISINYRTEID
253	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKV DAYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLK GVDYITIVYAVTYGDDAPISINYRTEID
254	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKV DSYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLK GVDYITIVYAVTYGDDAPISINYRTEID
255	136	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLK GVDYITIVYAVTYGDDAPISINYRTEID
256	170	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLK GVDYITIVYAVTYGDASAPISINYRTEID
257	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLK GVDYITIVYAVTNGDDAPISINYRTEID
258	195	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSATIRGLK GVDYITIVYAVTYGDDAPISINYRTEID

259	135	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTAKISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
260	188	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFRVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
261	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV APWRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
262	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV DGWRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
263	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV DTWRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
264	209	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTXLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
265	63	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGADSAIPISINRTEID
266	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTRGDDSAIPISINRTEID
267	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQDFTVPSVLSTATIRGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
268	2	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTANISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
269	184	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQAFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
270	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV APYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
271	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV DGYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
272	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV DTYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
273	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYEV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
274	115	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYRV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
275	180	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQSFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTTIVYAVTYGADSAIPISINRTEID
276	16	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATIRGLKP GVDYTTIVYAVTYGDDSAIPISINRTEID

277	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQDFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
278	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV ARWRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
279	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV DHQRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
280	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV DYGRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
281	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWKYGV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
282	56	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYSV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
283	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTDGDDSAIPISINRTEID
284	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTSGDDSAIPISINRTEID
285	397	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSATLRGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
286	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV AAWRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
287	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV ATWRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
288	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATTTLLISWEYKV DYHRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
289	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYGV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
290	138	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWKYXV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
291	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTGGDDSAIPISINRTEID
292	52	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATIHGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
293	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATLRGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
294	101	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID

295	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV AAYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAPIINRYRTEID
296	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV ATYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPG VDYTITVYAVTYGDDSAPIINRYRTEID
297	30	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV DPWRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAPIINRYRTEID
298	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV DYQRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAPIINRYRTEID
299	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWKYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAPIINRYRTEID
300	132	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYXV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAPIINRYRTEID
301	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTHGDDFAPISINRYRTEMLI
302	4	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSATINGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAPIINRYRTEID
303	109	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFKVPVSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAPIINRYRTEID
304	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV AHDYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAPIINRYRTEID
305	83	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV DPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAPIINRYRTEID
306	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV DYRRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAPIINRYRTEID
307	205	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAPIINRYRTEID
308	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV NAWRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAPIINRYRTEID
309	>1000	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTHGDDSAPIINRYRTEID
310	62	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSATINGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAPIINRYRTEID
311	42	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTAEISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAPIINRYRTEID
312	37	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFLVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAPIINRYRTEID

313	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV AHGRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
314	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV AYKRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
315	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV DRWRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
316	331	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYAV HPYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
317	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV NAYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
318	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV NGRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
319	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV SHGRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
320	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV TTWRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
321	55	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSAZLSGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
322	96	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
323	126	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
324	487	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSNPISINRTEID
325	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV NHDRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
326	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV SHRRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
327	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV TYERYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPG VDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
328	63	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSATXXGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
329	102	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
330	99	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSPISINRTEID

331	100	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSPISINRTEID
332	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV NRWRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSPISINRTEID
333	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV SPWRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSPISINRTEID
334	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV TYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSPISINRTEID
335	112	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDESAPISINRTEID
336	171	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSDPISINRTEID
337	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSPISINRTEID
338	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV NRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSPISINRTEID
339	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV SRWRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSPISINRTEID
340	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV XXYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSPISINRTEID
341	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQSFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSPISINRTEID
342	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGIDSAPISINRTEID
343	122	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDHSAPISINRTEID
344	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSEIPISINRTEID
345	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSRPISINRTEID
346	83	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSPISIQYRTEID
347	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV NYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSPISINRTEID
348	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV STWRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSPISINRTEID

349	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV YAYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
350	191	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYRITYGETGGNSPVQFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
351	215	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYRITYGETGGNSPVQAFVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGKDSAPISINRTEID
352	77	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDLSAPISINRTEID
353	19	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSGPISINRTEID
354	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV SAWRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
355	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV STYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPG VDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
356	31	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTAELSGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
357	178	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDLSAPISINRTEID
358	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSTPISINRTEID
359	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV SAYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
360	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV TGYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
361	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV YHGRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
362	121	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTAKLSGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
363	130	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGNDSAPISINRTEID
364	89	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDPISAPISINRTEID
365	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV SGYRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID
366	>1000	MGHHHHHHGGGSVDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV YHNRYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEID

367	300	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSAQLSGLKP GVDYITIVYAVTYGDDSPISINYRTEID
368	62	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYITIVYAVTYGTDSPISINYRTEID
369	155	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYITIVYAVTYGDSPISINYRTEID
370	335	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYITIVYAVTYGDDSKPISINYRTEID
371	114	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKP GVDYITIVYAVTYGIDSTPISINYRTEID

В некоторых воплощениях анти-N17 Аднектин по изобретению содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 115-371.

В некоторых воплощениях анти-N17 Аднектин по изобретению содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 115-371, исключая любой N-концевой удлиненный участок.

В некоторых воплощениях анти-N17 Аднектин по изобретению содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 115-371, исключая любой C-концевой удлиненный участок.

В некоторых воплощениях анти-N17 Аднектин по изобретению содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 115-371, включая и N-концевой, и C-концевой удлиненный участок.

В других воплощениях анти-N17 Аднектин содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную участкам петли BC, петли DE и петли FG с последовательностями SEQ ID NO: 115-371.

Анализ вышеуказанных последовательностей показывает, что S52, V53, L54 и S55 из петли DE анти-N17 Аднектина представляют собой консервативные аминокислоты. В некоторых воплощениях анти-N17 Аднектин содержит одну или более консервативных аминокислот S52, V53, L54 и S55.

Кроме того, анализ вышеприведенных последовательностей показывает, что Y24 из петли BC анти-CD4 Аднектина представляет собой консервативную аминокислоту. В некоторых воплощениях в положении 26 петли BC анти-N17 Аднектина находится валин или лейцин.

Анализ вышеприведенных последовательностей показывает, что G78 и S85 из петли FG анти-N17 Аднектина представляют собой консервативные аминокислоты. В некоторых воплощениях анти-N17 Аднектин содержит одну или более консервативных аминокислот G78 и S85. В некоторых воплощениях в положении 79 петли FG анти-N17 Аднектина находится валин или изолейцин.

В некоторых воплощениях анти-N17 Аднектин содержит одну или более консервативных аминокислот Y24, V26, L26, S52, V53, L54, S55, G78, V79, I79 и S85.

Анализ точечных мутаций анти-N17 Аднектина показал преимущества мутирования нескольких положений непетлевого каркаса¹⁰Fn3. В частности, мутация положений T56 и T58 повысили активность. В некоторых воплощениях анти-N17 Аднектин содержит мутацию T58 в Asn, Glu или Gln.

II. Пептидные ингибиторы слияния ВИЧ

Хорошо известна аминокислотная последовательность gp41 и ее вариации в разных штаммах ВИЧ-1. Считается, что сливающий домен (часто называемый пептид слияния или FP) вовлечен во внедрение в мембрану клетки-мишени и ее разрушение. Трансмембранный домен, содержащий трансмембранную якорную последовательность, расположен на C-конце белка. Между сливающим доменом и трансмембранным доменом находятся две различные области, известные как области семичленных повторов (HR), причем каждая область имеет большое количество семичленных повторов. Аминокислотная последовательность, содержащая область HR1, и аминокислотная последовательность, содержащая область HR2, являются относительно консервативными областями в белке оболочки ВИЧ-1. Типичная последовательность внешнего домена gp41 (консенсус клады B) выглядит следующим образом:

```
512 AVGIGAMFL GFLGAAGSTM GAASVTLTVQ ARQLLSGIVQ QQNNLLRAIE
561 AQQHLLQLTV WGIKQLQARV LAVERYLKDQ QLLGIWGCSSG KLICTTAVPW
611 NASWSNKSLD EIWNMTWME WEREIDNYTG LIYTLIEESQ NQQEKNQEL
661 LELDKWASLW NWFIDITNWLW YIK (SEQ ID NO:2)
```

Пептид слияния состоит примерно из первых 23 аминокислот Ala512-Ser534. Область HR1 имеет большое количество смежных участков из 7 аминокислотных остатков или "семичленных повторов" (7 аминокислот в каждом семичленном повторе обозначены как "a"- "g"), с преобладанием гидрофобных

остатков в первом ("a") и четвертом ("d") положениях, которые взаимодействуют однотипно с образованием ядра с 3-спиральной пучковой структурой. Нейтральные полярные аминокислоты, такие как глутамин, также могут занимать эти положения. Один типичный семичленный повтор начинается с Leu545. Высококонсервативная часть HR1 состоит из 17 остатков от Leu565 до Leu581 и называется "N17".

С-концевая часть gp41 содержит область HR2, которая, как считается, образует альфа-спиральную структуру в процессе слияния и связывается в бороздки тройной спиральной структуры HR1. HR2 также содержит семичленные повторы, хотя они не взаимодействуют однотипно, а скорее взаимодействуют с аминокислотами из HR1. Один типичный семичленный повтор начинается с Trp628.

Пептидный ингибитор слияния ВИЧ

Пептидный ингибитор слияния ВИЧ по изобретению включает, без ограничения ими, следующие последовательности:

Последовательность пептидного ингибитора слияния ВИЧ	SEQ ID NO
SEYEAREIALIRAAQEQQEKNEAALRELYK <u>W</u> AL	372
SEYEAREIALIRAAQEQQEKNEAALREL <u>W</u> KWAS	373
TIAEYAARIEALIRAAQEQQEKNEAALRELYK <u>W</u> AS	374
ARIEEYAARIEALIRAAQEQQEKNEAALRELYK <u>W</u> AS	375
SEYEAREIALIRAAQEQQEKNEAALRELYK <u>W</u> AS	376
TEYEAREIALIRAAQEQQEKNEAALREL <u>K</u> EWASIWV	377
SEYEAREIALIRAAQEQQEKNEAALRELD <u>K</u> WTGVWGNYEKV	378
SRIEALIRAAQEQQEKNEAALRELF <u>K</u> WAS	379
SRIEALIRAAQEQQEKNEAALRELD <u>K</u> WAS	380
SRIEALIRAAQEQQEKNEAALRELYK <u>W</u> AS	381
SRIEALIRAAQEQQEKNEAALREL <u>L</u> KWAS	382
SRIEALIRAAQEQQEKNEAALREL <u>Q</u> KWAS	383
SRIEALIRAAQEQQEKNEAALRELD <u>K</u> WAS	384
AIAEYAARIEALIRAAQEQQEKNEAALRELD <u>K</u> WAS	385
TEYEAREIALIRAAQEQQEKNEAALRELD <u>K</u>	386
SRIEALIRAAQEQQEKNEAALRELYK <u>W</u> TS	387
SRIEALIRAAQEQQEKNEAALRELYK <u>W</u> ASLWI	388
SRIEALIRAAQEQQEKNEAALRELYK <u>W</u> ASRWV	389
SRIEALIRAAQEQQEKNEAALRELYK <u>W</u> ASSWV	390
SRIEALIRAAQEQQEKNEAALRELYK <u>W</u> GS	391
SRIEALIRAAQEQQEKNEAALRELD <u>K</u>	392

В некоторых воплощениях пептидный ингибитор слияния ВИЧ содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 372-392.

Было показано, что точечные мутации в С-концевой области пептидного ингибитора слияния ВИЧ повышают эффективность. В некоторых воплощениях гидрофобная замена аспарагиновой кислоты (D) вблизи С-конца пептидного ингибитора слияния ВИЧ обеспечивает по меньшей мере 10-кратное увеличение эффективности (фиг. 8). В некоторых воплощениях пептидный ингибитор слияния ВИЧ содержит замену "DK" на "YK", "LK", "FK" или "WK".

Другие исследования точечной мутации в С-концевой области показали, как могут быть мутированы С-концевые аминокислоты "WAS" с хорошим влиянием на активность. В некоторых воплощениях пептидный ингибитор слияния ВИЧ содержит замену С-концевых аминокислот "WAS" на "WFS" или "WAL".

III. Линкеры

Различные компоненты Комбинектина по изобретению могут быть ковалентно или нековалентно связаны. В некоторых воплощениях РК-фрагмент может быть непосредственно или опосредованно связан с Комбинектином посредством полипептидного линкера.

Подходящими линкерами являются такие, которые позволяют отдельным доменам складываться независимо друг от друга, образуя трехмерную структуру, которая обеспечивает высокоаффинное связывание с молекулой-мишенью.

В описании изобретения предложен ряд подходящих линкеров, которые отвечают этим требованиям, включая линкеры на основе глицина-серина, линкеры на основе глицина-пролина. Описанные здесь примеры демонстрируют, что домены Комбинектина, соединенные через полипептидные линкеры, сохраняют свою функцию связывания с мишенью. В некоторых воплощениях линкер представляет собой линкер на основе глицина-серина. Эти линкеры содержат остатки глицина и серина и могут иметь длину от 8 до 50, от 10 до 30 и от 10 до 20 аминокислот. Примеры включают линкеры, имеющие аминокислотную последовательность (GS)₇ (SEQ ID NO: 393), G(GS)₆ (SEQ ID NO: 394) и G(GS)₇G (SEQ ID NO: 395).

Другие линкеры содержат глутаминовую кислоту и включают, например, (GSE)₅ (SEQ ID NO: 396) и GGSEGGSE (SEQ ID NO: 397). Другие типичные глицин-сериновые линкеры включают (GS)₄ (SEQ ID NO: 398), (GGGGG)₇ (SEQ ID NO: 399), (GGGGG)₅ (SEQ ID NO: 400), (GGGGG)₄ (SEQ ID NO: 401) (GGGGG)₃G (SEQ ID NO: 402). В некоторых воплощениях линкер представляет собой линкер на основе глицина-пролина. Эти линкеры содержат остатки глицина и пролина и могут иметь длину от 3 до 30, от 10 до 30 и от 3 до 20 аминокислот. Примеры включают линкеры, имеющие аминокислотную последовательность (GP)₃G (SEQ ID NO: 403) и (GP)₅G (SEQ ID NO: 404). В других воплощениях линкер может быть линкером на основе пролина-аланина, имеющим длину от 3 до 30, от 10 до 30 и от 3 до 20 аминокислот. Примеры пролин-аланиновых линкеров включают, например, (PA)₃ (SEQ ID NO: 405), (PA)₆ (SEQ ID NO: 406) и (PA)₉ (SEQ ID NO: 407). В некоторых воплощениях линкер представляет собой линкер на основе глутаминовой кислоты-пролина. Эти линкеры содержат остатки глутаминовой кислоты и пролина и могут иметь длину от 3 до 30, от 10 до 30 и от 3 до 20 аминокислот. Примеры включают линкеры, имеющие аминокислотную последовательность ESPEPETPEDE (SEQ ID NO: 408) и (ESPEPETPED)₂E (SEQ ID NO: 409). Предполагается, что оптимальная длина линкера и аминокислотный состав могут быть определены при обычном экспериментировании способами, хорошо известными в данной области.

Линкеры или спейсеры могут быть введены в N-конец анти-CD4 фрагмента, в C-конец анти-CD4 фрагмента, в N-конец анти-gp41 фрагмента, в C-конец анти-gp41 фрагмента, в N-конец пептидного ингибитора слияния ВИЧ или их комбинации. В некоторых воплощениях предпочтительные линкеры между анти-CD4 Аднектином и анти-N17 Аднектином представляют собой короткие линкеры, обогащенные глутамином-пролином. В некоторых воплощениях предпочтительные линкеры между анти-N17 Аднектином и пептидным ингибитором слияния ВИЧ представляют собой гибкие линкеры, обогащенные глицином-серином.

IV. Анти-N17 Аднектин, связанный с пептидным ингибитором слияния ВИЧ Комбинектином

Аминокислотные последовательности анти-N17 Аднектина - пептидного ингибитора слияния ВИЧ Комбинектина по изобретению включают, без ограничения ими, представленные в табл. 4 ниже. В табл. 4 также приведены противовирусные значения EC₅₀ для каждого анти-N17 Аднектина -пептидного ингибитора слияния ВИЧ Комбинектина.

Таблица 4. Анти-N17 Аднектин - пептидный ингибитор слияния ВИЧ Комбинектин

SEQ ID NO	Противовирусная EC ₅₀ (нМ)	Последовательность белка анти-N17 Аднектина – пептидного ингибитора слияния ВИЧ
410	2	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKV NAYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPG VDYITIVYAVTYGVSDPISINRYRTEIDGGGGSGGGGSG GGGSGGGGARIEEYAARIEALIRAAQEQEKNEAALRE LYKWAS
411	4342	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKV NAYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPG VDYITIVYAVTYGVSDPISINRYRTEIDGGGGSGGGGSG GGGSGGGGTIAEYAARIEALIRAAQEQEKNEAALREL YKWAS
412	2980	MGHHHHHHGGSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKV NAYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPG VDYITIVYAVTYGVSDPISINRYRTEIDGGGGSGGGGSG GGGSGGGGSEYARIEALIRAAQEQEKNEAALRELYK WAS
413	6	MGHHHHHHGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWYKVKHP YRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVD YTITVYAVTYGVNSLPISINRYRTEIDGGGGSGGGGSGG GSGGGGTEYARIEALIRAAQEQEKNEAALRELKEWA SIWN
414	4	MGHHHHHHTSGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAV TVGWYHIGYNVEGEPASYQYFRVPGSKSTATISGLKPG VEYMIFVNAVTSGAREEFSLPISINRYRTEIDGGGGSGG GGSGGGGGGGGSEYARIEALIRAAQEQEKNEAAL RELDKWTGVWGNYEKV

415	>1000	MGHHHHHHGVSDVPRDLEVAATPTSLISWDAPAVTV RYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVD YTITVYAVTGRGESPASSKPISINYRTEIDGGGSGGGG SGGGSGGGGSRIEALIRAAQEQKEKNEALRELFKW AS
416	>1000	MGHHHHHHGVSDVPRDLEVAATPTSLISWDAPAVTV RYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVD YTITVYAVTGRGESPASSKPISINYRTEIDGGGSGGGG SGGGSGGGGSRIEALIRAAQEQQKNEALRELDKW AS
417	428	MGHHHHHHGVSDVPRDLEVAATPTSLISWDAPAVTV RYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVD YTITVYAVTGRGESPASSKPISINYRTEIDGGGSGGGG SGGGSGGGGSRIEALIRAAQEQKEKNEALRELYKW AS
418	218	MGHHHHHHGVSDVPRDLEVAATPTSLISWDAPAVTV RYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVD YTITVYAVTGRGESPASSKPISINYRTEIDGGGSGGGG SGGGSGGGGSRIEALIRAAQEQKEKNEALRELLKW AS
419	>1000	MGHHHHHHGVSDVPRDLEVAATPTSLISWDAPAVTV RYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVD YTITVYAVTGRGESPASSKPISINYRTEIDGGGSGGGG SGGGSGGGGSRIEALIRAAQEQKEKNEALRELQKW AS
420	8	MGHHHHHHGGVSDVPRDLEVAATPTSLISWEYKV HPYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPG VDYTITVYAVTYGDDSAPISINYRTEIDGGGSGGGGSG GGGSGGGGSRIEALIRAAQEQKEKNEALRELDKWAS
421	50	MGHHHHHHGVSDVPRDLEVAATPTSLISWAGAED YQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPHDLVTATISGLKPGV DYTITVYAVTMMHVEYTEHPISINYRTEIDGGGSGGGG GSGGGSGGGAIEYAARIEALIRAAQEQKEKNEALRE LDKWAS
422	3	MGHHHHHHGVSDVPRDLEVAATPTSLISWKYKHP YRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVD YTITVYAVTYGVNSLPISINYRTEIDGGGSGGGGSGGG GSGGGGTEYARIEALIRAAQEQKEKNEALRELDK
423	122	MGHHHHHHGVSDVPRDLEVAATPTSLISWDAPAVTV RYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVD YTITVYAVTGRGESPASSKPISINYRTEIDGGGSGGGG SGGGSGGGGSRIEALIRAAQEQKEKNEALRELYKW TS
424	39	MGHHHHHHGVSDVPRDLEVAATPTSLISWDAPAVTV RYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVD YTITVYAVTGRGESPASSKPISINYRTEIDGGGSGGGG SGGGSGGGGSRIEALIRAAQEQKEKNEALRELYKW ASLWI
425	523	MGHHHHHHGVSDVPRDLEVAATPTSLISWDAPAVTV RYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVD YTITVYAVTGRGESPASSKPISINYRTEIDGGGSGGGG SGGGSGGGGSRIEALIRAAQEQKEKNEALRELYKW ASRWN
426	139	MGHHHHHHGVSDVPRDLEVAATPTSLISWDAPAVTV RYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVD YTITVYAVTGRGESPASSKPISINYRTEIDGGGSGGGG SGGGSGGGGSRIEALIRAAQEQKEKNEALRELYKW ASSWN

427	143	MGHHHHHHGVSDVPRDLEVVAATPTLLISWDAPAVTV RYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVD YTITVYAVTGRGESPASSKPISINYRTEIDGGGGSGGGG SGGGSGGGGSRIEALIRAAQEQQEKNEALRELYKW GS
428	50	MGHHHHHHGVSDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKVN YRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTATISGLKPGVD YTITVYAVTYGVHSSPISINYRTEIDGGGGSGGGSGG GGGGSGGSRIEALIRAAQEQQEKNEALRELDK

В некоторых воплощениях анти-N17 Аднектин - пептидный ингибитор слияния ВИЧ Комбинектин или его слитые белки содержат аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную нелинкерным участкам любой из SEQ ID NO: 410-428.

В некоторых воплощениях анти-N17 Аднектин - пептидный ингибитор слияния ВИЧ Комбинектин или его слитые белки содержат аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную нелинкерным участкам любой из SEQ ID NO: 410-428, исключая любой N-концевой удлиненный участок.

В других воплощениях анти-N17 Аднектин - пептидный ингибитор слияния ВИЧ Комбинектин содержит анти-N17 Аднектин, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную петле BC, петле DE и петлевым участкам FG последовательностей SEQ ID NO: 410-428.

В других воплощениях анти-N17 Аднектин - пептидный ингибитор слияния ВИЧ Комбинектин содержит пептидный ингибитор слияния ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную пептидному ингибитору слияния ВИЧ с последовательностями SEQ ID NO: 410-428.

V. Анти-CD4 Аднектин, соединенный с анти-N17 Аднектином, соединенным с пептидным ингибитором слияния ВИЧ Комбинектином

Анти-CD4 Аднектин, соединенный с анти-N17 Аднектином, соединенным с пептидным ингибитором слияния ВИЧ Комбинектином по изобретению, включает, без ограничения ими, следующие последовательности:

Комбинектин 3137 (SEQ ID NO: 3)

GVSDVPRDLEVVAATPTLLISWDAPAVTVHSYHIQYWPLGSYQRYQVFSVPGSKS
TATISGLKPGVEYQIRVYAETGRGESDQSLGWIQIGYRTEESPEPETPEDEGVSDVP
RDLEVVAATPTLLISWQYKVPYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTAEISGL
KPGVDYITVYAVTRGVDSAPISINYRTPGGGGSGGGSGGGSGGGGSEYEAR
EALIRAAQEQQEKNEALRELYKVAL

Комбинектин 3151 (SEQ ID NO: 5)

GVSDVPRDLEVVAATPTLLISWDAPAVTVHSYHIQYWPLGSYQRYQVFSVPGSKS
TATISGLKPGVEYQIRVYAETGRGESDQSLGWIQIGYRTEESPEPETPEDEGVSDVP
RDLEVVAATPTLLISWEYNVNPYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSSAQISGL
KPGVDYITVYAVTRGVDSAPISINYRTPGGGGSGGGSGGGSGGGGSEYEAR
EALIRAAQEQQEKNEALRELWKWAS

Комбинектин 3191 (SEQ ID NO: 7)

GVSDVPRDLEVVAATPTLLISWDAPAVTVHSYHIQYWPLGSYQRYQVFSVPGSKS
TATISGLKPGVEYQIRVYAETGRGESDQSLGWIQIGYRTPESPEPETPEDEGVSDVP
RDLEVVAATPTLLISWEYKVPYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSSAEISGLK
PGVDYITVYAVTYGIDSPISINYRTEGGGGSGGGSGGGSGGGGSEYEARIEA
LIRAAQEQQEKNEALRELYKVAL

Комбинектин 3202 (SEQ ID NO: 9)

GVSDVPRDLEVVAATPTLLISWDAPAVTVHSYHIQYWPLGSYQRYQVFSVP
GSKSTATISGLKPGVEYQIRVYAETGGADSDQSFQWIQIGYRTPESPEPETPEDEGV
SDVPRDLEVVAATPTLLISWEYKVPYRITYGETGGNSPVQEFTVPSVLSTAEI
SGLKPGVDYITVYAVTRGVDSAPISINYRTPGGGGSGGGSGGGSGGGGSEYEARIEA
AARIEALIRAAQEQQEKNEALRELYKVAL

В вышеприведенных последовательностях подчеркнуты последовательности анти-CD4 Аднектина. Последовательности анти-N17 Аднектина подчеркнуты двойной чертой. Последовательности пептидного ингибитора слияния ВИЧ выделены жирным шрифтом. Последовательности линкера показаны курсивом.

В некоторых воплощениях Комбинектин или его слитые белки содержат аминокислотную последо-

вательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 3, 5, 7 и 9.

В некоторых воплощениях Комбинектин или его слитые белки содержат аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную нелинкерным участкам любой из SEQ ID NO: 3, 5, 7 и 9.

В других воплощениях Комбинектин содержит анти-CD4 Аднектин, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную участкам петли CD и петли FG последовательностей SEQ ID NO: 3, 5, 7 и 9.

В других воплощениях Комбинектин содержит анти-N17 Аднектин, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную участкам петли BC, петли DE и петли FG последовательностей SEQ ID NO: 3, 5, 7 и 9.

В других воплощениях Комбинектин содержит пептидный ингибитор слияния ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную пептидному ингибитору слияния ВИЧ с последовательностями SEQ ID NO: 3, 5, 7 и 9.

VI. Фармакокинетические фрагменты

В одном аспекте в заявке предложен анти-CD4 фрагмент, анти-gp41 фрагмент, пептидный ингибитор слияния ВИЧ и их комбинации, дополнительно содержащие фармакокинетический (PK) фрагмент. Улучшенные фармакокинетические параметры могут быть оценены в соответствии с выявленной терапевтической потребностью. Часто желательно увеличивать биодоступность и/или увеличивать время между дозами, возможно путем увеличения времени, в течение которого белок остается доступным в сыворотке после введения. В некоторых случаях желательно улучшить непрерывность во времени концентрации белка в сыворотке (например уменьшить разницу в концентрации белка в сыворотке вскоре после введения и незадолго до следующего введения). Комбинектин по изобретению может быть присоединен к фрагменту, который снижает скорость выведения полипептида у млекопитающих (например мышей, крыс или людей) по меньшей мере в два раза, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 20 раз, по меньшей мере в 30 раз, по меньшей мере в 40 раз, по меньшей мере в 50 раз, по меньшей мере в 60 раз, по меньшей мере в 70 раз, по меньшей мере в 80 раз, по меньшей мере в 90 раз, по меньшей мере в 100 раз по сравнению с немодифицированным Комбинектином. Другие показатели улучшенных фармакокинетических параметров могут включать период полувыведения из сыворотки, который часто делят на альфу-фазу и бета-фазу. Любая или обе фазы могут быть значительно улучшены посредством добавления подходящего фрагмента. Например, PK-фрагмент может увеличить сывороточный период полувыведения полипептида более чем на 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 150, 200, 400, 600, 800, 1000% или более относительно одного Комбинектина.

Фрагменты, которые замедляют выведение белка из крови, называемые здесь "PK-фрагменты", включают полиоксикалиленовые фрагменты (например полиэтиленгликоль), сахара (например сиаловую кислоту) и хорошо переносимые белковые фрагменты (например Fc и его фрагменты и варианты, трансферрин или сывороточный альбумин). Комбинектин по изобретению также может быть слит с альбумином или фрагментом (частью) или вариантом альбумина, как описано в публикации US 2007/0048282 или могут быть слиты с одним или более Аднектинами или другими фрагментами, которые связываются с сывороточным альбумином, Fc или трансферрином.

Другие PK-фрагменты, которые могут быть использованы в изобретении, включают описанные в Kontermann et al. (Current Opinion in Biotechnology, 22: 868-876 (2011)) и включенные в данный документ посредством ссылки. Такие PK-фрагменты включают, без ограничения ими, слияния человеческого сывороточного альбумина, конъюгаты человеческого сывороточного альбумина, вещества, связывающие человеческий сывороточный альбумин (например Аднектин PKE, AlbuAb, ABD), слияния ХТЕН, слияния PAS (то есть рекомбинантные ПЭГ-миметики на основе трех аминокислот пролина, аланина и серина), углеводные конъюгаты (например гидроксипропанкрахмал (HES)), гликозилированные конъюгаты, конъюгаты полисиаловой кислоты и конъюгаты жирных кислот.

Соответственно, в некоторых воплощениях в изобретении предложен Комбинектин, слитый с PK-фрагментом, представляющим собой полимерный сахар. В некоторых воплощениях PK-фрагмент представляет собой фрагмент полиэтиленгликоля или Fc-область. В некоторых воплощениях PK-фрагмент представляет собой белок, связывающий сывороточный альбумин, такой как описан в публикациях US 2007/0178082 и 2007/0269422. В некоторых воплощениях PK-фрагмент представляет собой человеческий сывороточный альбумин. В некоторых воплощениях PK-фрагмент представляет собой трансферрин.

Fc-слияние-Комбинектин по изобретению включает последовательности, показанные в 3137 (SEQ ID NO: 4) и 3151 (SEQ ID NO: 6) на фиг. 2.

В некоторых воплощениях Fc-слияние-Комбинектин или его слитые белки содержат аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 4 и 6.

В некоторых воплощениях Fc-слияние-Комбинектин или его слитые белки содержат аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную нелинкерным участкам любой из SEQ ID NO: 4 и 6.

В других воплощениях Fc-слияние-Комбинектин содержит анти-CD4 Аднектин, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную участкам петли CD и петли FG последовательностей SEQ ID NO: 4 и 6.

В других воплощениях Fc-слияние-Комбинектин содержит анти-N17 Аднектин, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100 идентичную участкам петли BC, петли DE и петли FG последовательностей SEQ ID NO: 4 и 6.

В других воплощениях Fc-слияние-Комбинектина содержит пептидный ингибитор слияния, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную пептидному ингибитору слияния ВИЧ с последовательностями SEQ ID NO: 4 и 6.

HSA слияние-Комбинектин по изобретению включает последовательности, показанные в 3191 (SEQ ID NO: 8) и 3202 (SEQ ID NO: 10) на фиг. 2.

В некоторых воплощениях HSA слияние-Комбинектин или его слитые белки содержат аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную любой из SEQ ID NO: 8 и 10.

В некоторых воплощениях HSA слияние-Комбинектин или его слитые белки содержат аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную нелинкерным участкам любой из SEQ ID NO: 8 и 10.

В других воплощениях слияние HSA-Комбинектин содержит анти-CD4 Аднектин, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную участкам петли CD и петли FG последовательностей SEQ ID NO: 8 и 10.

В других воплощениях слияние HSA-Комбинектин содержит анти-N17 Аднектин, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную участкам петли BC, петли DE и петли FG последовательностей SEQ ID NO: 8 и 10.

В других воплощениях слияние HSA-Комбинектин содержит пептидный ингибитор слияния, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную пептидному ингибитору слияния ВИЧ с последовательностью SEQ ID NO: 8 и 10.

Полиэтиленгликоль

В некоторых воплощениях анти-CD4 фрагмент, анти-gp41 фрагмент, пептидный ингибитор слияния ВИЧ и их комбинации содержат полиэтиленгликоль (ПЭГ). ПЭГ является хорошо известным водорастворимым полимером, который является коммерчески доступным и может быть получен посредством полимеризации этиленгликоля с раскрытием кольца в соответствии со способами, хорошо известными в данной области (Sandier et al., Polymer Synthesis, vol. 3, pp. 138-161, Academic Press, New York). Термин "ПЭГ" широко используется, чтобы охватить любую молекулу полиэтиленгликоля, независимо от размера или модификации на конце ПЭГ, и может быть представлен формулой: $X-O(CH_2CH_2O)_n-1-CH_2CH_2OH$, где n равен 20-2300, и X представляет собой H или концевую модификацию, например C₁₋₄ алкил. ПЭГ может содержать дополнительные химические группы, которые необходимы для реакций связывания, которые являются результатом химического синтеза молекулы; или которые действуют как спейсер для оптимального расстояния между частями молекулы. Кроме того, такой ПЭГ может состоять из одной или более боковых цепей ПЭГ, которые соединены друг с другом. ПЭГ с более чем одной цепью ПЭГ называют многоцепочечными или разветвленными ПЭГ. Разветвленные ПЭГ описаны, например, в европейской опубликованной заявке 473084А и патенте США 5932462.

Одна или более молекул ПЭГ могут быть присоединены к белку в разных положениях, и такое присоединение может быть достигнуто посредством реакции с аминами, тиолами и другими подходящими реакционноспособными группами. Аминная группа может быть, например, первичным амином, находящимся на N-конце полипептида, или аминной группой, присутствующей в аминокислоте, такой как лизин или аргинин. В некоторых воплощениях фрагмент ПЭГ присоединен в положении на полипептиде, выбранном из группы, состоящей из: а) N-конца; б) между N-концом и самой N-концевой бета-нитью или бета-подобной нитью; в) петли или остатка цепи, расположенного на поверхности полипептида, напротив целевого сайта связывания; г) между C-концом и самой C-концевой бета-нитью или бета-подобной нитью; д) в пределах линкерной последовательности, соединяющей два связывающих домена, и е) C-конца.

Пегилирование может быть достигнуто посредством сайт-направленного пегилирования, где подходящую реакционноспособную группу вводят в белок для создания сайта, где предпочтительно происходит пегилирование. В некоторых воплощениях белок модифицирован для введения остатка цистеина в нужное положение, что позволяет осуществлять сайт-направленное пегилирование на цистеине. Мутации могут быть введены в последовательность, кодирующую белок, для образования остатков цистеина. Это может быть достигнуто, например, путем мутации одного или более аминокислотных остатков в цистеин. Предпочтительные аминокислоты для мутации в остаток цистеина включают серин, треонин, аланин и другие гидрофильные остатки. Предпочтительно остаток, мутируемый в цистеин, представляет собой остаток, экспонированный на поверхности. Алгоритмы прогнозирования поверхностной доступности остатков на основе первичной последовательности или белка хорошо известны в данной области техники. Альтернативно, поверхностные остатки могут быть спрогнозированы путем сравнения аминокис-

кислотных последовательностей связывающихся полипептидов, при условии, что кристаллическая структура каркаса, на основе которой разработаны и образованы связывающие полипептиды, расшифрована (см. Hämäläinen et al., *Nature*, 414: 933-938 (2001)), и, таким образом, идентифицированы остатки, экспонированные на поверхности. Пегилирование остатков цистеина может быть осуществлено с использованием, например, ПЭГ-малеимида, ПЭГ-винилсульфона, ПЭГ-йодацетамида или ПЭГ-ортопиримидилдисульфида.

ПЭГ обычно активируют с помощью подходящей активирующей группы, подходящей для связывания с нужным сайтом на полипептиде. Способы пегилирования хорошо известны в данной области и дополнительно описаны в Zalipsky S. et al., "Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides" in Harris, J.M., *Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, Plenum Press, New York (1992) и в Zalipsky, *Advanced Drug Reviews*, 16: 157-182 (1995).

Молекулярная масса ПЭГ может значительно варьироваться, и ПЭГ может быть разветвленным или линейным. Обычно средневесовая молекулярная масса ПЭГ составляет от примерно 100 до примерно 150000 Да. Типичная средневесовая молекулярная масса ПЭГ включает примерно 20000, примерно 40000, примерно 60000 и примерно 80000 Да. В некоторых воплощениях молекулярная масса ПЭГ составляет 40000 Да. Также можно использовать разветвленные варианты ПЭГ, имеющие любую из ранее указанных общую молекулярную массу. В некоторых воплощениях ПЭГ имеет две ветви. В других воплощениях ПЭГ имеет четыре ветви. В другом воплощении ПЭГ представляет собой бис-ПЭГ (NOF Copolymeration, DE-200MA), с которым конъюгированы два Аднектина.

Обычные способы разделения и очистки, известные в данной области, могут быть использованы для очистки пегилированного Аднектина, такие как эксклюзионная хроматография (например гелефильтрация) и ионообменная хроматография. Продукты также могут быть разделены с использованием SDS-PAGE. Продукты, которые могут быть разделены, включают моно-, ди-, три-, поли- и непегилированные Аднектины, а также свободный ПЭГ. Процент моно-ПЭГ-конъюгатов можно контролировать путем объединения более широких фракций вокруг пика элюирования для увеличения процента моно-ПЭГ в композиции. Примерно 90% моно-ПЭГ-конъюгатов представляют собой хороший баланс выхода и активности.

В некоторых воплощениях пегилированные анти-CD4 фрагмент, анти-gr41 фрагмент, пептидный ингибитор слияния ВИЧ и их комбинации предпочтительно сохраняют по меньшей мере примерно 25, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95 или 100% биологической активности, ассоциированной с немодифицированным анти-CD4 фрагментом, анти-gr41 фрагментом, Аднектином или Комбинектином. В некоторых воплощениях биологическая активность относится к их способности связываться с CD4 или gr41, оцениваемой посредством K_d , k_{on} или k_{off} . В некоторых воплощениях пегилированные анти-CD4 фрагмент, анти-gr41 фрагмент, Аднектин или его Комбинектин демонстрируют повышенное связывание с CD4 или gr41 относительно непегилированных анти-CD4 фрагмента, анти-gr41 фрагмента, Аднектина или Комбинектина.

Fc-домен иммуноглобулина (и фрагменты)

В некоторых воплощениях пептид по изобретению слит с Fc-доменом иммуноглобулина или его фрагментом или вариантом. При использовании здесь "функциональная Fc-область" представляет собой Fc-домен или его фрагмент, который сохраняет способность связываться с FcRn. В некоторых воплощениях функциональная Fc-область связывается с FcRn, но не обладает эффекторными функциями. Способность Fc-области или ее фрагмента связываться с FcRn может быть определена с помощью стандартных анализов связывания, известных в данной области. В других воплощениях Fc-область или ее фрагмент связывается с FcRn и обладает по меньшей мере одной "эффекторной функцией" нативной Fc-области. Типичные "эффекторные функции" включают связывание с C1q; комплементзависимую цитотоксичность (CDC); связывание с рецептором Fc; антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз; супрессию рецепторов клеточной поверхности (например B-клеточных рецепторов; BCR) и т.д. Такие эффекторные функции обычно требуют объединения Fc-области со связывающим доменом (например анти-CD4 или анти-N-17 Аднектином) и могут быть оценены с использованием различных анализов, известных в данной области для оценки таких эффекторных функций антител.

"Нативная последовательность Fc-области" содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности природной Fc-области. "Вариант Fc-области" содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от нативной последовательности Fc-области по меньшей мере одной аминокислотной модификацией. Предпочтительно вариант Fc-области имеет по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с нативной последовательностью Fc-области или с Fc-областью родительского полипептида, например от примерно одной до примерно десяти аминокислотных замен, и предпочтительно от примерно одной до примерно пяти аминокислотных замен в нативной последовательности Fc-области или в Fc-области родительского полипептида. Вариант Fc-области в данном документе предпочтительно обладает по меньшей мере примерно 80% идентичностью последовательности с нативной последовательностью Fc-области и/или с Fc-областью родительского полипептида и наиболее предпочтительно по меньшей мере примерно 90% идентичностью последова-

тельности с ними, более предпочтительно по меньшей мере примерно 95% идентичностью последовательности с ними.

В типичном воплощении Fc-домен происходит из подкласса IgG1, однако также могут быть использованы другие подклассы (например IgG2, IgG3 и IgG4). Ниже приведена последовательность Fc-домена человеческого иммуноглобулина IgG1:

```
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAPIEKTKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK
SLSLSPGK (SEQ ID NO: 11)
```

Последовательность ядра шарнирной области подчеркнута, а области CH2 и CH3 указаны обычным текстом. Следует понимать, что С-концевой глицин и лизин являются необязательными в Комбинектине по изобретению.

Слияние может быть образовано путем присоединения Аднектина по изобретению к любому концу Fc-молекулы, то есть комбинации Fc-Аднектин или Аднектин-Fc. В некоторых воплощениях Fc и Аднектин слиты посредством линкера.

В некоторых воплощениях Fc-область, используемая в слиянии Аднектина, содержит шарнирную область Fc-молекулы. При использовании здесь, "шарнирная" область содержит остатки ядра шарнирной области, охватывающей положения 1-16 в SEQ ID NO: 11 (DKTHTCPPCPAPELLG; SEQ ID NO: 12) Fc-области из IgG1. В некоторых воплощениях слияние Аднектин-Fc принимает мультимерную структуру (например димер) благодаря, отчасти, остаткам цистеина в положениях 6 и 9 из SEQ ID NO: 11 в пределах шарнирной области.

В некоторых воплощениях слияние Аднектин-Fc может иметь следующие конфигурации: 1) Аднектин-шарнир-Fc или 2) шарнир-Fc-Аднектин. Следовательно, любой Аднектин по настоящему изобретению может быть слит с Fc-областью, содержащей последовательность шарнирной области согласно этим конфигурациям. В некоторых воплощениях линкер может быть использован для присоединения Аднектина к фрагменту шарнир-Fc, например, типичный слитый белок может иметь конфигурацию Аднектин-линкер-шарнир-Fc или шарнир-Fc-линкер-Аднектин. Кроме того, в зависимости от системы, в которой производится слияние полипептида, лидерную последовательность можно поместить на N-конец слитого полипептида. Например, если слияние производят в системе млекопитающего, лидерная последовательность может быть добавлена к N-концу молекулы слияния. Если синтез производят в *E. coli*, последовательности слияния будет предшествовать метионин.

VII. Технология слияния нуклеиновая кислота-белок

В одном аспекте изобретения предложен Аднектин, содержащий домены фибронектина III типа, который связывается с CD4 или доменом N17 белка gp41. Одним из способов быстрого создания и тестирования доменов Fn3 со специфическими связывающими свойствами является технология слияния нуклеиновой кислоты и белка. В данном изобретении используют технологию экспрессии *in vitro* и меченая, называемую "PROfusion", в которой используют слияния нуклеиновая кислота-белок (слияния РНК- и ДНК-белок) для идентификации мотивов новых полипептидов и аминокислотных мотивов, которые важны для связывания с белками. Технология слияния нуклеиновая кислота-белок представляет собой технологию ковалентного связывания белка с его кодирующей генетической информацией. Подробное описание технологии слияния РНК-белок и методов скрининга библиотеки фибронектиновых каркасных белков см. в Szostak et al., патенты США 6258558, 6261804, 6214553, 6281344, 6207446, 6518018 и 6818418; Roberts et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 94:12297-12302 (1997); и Kurz et al., Molecules, 5: 1259-1264 (2000), все из которых включены в данный документ посредством ссылки.

VIII. Векторы и полинуклеотиды

Нуклеиновые кислоты, кодирующие любой из различных раскрытых здесь белков или полипептидов, могут быть синтезированы химически. Частота использования кодонов может быть выбрана таким образом, чтобы улучшить экспрессию в клетке. Такая частота использования кодона зависит от выбранного типа клетки. Были разработаны специализированные схемы частоты использования кодона для *E. coli* и других бактерий, а также для клеток млекопитающих, растительных клеток, дрожжевых клеток и клеток насекомых. См., например, Mayfield et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100(2):438-442 (Jan. 21, 2003); Sinclair et al., Protein Expr. Purif., 26(1):96-105 (Oct. 2002); Connell, N.D., Curr. Opin. Biotechnol., 12(5): 446-449 (Oct. 2001); Makrides et al., Microbiol. Rev., 60(3):512-538 (Sep. 1996); и Sharp et al., Yeast, 7(7): 657-678 (Oct. 1991).

Общие методы манипуляций с нуклеиновыми кислотами описаны, например, в Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), или Ausubel, F. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing and Wiley-Interscience, New York (1987) и периодических изданиях, включенных в настоящее описание посредством ссылки. Как правило, ДНК, кодирующая полипептид, функционально связана с подходящими транскрипционными или трансляционными регуляторными элементами, происходящими из генов млекопитающих, вирусов

или насекомых. Такие регуляторные элементы включают транскрипционный промотор, возможную последовательность оператора для контроля транскрипции, последовательность, кодирующую подходящий рибосомальный сайт связывания мРНК, и последовательности, контролирующие окончание транскрипции и трансляции. Дополнительно включены способность реплицироваться в хозяине, обычно обеспечиваемая точкой начала репликации, и селективный ген для облегчения распознавания трансформантов.

Описанные здесь белки могут быть получены рекомбинантно не только непосредственно, но также в виде полипептида, слитого с гетерологичным полипептидом, который предпочтительно представляет собой сигнальную последовательность, или с другим полипептидом, имеющим специфический сайт расщепления на N-конце зрелого белка или полипептида. Предпочтительно выбранная гетерологичная сигнальная последовательность представляет собой такую последовательность, которая распознается и процессируется (то есть отщепляется сигнальной пептидазой) клеткой-хозяином.

Для прокариотических клеток-хозяев, которые не распознают и не процессируют нативную сигнальную последовательность, эту сигнальную последовательность заменяют прокариотической сигнальной последовательностью, выбранной, например, из группы лидерных последовательностей щелочной фосфатазы, пенициллиназы, 1 рр или термостабильного энтеротоксина II.

Для секреции дрожжами нативная сигнальная последовательность может быть заменена, например, дрожжевой лидерной последовательностью инвертазы, лидерной последовательностью фактора (включая лидерные последовательности альфа-фактора *Saccharomyces* и *Kluuyveromyces*) или лидерной последовательностью кислой фосфатазы, лидерной последовательностью глюкоаминазы *S. albicans* или сигнальной последовательностью, описанной в патенте США 5631144. В случае экспрессии в клетках млекопитающих имеются сигнальные последовательности млекопитающих, а также вирусные секреторные лидерные последовательности, например сигнал gD простого герпеса. ДНК для таких областей-предшественника может быть лигирована в рамке считывания с ДНК, кодирующей белок.

И экспрессионные и клонирующие векторы содержат нуклеиновокислотную последовательность, которая позволяет вектору реплицироваться в одной или более выбранных клетках-хозяевах. Как правило, в клонирующих векторах эта последовательность является последовательностью, которая позволяет вектору реплицироваться независимо от хромосомной ДНК хозяина, и включает точки начала репликации или автономно реплицирующиеся последовательности. Такие последовательности хорошо известны для различных бактерий, дрожжей и вирусов. Точка начала репликации из плазмиды pBR322 подходит для большинства грамотрицательных бактерий, 2-микронная точка начала репликации плазмиды подходит для дрожжей, а различные вирусные точки начала репликации (SV40, полиомавирус, аденовирус, VSV (вирус Варицелла-Зостер) или BPV (вирус папилломы крупного рогатого скота)) используют для клонирующих векторов в клетках млекопитающих. Как правило, компонент точки начала репликации не нужен для экспрессионных векторов млекопитающих (обычно может быть использовано только начало репликации вируса SV40, потому что он содержит ранний промотор).

Экспрессионные и клонирующие векторы могут содержать селективный ген, также называемый селективным маркером. Типичные селективные гены кодируют белки, которые (а) обеспечивают устойчивость к антибиотикам или другим токсинам, например к ампициллину, неомицину, метотрексату или тетрациклину, (б) дополняют ауксотрофный дефицит или (в) обеспечивают необходимыми питательными веществами, отсутствующими в сложных средах, например геном, кодирующим D-аланинрацемазу для *Bacilli*.

Экспрессионные и клонирующие векторы обычно содержат промотор, который распознается организмом-хозяином и функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей белок по изобретению, например фибронектиновый каркасный белок. Промоторы, подходящие для использования с прокариотическими хозяевами, включают промотор ρ оА, бета-лактамазную и лактозную промоторные системы, щелочную фосфатазу, триптофановую (*trp*) промоторную систему и гибридные промоторы, такие как *tan* промотор. Однако подходят другие известные бактериальные промоторы. Промоторы для использования в бактериальных системах также содержат последовательность Шайна-Дальгарно (S.D.), функционально связанную с ДНК, кодирующей белок по изобретению. Последовательности промотора известны для эукариот. Практически все эукариотические гены имеют АТ-богатую область, расположенную примерно на 25-30 оснований выше сайта, где иницируется транскрипция. Другая последовательность, найденная на 70-80 оснований выше начала транскрипции многих генов, представляет собой область CNCAAT, где N может быть любым нуклеотидом. На 3'-конце большинства эукариотических генов имеется последовательность AATAAA, которая может быть сигналом для добавления поли(А)-хвоста к 3'-концу кодирующей последовательности. Все эти последовательности соответствующим образом встраивают в эукариотические экспрессионные векторы.

Примеры подходящих последовательностей промоторов для использования с хозяевами-дрожжами включают промоторы для 3-фосфоглицераткиназы или других гликолитических ферментов, таких как энзолаза, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа, гексокиназа, пируватдекарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкозо-6-фосфат-изомераза, 3-фосфоглицератмутаза, пируваткиназа, триозофосфат-изомераза, фосфоглюкозоизомераза и глюкокиназа.

Транскрипцию векторов в клетках-хозяевах млекопитающих можно контролировать, например,

промоторами, полученными из геномов вирусов, таких как полиомавирус, вирус оспы кур, аденовирус (такой как аденовирус 2), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирус, вирус гепатита В и наиболее предпочтительно вирус обезьяны 40 (SV40), из гетерологичных промоторов млекопитающих, например актинового промотора или иммуноглобулинового промотора, промоторов теплового шока, при условии что такие промоторы совместимы с системами клеток-хозяев.

Транскрипцию ДНК, кодирующей белок по изобретению, высшими эукариотами часто увеличивают путем встраивания энхансерной последовательности в вектор. Сейчас известны многие энхансерные последовательности из генов млекопитающих (глобин, эластаза, альбумин, α -фетопротейн и инсулин). Однако обычно используют энхансер из вируса эукариотической клетки. Примеры включают энхансер SV40 в поздней области от точки начала репликации (п.о. 100-270), энхансер раннего промотора цитомегаловируса, энхансер полиомы в поздней области от точки начала репликации и аденовирусные энхансеры. См. также Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982) об усиливающих элементах активации эукариотических промоторов. Энхансер может быть присоединен к вектору в положении 5' или 3' к пептиддирующей последовательности, но предпочтительно расположен на участке 5' от промотора.

Экспрессионные векторы, используемые в клетках-хозяевах эукариот (например дрожжей, грибов, насекомых, растений, животных, в человеческих или ядродержащих клетках других многоклеточных организмов) также будут содержать последовательности, необходимые для прекращения транскрипции и для стабилизации мРНК. Такие последовательности обычно находятся в 5'- и, иногда, в 3'- нетранслируемых областях эукариотических или вирусных ДНК или кДНК. Эти области содержат нуклеотидные сегменты, транскрибируемые как полиаденилированные фрагменты в нетранслируемой части мРНК, кодирующей белок по изобретению. Одним из полезных компонентов окончания транскрипции является область полиаденилирования гормона роста крупного рогатого скота. См. WO 94/11026 и раскрытый в ней экспрессионный вектор.

Рекомбинантная ДНК также может включать любой тип последовательности белкового тега, который можно использовать для очистки белка. Примеры белковых тегов включают, без ограничения ими, гистидиновый тег, FLAG тег, мус тег, HA тег или GST тег. Соответствующие клонирующие и экспрессионные векторы для использования с бактериальными, грибковыми, дрожжевыми и млекопитающими клеточными хозяевами можно найти в Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York (1985), релевантное раскрытие которых включено в настоящее описание посредством ссылки.

Экспрессионную конструкцию вводят в клетку-хозяина, используя способ, соответствующий этой клетке-хозяину, очевидный специалисту в данной области. В данной области известны различные способы введения нуклеиновой кислоты в клетки-хозяева, включающие, без ограничения ими, электропорацию; трансфекцию с использованием хлорида кальция, хлорида рубидия, фосфата кальция, DEAE-декстрана или других веществ; баллистическую трансфекцию; липофекцию; и инфицирование (когда вектор является инфекционным агентом).

Подходящие клетки-хозяева включают прокариотов, дрожжи, клетки млекопитающих или бактериальные клетки. Подходящие бактерии включают грамотрицательные или грамположительные организмы, например *E. coli* или *Bacillus spp.* Также можно использовать для получения полипептидов дрожжи, предпочтительно из *Saccharomyces species*, такие как *S. cerevisiae*. Различные культуры клеток млекопитающих или насекомых также можно использовать для экспрессии рекомбинантных белков. Бакуловирусные системы для продуцирования гетерологичных белков в клетках насекомых описаны в Luckow et al. (Bio/Technology, 6:47 (1988)). Примеры подходящих линий клеток-хозяев млекопитающих включают эндотелиальные клетки, клетки почек обезьяны COS-7, клетки CV-1, L-клетки, C127, 3T3, клетки яичника китайского хомячка (CHO), человеческие эмбриональные клетки почек, линии клеток HeLa, 293, 293T и ВНК. Очищенные полипептиды получают путем культивирования подходящих систем хозяин/вектор для экспрессии рекомбинантных белков. Для многих применений небольшой размер многих полипептидов, описанных здесь, делает экспрессию в *E. coli* предпочтительным способом экспрессии. Затем белок очищают из культуральной среды или клеточных экстрактов.

IX. Получение белка

Настоящее изобретение также относится к клеточным линиям, которые экспрессируют Комбинектин или его слитый белок. Создание и выделение клеточных линий, продуцирующих Комбинектин, можно осуществить с использованием стандартных методов, известных в данной области, таких как описаны здесь.

Клетки-хозяева трансформируют описанными здесь экспрессионными или клонирующими векторами для получения белка и культивируют в обычных питательных средах, модифицированных, как это целесообразно для индуцирования промоторов, отбора трансформантов или амплификации генов, кодирующих нужные последовательности. В приведенных здесь примерах клетки-хозяева, используемые для высокоэффективного получения белков (НТРА) и для среднemasштабного производства, представляли собой клетки бактериального штамма HMS174.

Клетки-хозяева, используемые для получения белков по настоящему изобретению, можно культивировать в различных средах. Для культивирования клеток-хозяев пригодны имеющиеся в продаже сре-

ды, такие как Ham's F10 (Sigma), минимальная питательная среда ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) и среда Игла в модификации Дульбекко ((DMEM), (Sigma)). Кроме того, многие среды, описанные в Ham et al., Meth. Enzymol., 58:44 (1979), Barites et al., Anal. Biochem., 102:255 (1980), патентах США 4767704, 4657866, 4927762, 4560655, 5122469, 6048728, 5672502 или патенте США RE 30985, могут быть использованы в качестве культуральных сред для клеток-хозяев. Любая из этих сред может быть обогащена по мере необходимости 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 гентамицин), следовыми элементами (определяемыми как неорганические соединения, обычно присутствующие в конечных концентрациях в микромолярном диапазоне), и глюкозой или эквивалентным источником энергии. Любые другие необходимые добавки также могут быть включены в соответствующих концентрациях, которые известны специалистам в данной области. Условия культивирования, такие как температура, pH и тому подобное, являются такими, которые ранее использовались для клетки-хозяина, отобранной для экспрессии, и очевидны для специалиста обычной квалификации.

Раскрытые здесь белки также могут быть получены с использованием бесклеточных систем трансляции. Для этой цели нуклеиновые кислоты, кодирующие полипептид, должны быть модифицированы так, чтобы обеспечить возможность транскрипции *in vitro* с получением мРНК и чтобы обеспечить возможность бесклеточной трансляции мРНК в определенной используемой бесклеточной системе (эукариотической, такой как бесклеточная трансляционная система млекопитающих или дрожжей, или прокариотической, такой как бактериальная бесклеточная трансляционная система).

Белки по изобретению также могут быть получены посредством химического синтеза (например посредством методов, описанных в Solid Phase Peptide Synthesis, Second Edition, The Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. (1984)). Модификации белка также могут быть осуществлены посредством химического синтеза.

Белки по настоящему изобретению могут быть очищены при помощи способов выделения/очистки белков, обычно известных в области химии белка. Неограничивающие примеры включают экстракцию, перекристаллизацию, высаливание (например сульфатом аммония или сульфатом натрия), центрифугирование, диализ, ультрафильтрацию, адсорбционную хроматографию, ионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию, хроматографию с нормальными фазами, хроматографию с обращенными фазами, гель-фильтрацию, гель-проникающую хроматографию, аффинную хроматографию, электрофорез, противоточное распределение или любую их комбинацию. После очистки, полипептиды могут быть помещены в разные буферы и/или сконцентрированы любым из множества известных в данной области методов, включая, без ограничения ими, фильтрацию и диализ.

Очищенный полипептид предпочтительно является по меньшей мере на 85% чистым, или предпочтительно по меньшей мере на 95% чистым, и наиболее предпочтительно по меньшей мере на 98% чистым. Независимо от точного числового значения чистоты, полипептид является достаточно чистым для применения в качестве фармацевтического продукта.

Х. Биофизические и биохимические характеристики

Связывание белка по изобретению с молекулой-мишенью (например CD4 или gp41) может быть оценено через константы равновесия (например, константу диссоциации, K_d) и через кинетические константы (например, константу скорости ассоциации, k_{on} , и константу скорости диссоциации, k_{off}). Белок по изобретению обычно связывается с молекулой-мишенью с K_d менее 500, 100, 10, 1 нМ, 500, 200 или 100 пМ, хотя допустимы более высокие значения K_d , когда k_{off} является достаточно низкой или k_{on} является достаточно высокой.

Анализ аффинности связывания *in vitro*

Белки, которые связываются с CD4 или gp41, могут быть идентифицированы с использованием различных анализов *in vitro*. Предпочтительно анализы представляют собой высокопроизводительные анализы, которые позволяют проводить скрининг множества кандидатов одновременно.

В некоторых воплощениях биомолекулярные взаимодействия можно наблюдать в режиме реального времени с помощью системы BIACORE®, где используется SPR (поверхностный плазмонный резонанс) для обнаружения изменений резонансного угла света на поверхности тонкой золотой пленки на стеклянной подложке из-за изменений показателя преломления поверхности вплоть до 300 нм. При анализе BIACORE® получают константы скорости ассоциации, константы скорости диссоциации, константы равновесной диссоциации и константы аффинности. Аффинность связывания получают путем оценки констант скорости ассоциации и диссоциации с использованием системы поверхностного плазмонного резонанса BIACORE® (Biacore, Inc.). Биологический чип активируют для ковалентного связывания мишени. Затем мишень разбавляют и вводят поверх чипа с получением сигнала иммобилизованного вещества в единицах ответа. Поскольку сигнал в резонансных единицах (RU) пропорционален массе иммобилизованного вещества, он отражает диапазон плотностей иммобилизованной мишени на матрице. Данные по ассоциации и диссоциации аппроксимируют одновременно в общем анализе для определения чистой скорости экспрессии для биомолекулярного взаимодействия 1:1, с получением наилучших ап-

проксимированных значения для k_{on} , k_{off} и R_{max} (максимальный ответ при насыщении). Равновесные константы диссоциации для связывания, K_d , рассчитывают из измерений SPR, как k_{off}/k_{on} .

В некоторых воплощениях Комбинектин по изобретению демонстрирует K_d 100 нМ или менее. Предпочтительно K_d составляет 10 нМ или менее. Более предпочтительно K_d составляет 1 нМ или менее.

В некоторых воплощениях Комбинектин по изобретению демонстрирует IC_{50} 5 нМ или менее, 4 нМ или меньше, 3 нМ или менее, 2,5 нМ или менее, 2 нМ или менее, 1,5 нМ или менее, 1 нМ или менее, 0,5 нМ или менее, 0,2 нМ или менее или 0,1 нМ или менее. Предпочтительно IC_{50} составляет 1,5 нМ или менее. Более предпочтительно IC_{50} составляет 0,5 нМ или менее.

Следует понимать, что описанные выше анализы являются иллюстративными и что любой способ определения аффинности связывания белков, известный в данной области, (например резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET), ферментный иммуносорбентный анализ и анализы конкурентного связывания (например радиоиммуноанализы)) может быть использован для оценки аффинностей связывания Комбинектина по изобретению.

В настоящем изобретении анализы ELISA были использованы для идентификации Аднектинов, которые связываются с CD4 или gp41, с аффинностями, определенными посредством BIACORE® SPR. Анализы FACS были также использованы для определения EC_{50} связывания CD4-Аднектина (отдельно или как части целого Комбинектина) с CD4, естественно представленным на Т-клеточных поверхностях. Аффинности пептидов измеряли посредством BIACORE® SPR.

Как описано в табл. 5 ниже, диапазон аффинностей связывания (согласно SPR) CD4-Аднектинов с CD4 составлял от 0,3 до 140 нМ; диапазон связывания N17-Аднектинов с искусственными мишенями на основе gp41 составлял от 0,5 до 40 нМ; диапазон связывания пептида составлял от 0,2 до 70 нМ. SPR-основанные аффинности для Комбинектина по изобретению и для его отдельных компонентов показаны в табл. 5 ниже.

Таблица 5. Аффинности связывания Комбинектина и отдельных компонентов

Белок	ID	Мишень	K_{on} (1/Мс)	K_{off} (1/с)	K_d (нМ)
CD4-Аднектин	ADX_6940_B01	CD4	1,9E+05	7,6E-04	4
N17-Аднектин	ADX_6200_A08	gp41 (IZN24)	7,0E+06	3,3E-03	0,5
пептид	203613-24	gp41 (PRD-828)	2,3E+06	2,5E-04	0,1
HSA-Комбинектин	BMT-180280	CD4	7,6E+03	8,3E-04	109
HSA-Комбинектин	BMT-180280	gp41 (IZN24)	8,1E+05	1,7E-03	2
HSA-Комбинектин	BMT-180280	gp41 (PRD-828)	9,6E+05	1,8E-04	0,2

In Vitro анализы ингибирующей активности

Существуют различные признанные в данной области системы *in vitro*, которые позволяют исследовать эффективность Комбинектина (или отдельных ингибиторов, или их комбинации) против инфекции ВИЧ-1. Они включают системы, которые обеспечивают возможность полной репликации лабораторного вируса или клинических изолятов различных штаммов в культивируемых клетках или культурах моноцитов периферической крови. Кроме того, для анализа эффективности Комбинектина, отдельных ингибиторов или их комбинаций можно использовать системы, которые воспроизводят ранние стадии проникновения инфекции в клетку без использования жизнеспособного вируса. Эти системы включают, без ограничения ими, "псевдотипированные" вирусы, содержащие делеции, которые делают их неспособными продуцировать инфекционные вирионы, или клетки, которые экспрессируют только ген gp160 ВИЧ, который можно использовать для мониторинга специфической реакции слияния ВИЧ-1 с клетками-мишенями.

In Vivo Модели

Специалисту в данной области известны различные признанные в данной области животные модели, которые обеспечивают возможность репликации и в некоторых случаях воспроизводят симптомы ВИЧ-инфекции. Эти модели могут быть использованы для анализа эффективности Комбинектина, отдельных ингибиторов или их комбинаций по изобретению.

XI. Применения в терапии

В одном аспекте настоящего изобретения предложены Комбинектины для лечения ВИЧ. Соответственно, в некоторых воплощениях в изобретении предложены способы ослабления или ингибирования слияния ВИЧ у субъекта, включающие введение эффективного количества Комбинектина по изобретению субъекту. В некоторых воплощениях субъект представляет собой человека. В некоторых воплоще-

ниях Комбинектин по изобретению является фармацевтически приемлемым для млекопитающих, в частности человека. "Фармацевтически приемлемый" полипептид относится к полипептиду, который вводят животному без существенных неблагоприятных медицинских последствий.

В некоторых воплощениях Комбинектин по изобретению вводят субъекту в комбинации (одновременно или раздельно) с агентом, известным в данной области, как полезный для конкретного расстройства или заболевания, подлежащего лечению.

В некоторых воплощениях целевая популяция пациентов для терапии Комбинектином представляет собой популяцию, которая не поддается стандартной терапии для подлежащего лечению заболевания, из-за, например, возраста, ранее существовавших состояний, генетических характеристик и/или сопутствующих заболеваний. Комбинектин по изобретению может служить альтернативой существующим терапевтическим методам, которые связаны со значительными побочными эффектами или проблемами безопасности.

В некоторых воплощениях целевая популяция пациентов для терапии Комбинектином состоит из неинфицированных субъектов с высоким риском инфицирования из-за образа жизни или других отягчающих факторов.

Комбинектин используют для защиты этих субъектов от инфицирования ВИЧ (доконтактная профилактика).

ХП. Фармацевтические композиции

В настоящем изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие Комбинектин или его слитые белки, описанные здесь, где композиция по существу не содержит эндотоксин или по меньшей мере содержит не более приемлемых уровней эндотоксинов, определенных органом государственного регулирования и контроля (например FDA).

Композиции по настоящему изобретению могут находиться в форме 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 полимера или другого носителя с замедленным высвобождением для местного применения, или распыляемой суспензии, подходящей для ингаляционного или интраназального введения.

Способы получения композиций, хорошо известные в данной области, можно найти, например, в Gennaro, A.R., ed., Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2000). Композиции для парентерального введения могут, например, содержать эксципиенты, стерильную воду, физиологический раствор, полиалкиленгликоли, такие как полиэтиленгликоль, масла растительного происхождения или гидрированные нафталины. Для контролирования высвобождения соединений можно использовать биосовместимый, биоразлагаемый лактидный полимер, лактидный/гликолидный сополимер или сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена. Композиции наночастиц (например биоразлагаемые наночастицы, твердые липидные наночастицы, липосомы) можно использовать для контролирования биораспределения соединений. Другие потенциально пригодные парентеральные системы доставки включают частицы сополимера этилена и винилацетата, осмотические насосы, имплантируемые инфузионные системы и липосомы. Концентрация соединения в композиции варьируется в зависимости от ряда факторов, включая дозу вводимого лекарственного средства и путь введения. Приемлемые носители, эксципиенты или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозах и концентрациях и включают буферы, такие как фосфатный, цитратный и другие органические кислоты; антиоксиданты, включающие аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как октадецилдиметилбензиламмония хлорид, гексаметония хлорид, бензалкония хлорид, бензетония хлорид, фенол, бутиловый или бензиловый спирт, алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен, катехол, резорцин; циклогексанол; 3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные полипептиды (менее чем примерно 10 остатков); белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстраны; хелатирующие агенты, такие как ЭДТА; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например Zn-белковые комплексы); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как Tween, PLURONIC® или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

Активные ингредиенты также могут быть включены в микрокапсулы, полученные, например, методами коацервации или посредством межфазной полимеризации, например в гидроксиметилцеллюлозную или желатиновую микрокапсулу и поли-(метилметакрилатную) микрокапсулу, соответственно, в коллоидные системы доставки лекарств (например липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсии. Такие методы раскрыты в Osol, A., ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition (1980).

Могут быть изготовлены препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы из твердых гидрофобных полимеров, содержащие белки по изобретению, где матрицы находятся в виде формованных изделий, например пленок или микрокапсул. Примеры матриц с замедленным высвобождением включают слож-

ные полиэферы, гидрогели (например поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поливиниловый спирт), полилактиды (патент US 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и этил-L-глутамата, неразлагаемый этиленвинилацетат, разлагаемые сополимеры молочной и гликолевой кислот, такие как LUPRON DEPOT® (инъекционные микросферы, состоящие из сополимера молочной и гликолевой кислот и ацетата леупролида) и поли-O-(-)-3-гидроксимасляную кислоту. Хотя полимеры, такие как этиленвинилацетат и молочная кислота-гликолевая кислота, позволяют высвобождать молекулы в течение более чем 100 суток, некоторые гидрогели высвобождают белки в течение более коротких периодов времени. Когда инкапсулированные белки по изобретению могут оставаться в организме в течение длительного времени, они могут денатурировать или агрегировать в результате воздействия влаги при 37°C, что приводит к потере биологической активности и к возможным изменениям иммуногенности. Могут быть разработаны рациональные стратегии стабилизации в зависимости от вовлеченного механизма. Например, если обнаружено, что механизм агрегации представляет собой межмолекулярное образование S-S-связи посредством тио-дисульфидного обмена, стабилизация может быть достигнута путем модификации сульфгидрильных остатков, лиофилизации из кислых растворов, контроля влажности с использованием соответствующих добавок и разработки конкретных композиций полимерной матрицы.

Композиции по настоящему изобретению для перорального применения включают таблетки, содержащие активный(е) ингредиент(ы) в смеси с нетоксичными фармацевтически приемлемыми эксципиентами. Эти эксципиенты могут представлять собой, например, инертные разбавители или наполнители (например сахарозу и сорбит), смазывающие агенты, скользящие вещества и антиадгезивные вещества (например стеарат магния, стеарат цинка, стеариновую кислоту, кремнеземы, гидрированные растительные масла или тальк). Композиции для перорального применения также могут быть представлены в виде жевательных таблеток или в виде твердых желатиновых капсул, где активный ингредиент смешан с инертным твердым разбавителем, или в виде мягких желатиновых капсул, где активный ингредиент смешан с водой или масляной средой.

Фармацевтическая композиция, предназначенная для использования для введения *in vivo*, обычно должна быть стерильной. Это может быть достигнуто посредством фильтрации через стерильные фильтрационные мембраны. Когда композиция лиофилирована, стерилизация с использованием этого метода может быть проведена либо до, либо после лиофилизации и восстановления влагосодержания. Композиция для парентерального введения может храниться в лиофилированной форме или в растворе. Кроме того, парентеральные композиции обычно помещают в контейнер, имеющий стерильный порт доступа, например пакет для внутривенного раствора или флакон, имеющий пробку, прокалываемую иглой для подкожной инъекции.

После приготовления фармацевтической композиции ее можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества или обезвоженного или лиофилированного порошка. Такие препараты могут храниться либо в готовой к употреблению форме, либо в форме (например лиофилированной), которая требует восстановления влагосодержания перед введением.

Композиции в настоящем изобретении также могут содержать более одного активного соединения, если это необходимо для конкретного подвергаемого лечению показания, предпочтительно соединения, взаимодополняющие активности которых не оказывают неблагоприятного влияния друг на друга. Такие молекулы подходящим образом присутствуют в комбинации в количестве, эффективном для предполагаемой цели.

XIII. Введение

Фармацевтическую композицию, содержащую Комбинектин или его слитый белок по настоящему изобретению, можно вводить субъекту с ВИЧ, используя стандартные способы введения, включающие пероральное, парентеральное, легочное, трансдермальное, внутримышечное, интраназальное, буккальное, сублингвальное или суппозиторное введение. Предпочтительно введение Комбинектинов по изобретению является парентеральным. Термин "парентеральное", при использовании здесь, включает внутривенное, внутримышечное, подкожное, ректальное, вагинальное или внутрибрюшинное введение. Предпочтительной является периферическая системная доставка посредством внутривенной, или внутрибрюшинной, или подкожной инъекции.

Терапевтически эффективная доза относится к дозе, которая обеспечивает терапевтический эффект, для которого ее вводят. Эффективное количество фармацевтической композиции, которое следует использовать терапевтически, зависит, например, от терапевтического контекста и целей. Специалисту в данной области понятно, что подходящие для лечения уровни доз будут, таким образом, варьироваться в зависимости, в частности, от вводимого вещества, показания, для которого используют связывающее вещество, пути введения и размера (массы тела, площади поверхности тела и размера органа) и состояния (возраста и общего состояния здоровья) пациента.

Например, терапевтически эффективная доза может быть определена сначала либо в анализах клеточных культур, либо в животных моделях, таких как мыши, крысы, кролики, собаки, свиньи или обезьяны. Животная модель может также использоваться для определения подходящего диапазона концентраций и пути введения. Такая информация затем может быть использована для определения пригодных доз и путей введения людям.

Точная доза будет определена с учетом факторов, связанных с субъектом, нуждающимся в лечении, и может быть установлена с использованием стандартных методов. Дозу и введение регулируют так, чтобы обеспечить достаточные уровни активного соединения или поддерживать нужный эффект. Факторы, которые могут быть приняты во внимание, включают тяжесть болезненного состояния, общее состояние здоровья субъекта, возраст, массу и пол субъекта, время и частоту введения, комбинацию(и) лекарственных средств, чувствительность реакции и ответ на терапию. В общем случае, Комбинектин по настоящему изобретению вводят в количестве от примерно 0,01 до примерно 50 мг/кг в сутки, предпочтительно от примерно 0,01 до примерно 30 мг/кг в сутки, наиболее предпочтительно от примерно 0,01 до примерно 20 мг/кг в сутки. В некоторых воплощениях Комбинектин по настоящему изобретению вводят в еженедельных дозах от примерно 0,01 до примерно 10 мг/кг, более предпочтительно от примерно 0,01 до примерно 5 мг/кг, наиболее предпочтительно от примерно 0,01 до примерно 1 мг/кг. Альтернативно, Комбинектин по изобретению вводят в количестве от примерно 15 до примерно 100 мг/неделя, от примерно 20 до примерно 80 мг/неделя, от примерно 20 до примерно 60 мг/неделя или от примерно 20 до примерно 25 мг/неделя.

Частота введения дозы зависит от фармакокинетических параметров связывающего агента в используемой композиции. Обычно композицию вводят до тех пор, пока не будет достигнута доза, при которой достигается нужный эффект. Таким образом, композицию можно вводить в виде разовой дозы или в виде нескольких доз (в одинаковых или в разных концентрациях/дозах) в течение некоторого времени или в виде непрерывной инфузии. Обычно производят дополнительное уточнение подходящей дозы. Подходящие дозы могут быть установлены путем использованием соответствующих данных о зависимости эффекта от дозы. Например, Комбинектин может назначаться ежедневно (например один, два, три раза или четыре раза в сутки) или реже (например один раз за двое суток, один или два раза в неделю или ежемесячно). Кроме того, как известно в данной области, могут потребоваться корректировки на возраст, массу тела, общее состояние здоровья, пол, питание, время введения, взаимодействие с лекарственными средствами и тяжесть заболевания, и они могут быть установлены с помощью обычных экспериментов специалистами в данной области. Комбинектин вводят подходящим образом пациенту за один раз или посредством целого ряда обработок.

Введение Комбинектина или его слияния, а также одного или более дополнительных терапевтических агентов либо путем совместного введения, либо путем последовательного введения может происходить, как описано выше для терапевтических применений. Подходящие фармацевтически приемлемые носители, разбавители и эксципиенты для совместного введения, как понятно специалисту в данной области, зависят от особенностей конкретного вводимого терапевтического агента.

XIV. Наборы и изделия

Комбинектин по изобретению может быть представлен в наборе, упакованной комбинации реагентов в заранее определенных количествах с инструкциями для применения в терапевтических или диагностических способах по изобретению.

Например, в одном воплощении изобретения предложено изделие, содержащее вещества, пригодные для лечения и предупреждения расстройств или состояний, описанных выше. Это изделие содержит контейнер и ярлык. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и пробирки. Контейнеры могут быть сделаны из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит композицию по изобретению, которая эффективна для лечения ВИЧ, и может иметь стерильный порт доступа (например, контейнер может представлять собой пакет для внутривенного раствора или флакон, имеющий пробку, прокалываемую иглой для подкожной инъекции). Активным агентом в композиции является Комбинектин по изобретению. На ярлыке, прикрепленном или приложенном к контейнеру, указано, что композиция используется для лечения ВИЧ. Изделие может дополнительно содержать второй контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Он также может включать другие вещества, желательные с коммерческой и пользовательской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши для упаковки с инструкциями по применению.

Включение посредством ссылки

Все документы и ссылки, включая патентные документы и веб-сайты, описанные здесь, отдельно включены посредством ссылки в данный документ в такой же степени, как если бы они были написаны в этом документе полностью или частично.

Изобретение теперь описано со ссылкой на следующие примеры, которые являются лишь иллюстративными и не предназначены для ограничения настоящего изобретения. Хотя изобретение описано подробно и со ссылкой на конкретные его воплощения, специалисту в данной области техники очевидно, что могут быть сделаны различные изменения и модификации изобретения без отступления от его сущности и объема.

Примеры

Пример 1. Получение/очистка Комбинектина

Тандем ВИЧ Комбинектин - Бактериальный

Бактериальные клетки BL21 (DE3) трансформировали ДНК.

Клетки выращивали в бактериальной культуре при $\sim 37^{\circ}\text{C}$ до OD_{600} .

Температуру культивирования снижали до $\sim 30^{\circ}\text{C}$ и культуру индуцировали с помощью IPTG (изо-пропилтиогаалактозид) и собирали через несколько часов.

Клетки собирали с помощью центрифугирования.

Выделение белка осуществляли с использованием химического лизиса и MICROFLUIDIZER®, с последующим осветлением посредством центрифугирования или тангенциально-поточной фильтрации. Лизат обрабатывали немедленно или замораживали для последующего использования.

Очистка посредством хроматографии с гидрофобным взаимодействием с последующей гидроксиапатитной хроматографией и/или ионообменной хроматографией. Смесь составляли и концентрировали с использованием тангенциально-поточной фильтрации.

Конструкция ВИЧ Комбинектин-Fc; культура клеток млекопитающих

ДНК трансфицируют в подходящие клетки млекопитающих.

Клетки выращивали в клеточной культуре.

Клетки собирали посредством центрифугирования и/или фильтрования.

Для очистки использовали аффинную хроматографию и ионообменную хроматографию.

Смесь составляли и концентрировали с использованием тангенциально-поточной фильтрации.

Конструкция ВИЧ Комбинектин-HuSA; культура клеток млекопитающих

ДНК трансфицировали в подходящие клетки млекопитающих.

Клетки выращивали в клеточной культуре.

Клетки собирали посредством центрифугирования и/или фильтрования.

Для очистки использовали хроматографию гидрофобного взаимодействия с последующей гидроксиапатитной хроматографией и/или ионообменной хроматографией.

Смесь составляли и концентрировали с использованием тангенциально-поточной фильтрации.

Пример 2. Анализ активности Комбинектина

Клетки MT-2, клетки HEK 293T и провирусный ДНК-клон NL₄₋₃ были получены из программы по СПИД и референтным реагентам (AIDS Research and Reference Reagent) Национального института здравоохранения (NIH). Клетки MT-2 размножали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки (FBS), 10 мМ буфера HEPES, pH 7,55 и 2 мМ L-глутамина. Клетки HEK 293T размножали в среде DMEM с добавлением 10% инактивированной нагреванием фетальной бычьей сыворотки FBS, 10 мМ буфера HEPES, pH 7,55 и 2 мМ L-глутамина. Рекомбинантный вирус NL-Rluc, в котором часть гена nef из провирусного клона NL₄₋₃ была заменена геном люциферазы Renilla, был сконструирован в Bristol-Myers Squibb. Репликационно-компетентный вирус собирали через 3 суток после трансфекции клеток HEK 293T модифицированным провирусным клоном pNL-Rluc. Трансфекцию проводили, используя Lipofectamine Plus (Invitrogen, Carlsbad, CA) в соответствии с инструкцией производителя. Вирус титровали в клетках MT-2 с использованием активности люциферазного фермента в качестве биомаркера. Вирус NL-Rluc использовали для инфицирования клеток MT-2 с множественностью 0,01 в течение 1 ч перед добавлением к пептидам в 96-луночных планшетах. Пептиды последовательно разбавляли в три раза и 11 концентраций помещали в планшеты в трех параллелях. Через 4-5 суток инкубации клетки обрабатывали и количественно оценивали в отношении роста вируса по количеству экспрессированной люциферазы. Люциферазу определяли количественно с использованием набора Dual Luciferase от Promega (Madison, WI) с изменениями в протоколе изготовителя. Разбавленный раствор пассивного лизиса предварительно смешивали с ресуспендированным реагентом для люциферазного анализа и затем ресуспендировали в субстрате STOP & GLO® (в соотношении 2:1:1). В каждую аспирированную лунку на аналитических планшетах добавляли в общей сложности 50 мкл смеси, и люциферазную активность измеряли немедленно на Wallac TriLux (Perkin-Elmer, Waltham, MA). 50%-ную эффективную концентрацию (EC₅₀) рассчитывали путем сравнения количества люциферазы, продуцируемой в присутствии ингибирующего пептида, по сравнению с лунками, куда пептид не был добавлен.

Пример 3. Определение фармакокинетики Комбинектина

Модель трансгенных мышей с человеческим CD4

Самцов и самок гетерозиготных мышей с человеческим CD4 получали из Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME.

Фармакокинетические (PK) исследования на мышах WT (дикого типа)

8-21-суточные исследования с однократной IV (внутривенной) болюсной дозой проводили на самках мышей C57Bl/6 WT для оценки PK-свойств различных Комбинектинов. Слияния Fc-Комбинектин вводили в дозе 10 мг/кг и слияния HSA-Комбинектина вводили в дозе 8,8 мг/кг. Образцы плазмы собирали в CPD и хранили при температуре -80°C вплоть до анализа.

Фармакокинетические (ПК) исследования на мышах hCD4

7-10-суточные исследования с однократной IV болюсной дозой проводили на гетерозиготных мышах hCD4 для оценки ПК-свойств различных Комбинектинов в присутствии мишени. Дозы Комбинектина и методы сбора проб были такими же, как описано выше для мышей WT.

Исследования на яванских макаках

1-Недельное исследование с однократной дозой было выполнено на самках яванского макака для определения ПК Комбинектинов. После дозы 1 мг/кг, в определенные моменты времени, образцы сыворотки собирали, аликвотировали и быстро замораживали для MSD (масс-селективный детектор) или LC/MS (жидкостная хроматография с масс-спектрометрией) анализа.

Фармакокинетические измерения

Уровни лекарственного средства измеряли в плазме мышей и яванского макака с использованием технологической платформы Mesoscale или колориметрических форматов ELISA. Слияния Fc-Комбинектина захватывали белком PRD828 (BMS), который специфически связывается с пептидным компонентом Комбинектинов, и детектировали с использованием rAb козы против человеческого IgG Fc, конъюгированного с HRP (пероксидаза хрена) (Pierce #31413). Слияния HSA-Комбинектина захватывали белком PRD828 и детектировали с использованием rAb козы против HSA (Bethyl, TX #A80-229A), которые были помечены рутением. Концентрации проб рассчитывали из стандартной кривой, используя 5-параметрическое логарифмическое соответствие. Некомпаратментные анализы выполняли с использованием Phoenix WINNONLIN® 6.3 (Pharsight Corporation, Mountain View, CA), используя плазменную модель и линейно-логарифмический метод расчета.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Полипептид, содержащий три активных домена, где один домен представляет собой белок анти-CD4 Аднектин, второй домен представляет собой gp41-связывающий фрагмент и третий домен представляет собой фрагмент пептидного ингибитора слияния ВИЧ, где белок анти-CD4 Аднектин содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 95-114 и где пептидный ингибитор слияния ВИЧ содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 372-392.

2. Полипептид, содержащий три активных домена, где один домен представляет собой CD4-связывающий фрагмент, второй домен представляет собой белок анти-N17 Аднектин и третий домен представляет собой фрагмент пептидного ингибитора слияния ВИЧ, где белок анти-N17 Аднектин содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 115-371 и где пептидный ингибитор слияния ВИЧ содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 372-392.

3. Полипептид по любому из пп.1, 2, где три домена соединены друг с другом в любом порядке линкерами.

4. Полипептид по любому из пп.1-3, дополнительно содержащий один или более фармакокинетических (ПК) фрагментов, выбранных из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, сиаловой кислоты, Fc, фрагмента Fc, трансферрина, сывороточного альбумина, белка, связывающего сывороточный альбумин, и белка, связывающего сывороточный иммуноглобулин.

5. Полипептид по п.4, где ПК-фрагмент представляет собой Fc.

6. Полипептид по п.5, где Fc присоединен к N-концу полипептида.

7. Полипептид по п.4, где ПК-фрагмент представляет собой человеческий сывороточный альбумин.

8. Полипептид по п.7, где человеческий сывороточный альбумин присоединен к N-концу полипептида.

9. Полипептид, содержащий два активных домена, где один домен представляет собой белок анти-CD4 Аднектин, где белок анти-CD4 Аднектин содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 95-114, и другой домен представляет собой gp41-связывающий фрагмент или фрагмент пептидного ингибитора слияния ВИЧ, где пептидный ингибитор слияния ВИЧ содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 372-392.

10. Полипептид, содержащий два активных домена, где один домен представляет собой белок анти-N17 Аднектин, где белок анти-N17 Аднектин содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 115-371, и другой домен представляет собой CD4-связывающий фрагмент или фрагмент пептидного ингибитора слияния ВИЧ, где пептидный ингибитор слияния ВИЧ содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 372-392.

11. Полипептид по любому из пп.9, 10, где два домена соединены друг с другом в любом порядке линкерами.
12. Полипептид по любому из пп.9, 10, дополнительно содержащий один или более фармакокинетических (РК) фрагментов, выбранных из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, сиаловой кислоты, Fc, фрагмента Fc, трансферрина, сывороточного альбумина, белка, связывающего сывороточный альбумин, и белка, связывающего сывороточный иммуноглобулин.
13. Полипептид по п.12, где РК-фрагмент представляет собой Fc.
14. Полипептид по п.13, где Fc присоединен к N-концу полипептида.
15. Полипептид по п.12, где РК-фрагмент представляет собой человеческий сывороточный альбумин.
16. Полипептид по п.15, где человеческий сывороточный альбумин присоединен к N-концу полипептида.
17. Полипептид, содержащий три активных домена, где один домен представляет собой белок анти-CD4 Аднектин, где белок анти-CD4 Аднектин содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 95-114, второй домен представляет собой белок анти-N17 Аднектин, где белок анти-N17 Аднектин содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 115-371, и третий домен представляет собой пептидный ингибитор слияния ВИЧ, где пептидный ингибитор слияния ВИЧ содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 372-392.
18. Полипептид по п.17, где три домена соединены друг с другом в любом порядке линкерами.
19. Полипептид по п.17 или 18, дополнительно содержащий один или более фармакокинетических (РК) фрагментов, выбранных из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, сиаловой кислоты, Fc, фрагмента Fc, трансферрина, сывороточного альбумина, белка, связывающего сывороточный альбумин, и белка, связывающего сывороточный иммуноглобулин.
20. Полипептид по п.19, где РК-фрагмент представляет собой Fc.
21. Полипептид по п.20, где Fc присоединен к N-концу полипептида.
22. Полипептид по п.19, где РК-фрагмент представляет собой человеческий сывороточный альбумин.
23. Полипептид по п.22, где человеческий сывороточный альбумин присоединен к N-концу полипептида.
24. Полипептид, содержащий анти-CD4 Аднектин, анти-N17 Аднектин и пептидный ингибитор слияния ВИЧ, где указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную нелиinkerным участкам SEQ ID NO: 3, 5, 7 или 9.
25. Полипептид по п.24, дополнительно содержащий один или более фармакокинетических (РК) фрагментов, выбранных из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, сиаловой кислоты, Fc, фрагмента Fc, трансферрина, сывороточного альбумина, белка, связывающего сывороточный альбумин, и белка, связывающего сывороточный иммуноглобулин.
26. Полипептид по п.25, где РК-фрагмент представляет собой Fc.
27. Полипептид по п.26, где Fc присоединен к N-концу полипептида.
28. Полипептид по п.25, где РК-фрагмент представляет собой человеческий сывороточный альбумин.
29. Полипептид по п.28, где человеческий сывороточный альбумин присоединен к N-концу полипептида.
30. Полипептид, содержащий анти-CD4 Аднектин, анти-N17 Аднектин и пептидный ингибитор слияния ВИЧ, где указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную нелиinkerным участкам SEQ ID NO: 4, 6, 8 или 10.
31. Полипептид, содержащий анти-CD4 Аднектин, анти-N17 Аднектин и пептидный ингибитор слияния ВИЧ, где указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 3.
32. Полипептид, содержащий анти-CD4 Аднектин, анти-N17 Аднектин и пептидный ингибитор слияния ВИЧ, где указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 4.
33. Полипептид, содержащий анти-CD4 Аднектин, анти-N17 Аднектин и пептидный ингибитор слияния ВИЧ, где указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 5.
34. Полипептид, содержащий анти-CD4 Аднектин, анти-N17 Аднектин и пептидный ингибитор слияния ВИЧ, где указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 6.
35. Полипептид, содержащий анти-CD4 Аднектин, анти-N17 Аднектин и пептидный ингибитор слияния ВИЧ, где указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность, показанную в

SEQ ID NO: 7.

36. Полипептид, содержащий анти-CD4 Аднектин, анти-N17 Аднектин и пептидный ингибитор слияния ВИЧ, где указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 8.

37. Полипептид, содержащий анти-CD4 Аднектин, анти-N17 Аднектин и пептидный ингибитор слияния ВИЧ, где указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 9.

38. Полипептид, содержащий анти-CD4 Аднектин, анти-N17 Аднектин и пептидный ингибитор слияния ВИЧ, где указанный полипептид содержит аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 10.

39. Полипептид, содержащий два активных домена, где один домен представляет собой белок анти-N17 Аднектин, где белок анти-N17 Аднектин содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 115-371, и второй домен представляет собой пептидный ингибитор слияния ВИЧ, где пептидный ингибитор слияния ВИЧ содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 98, 99 или 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 372-392.

40. Полипептид по п.39, где два домена соединены друг с другом в любом порядке линкерами.

41. Полипептид по п.39 или 40, дополнительно содержащий один или более фармакокинетических (РК) фрагментов, выбранных из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, сиаловой кислоты, Fc, фрагмента Fc, трансферрина, сывороточного альбумина, белка, связывающего сывороточный альбумин, и белка, связывающего сывороточный иммуноглобулин.

42. Полипептид по п.41, где РК-фрагмент представляет собой Fc.

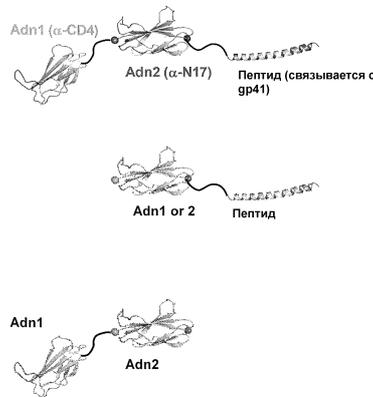
43. Полипептид по п.42, где Fc присоединен к N-концу полипептида.

44. Полипептид по п.41, где РК-фрагмент представляет собой человеческий сывороточный альбумин.

45. Полипептид по п.44, где человеческий сывороточный альбумин присоединен к N-концу полипептида.

46. Фармацевтическая композиция против ВИЧ-инфекции, содержащая полипептид по любому из пп.1-45 и носитель.

47. Способ лечения ВИЧ у субъекта, включающий введение эффективного количества пептида или его композиции по любому из пп.1-46.



Фиг. 1

Слияние Fc-Комбинектин 3137 (полный белок представляет собой гомодимер этой последовательности) [SEQ ID NO:4]

**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWWYDGVVEHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSGFFLYSKLTVDKSRWQGGNVFSCVMHEALHNH
YTQKLSLSLSPESPEPEPEDESPEPEPEDEFGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAV
TVHSYHIQYWPLGSYQRYQVFSVPGSKSTATISGLKPGVEYQIRVYAETGRGESDQSL
GWIQIGYRTEESPEPEPEDEFGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWQYKVPYRYRITY
GETGGNSPVQOFTVPSVLSAEISGLKPGVDYITIVYAVTRGVDSAPISINRYRTPGGGG
SGGGSGGGSGGGGSEYARIEALIRAAOEOEKNEAALRELYKWA**

Слияние Fc-Комбинектин 3151 (полный белок представляет собой гомодимер этой последовательности) [SEQ ID NO:6]

**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWWYDGVVEHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
LPAIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSGFFLYSKLTVDKSRWQGGNVFSCVMHEALHNH
YTQKLSLSLSPESPEPEPEDESPEPEPEDEFGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAV
TVHSYHIQYWPLGSYQRYQVFSVPGSKSTATISGLKPGVEYQIRVYAETGRGESDQSL
GWIQIGYRTEESPEPEPEDEFGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYVNPYRYRITY
GETGGNSPVQOFTVPSVLSAASISGLKPGVDYITIVYAVTRGVDSAPISINRYRTPGGGG
SGGGSGGGSGGGGSEYARIEALIRAAOEOEKNEAALRELYKWA**

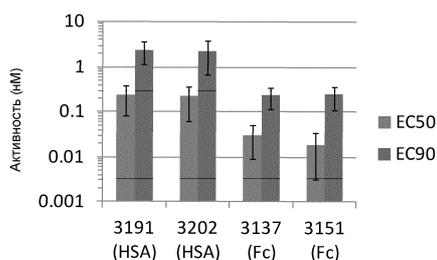
Слияние HSA-Комбинектин 3191 [SEQ ID NO:8]

**DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIQAFYLAQYLAQAFEDHVKLVNEVTEFAKTCV
ADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKD
DNPPLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRY
KAAFTCCQAADKAACLLPKLDELREDEGKASSAKQRLKASLQKGERAFKAW
AVARLSQRFFKAEFAEYVSKLVDLTKVHTECCHGDLECCADDRADLAKYICENQ
DSISSKLECKEPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAK
DVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDE
FKPLVEEPQNLKQNCLEFQLEGEYKFNALLVRYTKVQVSTPTLVEVSRNL
GKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVN
RRPFCFALEVDYVYVPEFNAETFFHADICTLSEKERQIKKQATLVELVKKPK
ATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKLVAAASQAALGLESPPEPE
PEDESPEPEPEDEFGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVHSYHIQYWPLGSYQ
RYQVFSVPGSKSTATISGLKPGVEYQIRVYAETGRGESDQSLGWIQIGYRTEESPEPE
PEDEFGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKVPYRYRITYGETGGNSPVQOFTVPSV
LSSAEISGLKPGVDYITIVYAVTYGIDSPISINRYRTEGGGGSGGGSGGGSGGGGSE
YARIEALIRAAOEOEKNEAALRELYKWA**

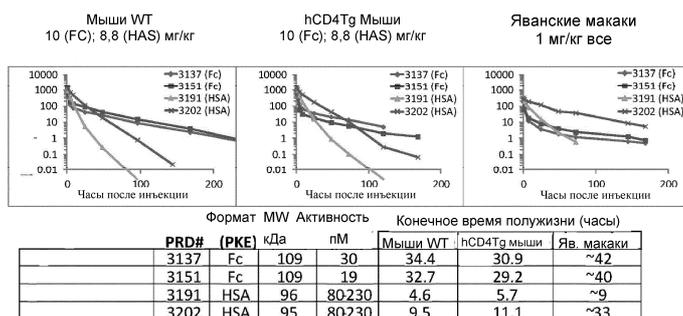
Слияние HSA-Комбинектин 3202 [SEQ ID NO:10]

**DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIQAFYLAQYLAQAFEDHVKLVNEVTEFAKTCV
ADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKD
DNPPLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKLYEIAARRHPYFYAPELFFAKRY
KAAFTCCQAADKAACLLPKLDELREDEGKASSAKQRLKASLQKGERAFKAW
AVARLSQRFFKAEFAEYVSKLVDLTKVHTECCHGDLECCADDRADLAKYICENQ
DSISSKLECKEPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAK
DVFLGMFLYEYARRHPDYSVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDE
FKPLVEEPQNLKQNCLEFQLEGEYKFNALLVRYTKVQVSTPTLVEVSRNL
GKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVN
RRPFCFALEVDYVYVPEFNAETFFHADICTLSEKERQIKKQATLVELVKKPK
ATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKLVAAASQAALGLGGGGSG
GGGGSGGGSGGGSGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVHSYHIQY
WPLGSYQRYQVFSVPGSKSTATISGLKPGVEYQIRVYAETGGADSDQSGWIQIGYR
TEESPEPEPEDEFGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKVPYRYRITYGETGGNSPV
QOFTVPSVLSAEISGLKPGVDYITIVYAVTRGVDSAPISINRYRTPGGGGSGGGSGGG
SGGGGTIAEYARIEALIRAAOEOEKNEAALRELYKWA**

Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

Анти-N17 Аднектин – Пептидный ингибитор слияния ВИЧ Комбинектин (SEQ ID NO: 410)

GSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKVNAYRYRITYGETGGNSPVOEFTVPSVLST
ATISGLKPGVDYITVYAVTYGVSDPISINRYRTEIDGGGGSGGGSGGGSGGGGAR
IEEYAAARIEALIRAAOEOEKNEAALRELYKWAS

Анти-N17 Аднектин – Пептидный ингибитор слияния ВИЧ Комбинектин (SEQ ID NO: 411)

GSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKVNAYRYRITYGETGGNSPVOEFTVPSVLST
ATISGLKPGVDYITVYAVTYGVSDPISINRYRTEIDGGGGSGGGSGGGSGGGGTI
AEYAAARIEALIRAAOEOEKNEAALRELYKWAS

Анти-N17 Аднектин – Пептидный ингибитор слияния ВИЧ Комбинектин (SEQ ID NO: 412)

GSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKVNAYRYRITYGETGGNSPVOEFTVPSVLST
ATISGLKPGVDYITVYAVTYGVSDPISINRYRTEIDGGGGSGGGSGGGSGGGGSE
YEARIEALIRAAOEOEKNEAALRELYKWAS

Анти-N17 Аднектин – Пептидный ингибитор слияния ВИЧ Комбинектин (SEQ ID NO: 413)

GSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWKYKVPYRYRITYGETGGNSPVOEFTVPSVLSTA
TISGLKPGVDYITVYAVTYGVNSLPISINRYRTEIDGGGGSGGGSGGGSGGGGTEY
EARIEALIRAAOEOEKNEAALRELKEWASIWV

Анти-N17 Аднектин – Пептидный ингибитор слияния ВИЧ Комбинектин (SEQ ID NO: 414)

GSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVGWYHIGYNVEGEPASYOYFRVPGS
KSTATISGLKPGVEYMIFVNAVTVGSGAREEFLPISINRYRTEIDGGGGSGGGSGGGG
GGGGSEYEARIEALIRAAOEOEKNEAALRELDKWTGVWGNYEKV

Анти-N17 Аднектин – Пептидный ингибитор слияния ВИЧ Комбинектин (SEQ ID NO: 415)

GSVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVOEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYITVYAVTVGRGESPASSKPISINRYRTEIDGGGGSGGGSGGGSGGGG
SRIEALIRAAOEOEKNEAALRELFKWAS

Анти-N17 Аднектин – Пептидный ингибитор слияния ВИЧ Комбинектин (SEQ ID NO:416)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVOEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTGRGESPASSKPISINRTEIDGGGSGGGSGGGSGGGG
SRIFALIRAAOEOOKNEAALRELDKAS

Анти-N17 Аднектин – Пептидный ингибитор слияния ВИЧ Комбинектин (SEQ ID NO:417)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVOEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTGRGESPASSKPISINRTEIDGGGSGGGSGGGSGGGG
SRIFALIRAAOEOEKNEAALRELYKAS

Анти-N17 Аднектин – Пептидный ингибитор слияния ВИЧ Комбинектин (SEQ ID NO:418)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVOEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTGRGESPASSKPISINRTEIDGGGSGGGSGGGSGGGG
SRIFALIRAAOEOEKNEAALRELLKAS

Анти-N17 Аднектин – Пептидный ингибитор слияния ВИЧ Комбинектин (SEQ ID NO:419)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVOEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTGRGESPASSKPISINRTEIDGGGSGGGSGGGSGGGG
SRIFALIRAAOEOEKNEAALRELOKAS

Анти-N17 Аднектин – Пептидный ингибитор слияния ВИЧ Комбинектин (SEQ ID NO:420)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKVHPYRYRITYGETGGNSPVOEFTVPSVLST
ATISGLKPGVDYTITVYAVTYGDDSAIPISINRTEIDGGGSGGGSGGGSGGGG
EALIRAAOEOEKNEAALRELDKAS

Анти-N17 Аднектин – Пептидный ингибитор слияния ВИЧ Комбинектин (SEQ ID NO:421)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWVAGAEDYQYYRITYGETGGNSPVOEFTVPHDLVT
ATISGLKPGVDYTITVYAVTDMMHVEYTEHPISINRTEIDGGGSGGGSGGGSGGGG
AIAEYARIEALIRAAOEOEKNEAALRELDKAS

Анти-N17 Аднектин – Пептидный ингибитор слияния ВИЧ Комбинектин (SEQ ID NO:422)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWKYKVHPYRYRITYGETGGNSPVOEFTVPSVLSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTYGVNSLPISINRTEIDGGGSGGGSGGGSGGGTEY
EARIEALIRAAOEOEKNEAALRELDK

Анти-N17 Аднектин – Пептидный ингибитор слияния ВИЧ Комбинектин (SEQ ID NO:423)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVOEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTGRGESPASSKPISINRTEIDGGGSGGGSGGGSGGGG
SRIEALIRAAOEOEKNEAALRELYKWTS

Анти-N17 Аднектин – Пептидный ингибитор слияния ВИЧ Комбинектин (SEQ ID NO:424)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVOEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTGRGESPASSKPISINRTEIDGGGSGGGSGGGSGGGG
SRIEALIRAAOEOEKNEAALRELYKWASLWI

Анти-N17 Аднектин – Пептидный ингибитор слияния ВИЧ Комбинектин (SEQ ID NO:425)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVOEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTGRGESPASSKPISINRTEIDGGGSGGGSGGGSGGGG
SRIEALIRAAOEOEKNEAALRELYKWASRWN

Анти-N17 Аднектин – Пептидный ингибитор слияния ВИЧ Комбинектин (SEQ ID NO:426)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVOEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTGRGESPASSKPISINRTEIDGGGSGGGSGGGSGGGG
SRIEALIRAAOEOEKNEAALRELYKWASSWN

Анти-N17 Аднектин – Пептидный ингибитор слияния ВИЧ Комбинектин (SEQ ID NO:427)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVOEFTVPGSKSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTGRGESPASSKPISINRTEIDGGGSGGGSGGGSGGGG
SRIEALIRAAOEOEKNEAALRELYKWGS

Анти-N17 Аднектин – Пептидный ингибитор слияния ВИЧ Комбинектин (SEQ ID NO: 428)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLISWEYKVNRYRYRITYGETGGNSPVOEFTVPSVLSTA
TISGLKPGVDYTITVYAVTYGVHSSPISINRTEIDGGGSGGGSGGGSGGGGSRIE
ALIRAAOEOEKNEAALRELDK

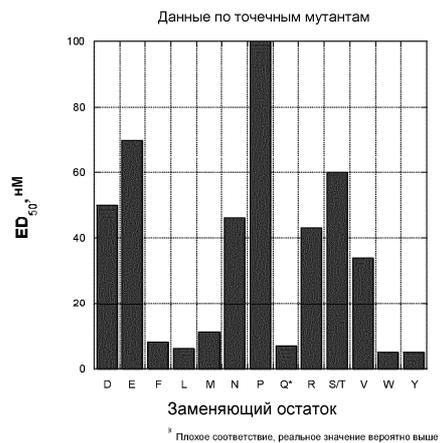
Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8

